



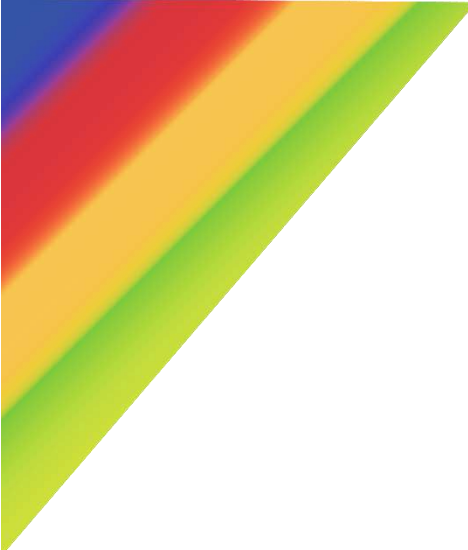
EFOIT

INOVAÇÕES PARA O ENFRENTAMENTO DA COVID-19

Editores:

**Maria Danielly Lima de Oliveira
César Augusto Souza de Andrade**

**17-19 Agosto, 2020
UFPE | On line
Recife/PE, Brasil**



Copyright (c) by **Editores**

Todos os direitos reservados aos Editores
Maria Danielly Lima de Oliveira
César Augusto Souza de Andrade

Catálogo na fonte:

ISBN: 978-65-86732-81-8

E56a Encontro Brasileiro Para Inovação Terapêutica (6. : 2020 ago. 17-19 : Recife, PE).
[Anais do] 6º Encontro Brasileiro Para Inovação Terapêutica [recurso eletrônico] : inovações para o enfrentamento da COVID-19 / editores : Maria Danielly Lima de Oliveira, César Augusto Souza de Andrade. – Recife: Ed. UFPE, 2020.


Vários autores.
ISBN (online)

1. Terapêutica – Congressos. 2. Inovações médicas – Congressos. 3. COVID-19 (Doença) – Tratamento – Inovações tecnológicas. I. Oliveira, Maria Danielly Lima de (Ed.). II. Andrade, César Augusto Souza de (Ed.). III. Título.

615.5

CDD (23.ed.)

UFPE (BC2020-



APRESENTAÇÃO

Em sua primeira edição, ocorrida em 2009, sob o comando da saudosa Professora Suely Galdino e como ação estratégica para o Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, o EBIT reuniu pessoas de diferentes campos da ciência para discutirem o tema "Descortinado à interdisciplinaridade: acesso e formas de apropriação de inovações tecnológicas e seus impactos sociais". Em seguida, as edições dos anos 2011, 2013, 2015 e 2017 apresentaram o brilhantismo na discussão de temas importantíssimos como desafios na construção de espaços para a saúde, território, complexo industrial da saúde e o bem estar da população brasileira, além do tema Interdisciplinaridade na produção de insumos estratégicos de saúde e em 2017 com o tema abordando Insumos prioritários no combate às epidemias de HIV/AIDS, tuberculose, malária e outras doenças negligenciadas. Neste ano, diante do novo cenário mundial ao qual fomos expostos e estamos vivendo, o 6º EBIT está trazendo a temática "Inovações para o enfrentamento da COVID-19".

A Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou, em 30 de janeiro de 2020, que o surto da doença causada pelo novo Coronavírus (COVID-19) constitui uma Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional – o mais alto nível de alerta da Organização, conforme previsto no Regulamento Sanitário Internacional. Em 11 de março de 2020, a COVID-19 foi caracterizada pela OMS como uma pandemia. Foram confirmados no mundo 20.730.456 casos de COVID-19 (286.710 novos em relação ao dia anterior) e 751.154 mortes (6.713 novas em relação ao dia anterior) até 14 de agosto de 2020 no mundo. Várias ações a nível mundial apresentam como objetivos de controle da doença, o rastreamento de contatos e visualização de cadeias de transmissão, ampliação da capacidade de diagnóstico, medidas de distanciamento social, estudo e aplicação de terapias medicamentosas e o desenvolvimento de uma vacina. Diante deste cenário, o 6º EBIT apresenta como objetivo discutir inovações de enfrentamento da COVID-19 visando favorecer uma orientação quanto ao desenvolvimento de políticas públicas, conhecimentos e tecnologias que possam contribuir para o entendimento da doença e discutir estratégias de prevenção, diagnóstico e tratamento.

O 6º EBIT no formato online foi um evento totalmente gratuito organizado por docentes e discentes que contou com quase 600 (575) inscritos e 122 trabalhos completos aprovados. Nesta edição do EBIT foram realizados minicursos, conferências e apresentações dos trabalhos científicos selecionados.

Maria Danielly Lima de Oliveira
Presidente do 6º EBIT



PRESIDENTE


Maria Danielly Lima de Oliveira

EDITORES

Maria Danielly Lima de Oliveira
César Augusto Souza de Andrade

COMISSÃO ORGANIZADORA


Alberto Galdino da Silva Junior (PPGIT/UFPE)
Amanda Pinheiro de Barros Albuquerque (PPGIT/UFPE)
Anderson Félix dos Santos (PPGIT/UFPE)
Anderson Rodrigues de Almeida (PPGIT/UFPE)
César Augusto Souza de Andrade (PPGIT/UFPE)
Eraldo Fonseca dos Santos Junior (PPGIT/UFPE)
Estefani Pontes Simão (PPGCB/UFPE)
Eudes Gustavo Constatino Cunha (PPGIT/UFPE)
Giselle Soares dos Santos (PPGBqF/UFPE)
Isaac Aarón Morales Frias (PPGIT/UFPE)
Karen Yasmim P. S. Avelino (PPGIT/UFPE)
Maira Galdino da Rocha Pitta (PPGIT/UFPE)
Maria Danielly Lima de Oliveira (PPGIT/UFPE)
Moacyr Jesus de Melo Rego (PPGIT/UFPE)
Priscilla Stela Santana (PPGIT/UFPE)





COMISSÃO CIENTÍFICA

Alberto Galdino da Silva Junior (PPGIT/UFPE)
Amanda Pinheiro de Barros Albuquerque (PPGIT/UFPE)
Anderson Félix dos Santos (PPGIT/UFPE)
Anderson Rodrigues de Almeida (PPGIT/UFPE)
Breno Caldas de Araújo (UFPE)
César Augusto Souza de Andrade (PPGIT/UFPE)
Douglas Viana (NUPIT-SG)
Eraldo Fonseca dos Santos Junior (PPGIT/UFPE)
Estefani Pontes Simão (PPGCB/UFPE)
Eudes Gustavo Constatino Cunha (PPGIT/UFPE)
Giselle Soares dos Santos (PPGBqF/UFPE)
Helinando Pequeno de Oliveira (UNIVASF)
Isaac Aarón Morales Frias (PPGIT/UFPE)
Karen Yasmim P. S. Avelino (PPGIT/UFPE)
Ludovico Migliolo (UCDB/MS)
Maira Galdino da Rocha Pitta (PPGIT/UFPE)
Maria Danielly Lima de Oliveira (PPGIT/UFPE)
Marina Galdino da Rocha Pitta (UFPE)
Michelle Melgarejo da Rosa (UFPE)
Michelly Cristiny Pereira (NUPIT/UFPE)
Moacyr Jesus de Melo Rego (PPGIT/UFPE)
Nelson Gomes de Oliveira Júnior (UCDB/MS)
Octavio Luiz Franco (UCDB/MS e UCB/DF)
Priscilla Stela Santana (PPGIT/UFPE)
Tiago Rafael de Sousa Nunes (PPGIT/UFPE)





SUMÁRIO

ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA

A IMPORTÂNCIA DA ORIENTAÇÃO FARMACÊUTICA SOBRE O USO DE AZITROMICINA NO TRATAMENTO DE COVID-19	15
ARMAZENAMENTO DE MEDICAMENTOS NA CENTRAL DE ABASTECIMENTO FARMACÊUTICO (CAF) DE UM MUNICÍPIO DO PIAUÍ, BRASIL	21
PROTOCOLO DE AUDITORIA DE MEDICAMENTOS DE ALTA VIGILÂNCIA: UMA ESTRATÉGIA PARA SEGURANÇA DO PACIENTE	29
ATUAÇÃO DO FARMACÊUTICO NA LINHA DE CUIDADO DE PESSOAS VIVENDO COM HIV/AIDS EM UM HOSPITAL DE REFERÊNCIA EM DOENÇAS TROPICAIS DO ESTADO DO PIAUÍ-BRASIL	34

BIOENSAIOS

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINEOPLÁSICO DE UMA IMIDAZACRIDINA EM ASSOCIAÇÃO COM A TÉCNICA DE TERAPIA FOTODINÂMICA EM CÉLULAS DE MELANOMA	42
---	----

BIOLOGIA MOLECULAR

RNA DE INTERFERÊNCIA E SUA APLICABILIDADE NAS NEOPLASIAS	50
BIOMARCADORES DE RELEVÂNCIA NO DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DO CÂNCER GÁSTRICO	56
CLONAGEM DE DNA EM 4 DIAS: UTILIZAÇÃO DE UMA TÉCNICA <i>RESTRICTION FREE</i> PARA ACELERAR A CONSTRUÇÃO DE LINHAGENS RECOMBINANTES	65
DETECÇÃO DE DNA DE <i>Leishmania</i> spp. POR qPCR EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE CÃES DE REGIÃO ENDÊMICA NO ESTADO DE PERNAMBUCO	72
A AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA PCR CONVENCIONAL E qPCR NA DETECÇÃO DO ALVO kDNA DA <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> EM AMOSTRAS DE ANIMAIS SILVESTRES E SINANTRÓPICOS ATRAVÉS DE SWAB.	79
COLÁGENO DE SUBPRODUTOS DE PELE DE SARAMUNETE (<i>Pseudupeneus maculatus</i>) PARA USO COMO BIOMATERIAL	84

POTENCIAL DE DETECÇÃO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR POR TESTES MOLECULARES EM SWAB CONJUNTIVAL DE EQUINOS ASSINTOMÁTICOS NA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE, PERNAMBUCO 91

PERFIL DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS PARA SARS-COV-2 NA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE E MUNICÍPIOS DO INTERIOR DO ESTADO DE PERNAMBUCO PELO NÚCLEO DE PESQUISA EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA DA UFPE 99

BIOTECNOLOGIA E NANOTECNOLOGIA EM SAÚDE

FORMULAÇÃO NANOTECNOLÓGICA CONTENDO IMIQUIMODE: UMA NOVA ABORDAGEM TERAPÊUTICA PARA O CÂNCER CERVICAL 105

NANOSENSOR ELETROQUÍMICO A BASE DE ÁCIDO TIOFENO ACÉTICO E INDOLICIDINA PARA A IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS 110

IMUNOSENSOR IMPEDIMÉTRICO BASEADO EM NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO E PARTÍCULAS VIRAIS PARA O DIAGNÓSTICO DO ZIKA. 116

POTENCIAL DE ENZIMAS FIBRINOLÍTICAS DOS RESÍDUOS DA PESCA E AQUICULTURA: UMA BREVE REVISÃO 122

PLATAFORMA BIOSSENSORA NANOESTRUTURADA PARA A DETECÇÃO DO ANTICORPO DA ONCOSTATINA M (OSM-R) 129

NANOSISTEMAS QUANTUM DOTS-LECTINAS COMO ALTERNATIVA NA INVESTIGAÇÃO DE GLICANOS EM ESTRUTURAS DE *CANDIDA* 137

NANOFIBRAS POLIMÉRICAS ELETROFIADAS CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA APLICAÇÃO COMO ELETRODOS PARA BIOSSENSORES 142

ABORDAGENS NA APLICAÇÃO DA VITAMINA C INTRODUZIDA EM PLATAFORMAS DE ENTREGA PARA FORTIFICAÇÃO DE ANDAIMES UTILIZADOS NA REPARAÇÃO TECIDUAL 149

NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO ÓLEO DE COPAÍBA NO NÚCLEO: ESTRATÉGIA PARA ENCAPSULAMENTO DE FÁRMACOS LIPOFÍLICOS 153

SENSOR BIOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE OURO PARA DIAGNÓSTICO DE HPV58 159

EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE COLAGENASES DE PEIXES POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA 163

BIOSENSOR ELETROQUÍMICO NANOESTRUTURADO BASEADO EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS E PEPTÍDEO SYNOECA-MP PARA DETECÇÃO DE BACTÉRIAS 171

PURIFICAÇÃO PARCIAL E INFLUÊNCIA DE ÍONS E AGENTES TENSOATIVOS SOBRE PROTEASES DE ORIGEM FÚNGICA 178

CAPTURE DE ANTICORPOS ANTI-ZIKAV COM MEMBRANAS NANOESTRUTURADAS ELETROFIADAS 185

APLICAÇÃO DE UM BIOSSENSOR DE DNA EM CAMADA AUTOMONTADA PARA A IDENTIFICAÇÃO DE TIPOS ONCOGÊNICOS DE HPV EM AMOSTRAS DE cDNA 190

IMOBILIZAÇÃO DE PROTEASES EM NANOPARTICULAS: UMA BREVE REVISÃO 196

TERAPÊUTICA À BASE DE GELATINA: UMA MINI-REVISÃO 204

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS DE NÚCLEO LIPÍDICO CONTENDO FÁRMACO IMUNOSSUPRESSOR 210

CONSTRUÇÃO DE UMA NOVA PLATAFORMA NANOESTRUTURADA BASEADA EM NANOFITAS DE GRAFENO PARA DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DO HPV 16 EM CONCENTRAÇÃO ATOMOLAR 215

DESENVOLVIMENTO DE NANOBLENDAS ELETROFIADAS BASEADAS EM CELULOSE BACTERIANA CONTENDO *ALOE VERA* PARA O TRATAMENTO DE LESÕES CUTÂNEAS 222

GENOSSENSOR NANOESTRUTURADO PARA DETECÇÃO IMPEDIMÉTRICA DE *Leishmania chagasi* 229

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS METAL-ORGÂNICAS MEDIADORAS DA TERAPIA FOTOTÉRMICA 236

PLATAFORMA FLEXÍVEL NANOESTRUTURADA BASEADA EM POLÍMERO CONDUTOR CONJUGADO COM NANOPARTÍCULAS METÁLICAS PARA A DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO 242

NANOTECNOLOGIA: UMA ALTERNATIVA PROMISSORA PARA O 250
TRATAMENTO DA OSTEOARTRITE

PLATAFORMA IMPEDIMÉTRICA BASEADA EM NANOPARTÍCULAS DE 258
OURO E LECTINA PARA BIODETECCÃO DE FETUÍNA

DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA A 263
IDENTIFICAÇÃO DE MICOTOXINAS A PARTIR DO USO DE
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO E ANTI-AFLATOXINA

QUITOSANA E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS NO SEGMENTO 270
TERAPÊUTICO: UMA MINI-REVISÃO

NANOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO BASEADO EM NANOPARTÍCULAS DE 277
DIÓXIDO DE TITÂNIO E CLAVANINA-MO PARA DIAGNÓSTICO DE
CANDIDA SP.

USO DE NANOESTRUTURAS DE $Fe_3O_4@QUITOSANA$ E CONCANAVALINA 284
A PARA A DETECCÃO IMPEDIMÉTRICA DE *CANDIDA SPP.*

GENOSSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM POLITIOFENO PARA 292
DETECCÃO DE DIFERENTES SUBTIPOS DO PAPILOMA VÍRUS HUMANO

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS METAL-ORGÂNICAS PARA 299
APLICAÇÃO NANOTERANÓSTICA

EXTRAÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE TERAPÊUTICO A PARTIR DE 304
TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

GENOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DIAGNÓSTICO DA 308
LEISHMANIOSE UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE OURO

APLICAÇÃO DA NANOTECNOLOGIA EM BIOSSENSORES PARA 315
DETECCÃO DE AFLATOXINA B1

PLATAFORMA BIOSSENSORA ELETROQUÍMICA BASEADA NO PEPTÍDEO 323
ANTIMICROBIANO TEMPORINA-PTA PARA DETECCÃO DE
MICROORGANISMOS DE INTERESSE CLÍNICO

INFLUÊNCIA DE ÍONS METÁLICOS SOBRE A ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA 330
DE PROTEASES EXTRAÍDAS DE SEMENTES DE *GLIRICIDIA SEPIUM*

PURIFICAÇÃO DE PROTEASES EXTRAÍDAS DE TILÁPIA-DO-NILO 337
(*Oreochromis niloticus*) DE INTERESSE BIOMÉDICO E FARMACÊUTICO:
APLICAÇÃO DA PARTIÇÃO TRIFÁSICA

DETECÇÃO IMPEDIMÉTRICA DE MICRORGANISMOS BASEADA EM 344
NANOTUBOS DE CARBONO E TEMPORINA PTA

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR PARA DETECÇÃO IMPEDIMÉTRICA 351
DE DENGUE BASEADO EM CAMPO MAGNÉTICO

MEMBRANAS NANOESTRUTURADAS HIERARQUICAMENTE PARA 359
PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS DE ZIKAV

CONTROLE DE QUALIDADE E INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

AVALIAÇÃO DA REPRODUTIBILIDADE FÍSICO-QUÍMICA LOTE A LOTE EM 367
COMPRIMIDOS DE HIDROCLOROTIAZIDA GENÉRICOS

DESENVOLVIMENTO DE GEL-CREME FOTOPROTETOR COM AÇÃO 372
REPELENTE

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE NA FASE PRÉ-ANALÍTICA EM UM 381
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA CLÍNICA EM RECIFE –PERNAMBUCO

DESENVOLVIMENTO E IMPLEMENTAÇÃO DE MÉTODOS *IN SILICO*

AVALIAÇÃO *IN SILICO* DO POTENCIAL ANTIVIRAL DE UM COMPOSTO 391
ACRIDÍNICO PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÕES POR SARS-COV 2

AVALIAÇÃO *IN SILICO* E CITOTOXICIDADE DE DERIVADOS 398
TIAZOLIDÍNICOS COM POTENCIAL AGONISTA DE PPAR- γ

GESTÃO, ECONOMIA E SAÚDE

REVISÃO SISTEMÁTICA DE ESTUDOS DE AVALIAÇÃO ECONÔMICA DO 403
IMPLANTE DA VALVA AÓTICA TRANSCATETER NO TRATAMENTO DA
ESTENOSE AÓRTICA GRAVE

EXPOSIÇÃO À LUZ DO SOL COMO FATOR PROTETOR PARA COVID-19: 413
APLICAÇÕES DO MODELO DE PAINEL ESPACIAL DINÂMICO

REVISÃO SISTEMÁTICA SOBRE O USO DO ETEPLIRSEN NA TERAPÊUTICA DA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE 421

PANORAMA DO EXAME PREVENTIVO DE CÂNCER DE COLO DE ÚTERO NO ESTADO DE PERNAMBUCO 429

MICROBIOLOGIA CLÍNICA

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PREPARAÇÕES DE *Moringa oleifera* Lam: UMA REVISÃO 434

ANÁLISE DAS DISPENSAÇÕES DE ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÂMICOS PARA PACIENTES DA URGÊNCIA E INTERNADOS EM UM HOSPITAL DE TERESINA-PI 440

ESTUDO REVISIONAL SOBRE O APERFEIÇOAMENTO DE MÉTODOS EMPREGADOS PARA A DIFERENCIAÇÃO DA *ENTAMOEBIA HISTOLYTICA* E *ENTAMOEBIA DISPAR* 447

NUTRIÇÃO E SAÚDE

APLICAÇÃO DE “SEMÁFORO NUTRICIONAL” PARA AVALIAÇÃO DE ALIMENTOS INDUSTRIALIZADOS VOLTADOS AO PÚBLICO INFANTIL 453

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DE ALIMENTOS PARA CONTROLE DE PESO (TIPO SHAKE) FRENTE AS LEGISLAÇÕES ATUAIS 461

DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA AVALIAR OS EFEITOS DO DESMAME PRECOCE 469

RELAÇÃO ENTRE O ALEITAMENTO MATERNO E A PREVENÇÃO DE DOENÇAS 473

ATIVAÇÃO DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA NO RIM DE RATOS ADULTOS SUBMETIDOS À RESTRIÇÃO DIETÉTICA MATERNA NA GESTAÇÃO 477

POTENCIAL TOXICOLÓGICO DO ÁCIDO OXÁLICO ORIUNDO DA DIETA 481

PAPEL DA GRELINA NO ESTÔMAGO DA PROLE DE RATOS SUBMETIDOS AO DESMAME PRECOCE: UM REVISÃO DE LITERATURA 486

PESQUISA CLÍNICA E PRÉ-CLÍNICA

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DA GALECTINA 7 EM PACIENTES 492
COM MIELOMA MÚLTIPLO E SUA CORRELAÇÃO COM DADOS CLÍNICOS
DA DOENÇA

ASPECTOS MOLECULARES DA TROMBOSE EM PACIENTES COM COVID- 497
19: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES STRESSES 504
MICROAMBIENTAIS NA MIGRAÇÃO DA LINHAGEM DE CÂNCER DE
MAMA MDA-MB-231

AVALIAÇÃO DAS MOLÉCULAS NITROAROMÁTICAS EM MODELOS 508
CELULARES DE NEOPLASIAS PANCREÁTICAS

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS CIRCULANTES DA GALECTINA-4 NO 512
DIAGNÓSTICO DO CÂNCER GÁSTRICO

DERIVADO TIAZOLIDÍNICO MODULA PRODUÇÃO DE IL-10 E IL-13 EM 516
PBMC DE PACIENTES COM ESCLEROSE SISTÊMICA

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DA GALECTINA-12 EM NEOPLASIAS 523
HEPATO-PANCREATO-BILIARES

COMPOSTOS A BASE DE GÁLIO NO DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DE 529
INFECÇÕES FÚNGICAS

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DE NOVAS MOLÉCULAS 535
ATIVADAS POR HIPÓXIA COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA PARA O
CÂNCER PANCREÁTICO.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTEORA DO EXTRATO 539
HEXÂNICO DE *Croton heliotropifolius* kunth

PROTAGONISMO DAS GALECTINAS NO PROCESSO DE PROMOÇÃO DE 544
NEOPLASIAS: REVISÃO INTEGRATIVA

TRANSMISSÃO VERTICAL DE SARS-CoV-2: DETECÇÃO VIRAL E 552
RESPOSTA IMUNE FETAL

POLÍTICAS PÚBLICAS EM SAÚDE

SUBNOTIFICAÇÃO DE CASOS DE DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA NA PANDEMIA DA COVID-19: UMA REVISÃO 557

PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL

IMIDAZOLIDINAS COM POTENCIAL ANTICÂNCER: UMA ABORDAGEM SOBRE OS POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO 562

AVALIAÇÃO *IN SILICO* DA FARMACOCINÉTICA E TOXICOLOGIA DO NOVO AGONISTA PPAR- γ LPSF/JB-12 570

SÍNTESE E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTI *T. cruzi* DE NOVAS 1,2,4-OXADIAZOLINAS DI-ARILADAS 574

SÍNTESE DE HÍBRIDOS ISOXAZOLINA/TIAZOL COM POTENCIAIS ATIVIDADES ANTICÂNCER E LEISHMANICIDA 578

BIOATIVIDADES TERAPÊUTICAS DOS CAROTENOIDES DE FONTES MARINHAS: UMA BREVE REVISÃO 582

PERFIL DESCRICIONAL DE LECTINAS DE RELEVANTE INTERESSE BIOLÓGICO A PARTIR DA ESPÉCIE *Microgramma vacciniifolia* 589

AÇÃO ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum vulgare*: UMA REVISÃO DE LITERATURA 595

SÍNTESE E AVALIAÇÃO *IN SILICO* DE HÍBRIDO ACRIDÍNICO-TIAZOL FRENTE À PROTEASE TIPO 3C DO SARS-COV-2 599

PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO CAROTENOIDES POR *Rhodotorula glutinis* URM6692 E SEU POTENCIAL NUTRACÊUTICO 605

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UM NOVO CANDIDATO ANTI-ZIKA LPSF/ZKC-4 POR MEIO DE CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS 611

SISTEMAS DE INOVAÇÃO EM SAÚDE

MAPEAMENTO DO CENÁRIO DE MÁSCARAS FACIAIS PARA O ENFRENTAMENTO DA COVID-19: UMA REVISÃO DE PATENTES 616

TERAPIAS EM SAÚDE

- FLORETINA NA QUIMIOPREVENÇÃO E QUIMIOTERAPIA DO MELANOMA: REVISÃO DA LITERATURA 622
- ESTRATÉGIAS PARA O ENFRENTAMENTO DA COVID-19: UMA OVERVIEW DE PATENTES SOBRE DIFERENTES TRATAMENTOS 629
- ABORDAGEM TERAPÊUTICA FRENTE AO *Staphylococcus aureus* RESISTENTE À METICILINA 634
- ATUAÇÃO DO FISIOTERAPEUTA NA ASSISTÊNCIA EM PACIENTES QUE POSSUEM DOENÇAS CARDIOVASCULARES E CONTRAÍRAM A COVID-19 642
- PRÁTICAS INTEGRATIVAS E COMPLEMENTARES DURANTE A PANDEMIA DA COVID-19: DESAFIOS PARA A CONTINUIDADE DOS CUIDADOS COM A SAÚDE ATRAVÉS DE PLATAFORMAS DIGITAIS 646
- USOS TERAPÊUTICOS DA IMUNOGLOBULINA INTRAVENOSA NO TRATAMENTO DA COVID-19 653
- IMUNOTERAPIA À BASE DE ANTICORPOS MONOCLONAIS PARA TRATAMENTO DE NEOPLASIA PULMONAR 657
- USO INDISCRIMINADO DE PSICOTRÓPICOS PELOS PROFISSIONAIS DA SAÚDE 665
- POLIMORFISMOS GENÉTICOS NO CONTEXTO DA COVID-19 670
- ALTERNATIVAS PROMISSORAS DE VACINAS NA PREVENÇÃO DO COVID-19 677

VIGILÂNCIA E EPIDEMIOLOGIA EM SAÚDE

- ISOLAMENTO SOCIAL E A VIOLÊNCIA DOMÉSTICA: FICAR EM CASA É MAIS (IN)SEGURO? UMA REVISÃO DA LITERATURA CIENTÍFICA E PUBLICAÇÕES DA IMPRENSA NO CENÁRIO MUNDIAL 685
- ALTERAÇÕES PSIQUIÁTRICAS CAUSADAS PELA COVID-19: UMA REVISÃO INTEGRATIVA 693

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E EPIDEMIOLÓGICAS DE PACIENTES COM COVID-19 EM PERNAMBUCO 700

COINFECÇÃO TUBERCULOSE-HIV EM PERNAMBUCO: PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE 2015 A 2019 706

ESTUDOS E ENSAIOS CLÍNICOS SOBRE CLOROQUINA, IVERMECTINA E AZITROMICINA NO TRATAMENTO DA COVID-19 711

ANÁLISE TEMPORAL DA EVOLUÇÃO DE NOTIFICAÇÕES DE HEPATITES VIRAIS NO BRASIL 718

INDICADORES DE INTOXICAÇÕES POR MEDICAMENTOS: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS DOS CASOS NOTIFICADOS NA CIDADE DE TERESINA-PI 724

MONITORAMENTO DO PERFIL DE PROFILAXIA PÓS-EXPOSIÇÃO (PEP) - HIV NO BRASIL 732

PANORAMA ATUAL DA SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (AIDS) NO BRASIL: ESTUDO DO PERFIL EPIDEMIOLÓGICO E NOVAS TENDÊNCIAS NA TERAPIA ANTIRRETROVIRAL 738

RELAÇÃO ENTRE O SISTEMA DE RECOMPENSA E A DEPENDÊNCIA QUÍMICA: UMA REVISÃO DE LITERATURA 746

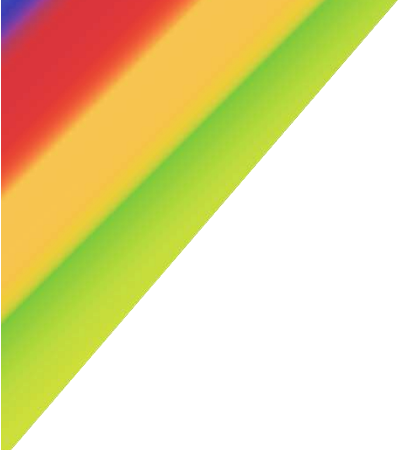
EPIDEMIOLOGIA, INDICADORES E MEDIDAS DE PREVENÇÃO DA FEBRE AMARELA EM HUMANOS 755

SÍFILIS CONGÊNITA NA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE (PERNAMBUCO-BRASIL): ANÁLISE DO PERFIL EPIDEMIOLÓGICO ENTRE OS ANOS DE 2014 A 2019 761

INDICADORES DAS NOTIFICAÇÕES POR TUBERCULOSE: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS DOS CASOS NO BRASIL 768

ARTRITE REUMATOIDE E COVID-19: IMPACTOS DO NOVO CORONAVÍRUS EM PACIENTES REUMATOLÓGICOS – UMA REVISÃO DE LITERATURA 775

COVID-19 E A CRESCENTE CORRENTE ANTIVACINA: OS DESAFIOS DA IMUNIZAÇÃO NO BRASIL 781



ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA



ÁREA DE SUBMISSÃO: Assistência Farmacêutica

A IMPORTÂNCIA DA ORIENTAÇÃO FARMACÊUTICA SOBRE O USO DE AZITROMICINA NO TRATAMENTO DE COVID-19

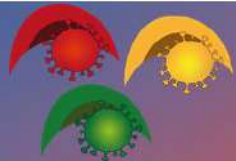
B. C. DA CONCEIÇÃO¹, P. C. B. R. OLIVEIRA¹, A. G. N. C. MELLO²

¹ Graduanda de Farmácia, Faculdade Integrada Brasil Amazônia (FIBRA);

² Doutora em Inovação Farmacêutica, Faculdade Integrada Brasil Amazônia (FIBRA).

E-mail para contato: breuscsta@gmail.com

RESUMO – Introdução: Diante da situação atual, o mundo enfrenta uma das maiores pandemias já vivenciadas, entre os profissionais expostos estão: médicos, dentistas, enfermeiros e dentre tantos outros encontra-se o profissional farmacêutico que, em conjunto multidisciplinar, operam no combate ao SARS-CoV-2, conhecido como o novo coronavírus. Trabalhando não somente em hospitais na prestação dos serviços de saúde, mas também na busca para solucionar de maneira mais breve e eficaz os efeitos causados a saúde por meio de vacinas ou de tratamentos. Um dos tratamentos mais utilizados nos últimos meses é a Azitromicina, um antibiótico da subclasse dos macrolídeos que age impedindo que as bactérias produzam proteínas essenciais ao crescimento e reprodução. Desse modo, sendo este medicamento um dos mais comercializados durante este período, é sabido que trará aos usuários não apenas aos possíveis efeitos benéficos, como também aos possíveis problemas relacionados ao medicamento. **Objetivo:** Orientar sobre os riscos do uso inadequado da Azitromicina. **Metodologia:** Trata-se de um trabalho de revisão bibliográfica com pesquisas feitas em periódicos como: SciELO, PubMed e Ministério da saúde. Foram consultadas produções científicas escritas na língua portuguesa e inglesa, com os seguintes descritores: Azitromicina, Assistência Farmacêutica, COVID-19, Problemas relacionados a medicamentos (PRM) e SARS-CoV-2. **Resultados:** Estudos in vitro e clínicos identificaram um potencial antiviral presente na azitromicina, porém não identificado especificamente por qual mecanismo diminuiria a carga viral de pacientes acometidos pelo SARS-CoV-2. Contudo, sabe-se que este medicamento possui atividade antibacteriana e anti-inflamatória, sendo ações importantes para o tratamento de alguns dos sintomas, como a inibição da fase aguda inflamatória e o tratamento de infecções bacterianas secundárias. Os efeitos provocados pela pandemia no Brasil e no mundo refletem uma elevação em pesquisas científicas e em buscas de medicamentos que solucionem ou tratem os sintomas mais graves da doença, o que pode, em alguns casos, levar a automedicação ou ao uso incorreto de medicamentos. Assim, as hipóteses de tratamento além de serem soluções provisórias resultam a diversos fatores que podem ser prejudiciais à saúde das pessoas que os utilizam. **Conclusão:** A orientação adequada sobre o uso de azitromicina e de outros fármacos é uma das principais ações preventivas para diminuir o uso desnecessário ou incorreto de tais medicamentos evitando, assim, o desencadeamento de situações que venham comprometer a saúde dos pacientes. Desse modo, o profissional farmacêutico apresenta uma enorme importância no combate à desinformação e veiculação de informações falsas, principalmente, no que tange o atual cenário



caótico de saúde.

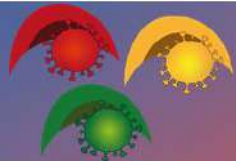
Palavras-chave: Azitromicina, COVID-19, Assistência Farmacêutica, Problemas relacionados a medicamentos (PRM).

ABSTRACT – Introduction: *In view of the current situation, the world faces one of the greatest pandemics ever experienced, among the professionals exposed are: doctors, dentists, nurses and among many others, there is the pharmaceutical professional who, in a multidisciplinary group, operate in the fight against SARS-CoV-2, known as the new coronavirus. Working not only in hospitals in the provision of health services, but also in the quest to solve health effects more quickly and effectively through vaccines or treatments. One of the most used treatments in recent months is Azithromycin, an antibiotic in the macrolide subclass that works by preventing bacteria from producing proteins essential for growth and reproduction. Thus, since this medicine is one of the most commercialized during this period, it is known that it will bring users not only the possible beneficial effects, but also the possible problems related to the medicine. **Objective** Advise on the risks of inappropriate use of Azithromycin. **Methodology:** This is a bibliographic review with research done in journals such as: SciELO, PubMed and Ministry of Health. Scientific productions written in Portuguese and English were consulted, with the following descriptors: Azithromycin, COVID-19, Pharmaceutical Services, Drug-related Side Effects and Adverse Reactions. **Results:** In vitro and clinical studies have identified an antiviral potential present in azithromycin, but not specifically identified by which mechanism would decrease the viral load of patients affected by SARS-CoV-2. However, it is known that this medication has antibacterial and anti-inflammatory activity, being important actions for the treatment of some of the symptoms, such as the inhibition of the acute inflammatory phase and the treatment of secondary bacterial infections. The effects caused by the pandemic in Brazil and in the world reflect an increase in scientific research and in searches for medicines that solve or treat the most serious symptoms of the disease, which can, in some cases, lead to self-medication or the incorrect use of medicines. Thus, the hypotheses of treatment, in addition to being temporary solutions, result to several factors that can be harmful to the health of the people who use them. **Conclusion:** Adequate guidance on the use of azithromycin and other drugs is one of the main preventive actions to reduce the unnecessary or incorrect use of such drugs, thus avoiding the onset of situations that may compromise the health of patients. In this way, the pharmaceutical professional is extremely important in combating misinformation and the transmission of false information, especially with regard to the current chaotic health scenario.*

Keywords: Azithromycin, COVID-19, Pharmaceutical Services, Drug-related Side Effects and Adverse Reactions.

1. INTRODUÇÃO

No final de 2019, foi notificada à Organização Mundial da Saúde (OMS) a ocorrência de um surto de pneumonia na cidade de Wuhan, província de Hubei, República Popular da China. A partir disso, identificou-se o agente etiológico, um novo Coronavírus: SARS-CoV-2 (Síndrome Respiratória Aguda Grave de Coronavírus 2) (ZHU et al., 2020). Atualmente, o mundo está vivendo uma nova era causada pelo novo vírus, declarada pela OMS em 30 de janeiro de 2020 como uma Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII) e em 11 de março



de 2020 a COVID-19, doença causada pelo Coronavírus, foi apresentada como uma pandemia (PAHO, 2020).

Segundo informações disponibilizadas no site da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), em conjunto com a OMS, foram confirmados no mundo 12.102.328 casos de Covid-19 e 551.046 mortes até o dia 10 de julho de 2020. O Brasil confirmou 1.864.681 casos e 72.100 mortes até o dia 12 de julho de 2020, apresentando, no país, uma letalidade de 3,9% e uma mortalidade de 34,3% (BRASIL, 2020b).

A maior preocupação pelos órgãos de saúde é que não haja medicamento específico para o tratamento ou prevenção da doença (OLIVEIRA, 2020). A estratégia terapêutica utilizada consiste basicamente em controlar os sintomas através de cuidados paliativos (HARRISON, 2020). Um dos medicamentos mais utilizados é a Azitromicina, um antibiótico da subclasse dos macrolídeos que possui atividade bacteriostática e age impedindo a produção de proteínas essenciais para o crescimento e reprodução das bactérias (BRASIL, 2013). É utilizado no tratamento de infecções bacterianas respiratórias como bronquite e pneumonia (EMS, 2020). De acordo com o estudo de DAMLE et al. (2020), a mesma pode desempenhar um papel terapêutico potencial em infecções virais respiratórias incluindo SARS-CoV-2.

Contudo, devido a sua grande relevância e comercialização, muitos usuários acabam se expondo não apenas aos possíveis efeitos benéficos como maléficos relacionados ao fármaco (PRM). Segundo o Comitê de Consenso (2002), PRM é definido como “problemas de saúde entendidos como resultados clínicos negativos derivados da farmacoterapia que, produzidos por diversas causas, conduzem ao não alcance dos objetivos terapêuticos ou ao surgimento de efeitos não desejados”. Esses problemas incluem a administração incorreta do medicamento, características pessoais, conservação inadequada, contraindicação, dose, frequência ou duração inadequada, duplicidade, erro de dispensação, não adesão à terapia, interações, entre outros (CORRER; OTUKI, 2013).

Diante a situação atual, o mundo enfrenta uma das maiores pandemias já vivenciadas, entre os profissionais expostos estão: médicos, dentistas, enfermeiros e dentre tantos outros se encontra o profissional farmacêutico que, em conjunto multidisciplinar, operam no combate ao COVID-19. Trabalhando não somente em hospitais na função direta de prestação de serviço promovendo a assistência farmacêutica adequada, orientando e prevenindo os PRMs visando à segurança do paciente e a eficácia terapêutica (BRASIL, 2001), mas também na busca para solucionar de maneira mais breve e eficaz os efeitos causados a saúde por meio de vacinas ou de tratamentos. Desse modo, o presente estudo teve como objetivo orientar sobre os riscos do uso inadequado da Azitromicina.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um trabalho de revisão bibliográfica com pesquisas feitas em periódicos como: Scientific Electronic Library OnLine (SciELO), PubMed, Ministério da saúde e Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). Foram utilizados para a busca dos artigos os seguintes descritores: Azitromicina, Assistência Farmacêutica, COVID-19, Problemas relacionados a medicamentos (PRM) e seus correspondentes em inglês: Azithromycin, COVID-19, Pharmaceutical Services, Drug-related Side Effects and Adverse Reactions. Considerados artigos publicados entre 2001 e 2020, seguindo como critérios de inclusão estudos qualitativos e quantitativos que contivessem informações, como: origens e evolução da doença, os tratamentos farmacológicos utilizados, o papel do farmacêutico frente a orientação terapêutica, além de artigos publicados na língua portuguesa e inglesa e como critério de exclusão os artigos que não aborassem os aspectos farmacológicos da Azitromicina e estudos realizados com a Azitromicina associada a



Hidroxicloroquina. Foram encontrados vinte artigos, após aplicados os critérios de inclusão e exclusão mencionados anteriormente, foram selecionados quinze artigos, dos quais foram considerados para síntese do presente trabalho.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sabe-se que a Azitromicina é um antibiótico com ação bacteriostática que impede a multiplicação bacteriana e atua em amplo espectro. O mecanismo de ação antibacteriano é conhecido e definido a partir da ligação do fármaco ao RNA ribossômico da subunidade 50S dos microrganismos responsáveis pela produção de proteína que, após a ligação, ocorre à inibição da síntese impedindo a replicação das bactérias (KATZUNG, 2017).

De outro modo, um estudo foi realizado analisando o potencial antiviral presente na Azitromicina, tanto *in vitro* quanto clínico, em que a importância da pesquisa está na coleta de evidências que comprovem o uso antiviral desse medicamento. Esse papel de atividade antiviral ainda não está inteiramente conhecido, porém, de maneira hipotética, elevaria o pH no endossomo e lisossomo das células e diminuiria a replicação viral. Contudo, o uso contra o novo vírus não se detém apenas na hipótese de ação antiviral, mas em atividades anti-inflamatória e antibacteriana que podem ser desempenhadas no tratamento de alguns sintomas de pacientes acometidos pelo SARS-CoV-2 (DAMLE et al., 2020).

Os sintomas podem variar entre resfriados simples, problemas respiratórios leves, tosse seca, dispnéia, dor de garganta, náuseas ou vômitos e febre persistente (LIMA, 2020), dentre os sintomas. Em casos agravados como pneumonia, bronquite e outras infecções bacterianas associadas ao quadro clínico do paciente, são utilizados antibióticos na terapêutica, entre eles a Azitromicina (BRASIL, 2020a).

O farmacêutico, sendo o profissional responsável pela orientação adequada e prestação de serviços a sociedade, atua diretamente na promoção do uso racional de medicamento, no combate a desinformação e a propagação de informações errôneas (VIEIRA, 2007). As principais informações que devem ser consideradas e enfatizadas neste período de pandemia e uso de diversos tratamentos, são as possibilidades de reações adversas e as possíveis interações medicamentosas, neste caso, as informações principais da Azitromicina estão demonstradas respectivamente nas tabelas 1 e 2, a seguir.

Tabela 1 – Efeitos adversos provocados pela Azitromicina

ORIGENS	EFEITOS
GASTRINTESTINAL	Anorexia; náuseas; vômito/diarreia; dispepsia; desconforto abdominal; constipação; flatulência; fezes amolecidas; colite.
AUDITIVA	Perda de audição; surdez e/ou tinido.
RENALIS	Nefrite intersticial e disfunção renal aguda.
HEPÁTICAS	Hepatite; icterícia colestática; em casos raros insuficiência hepática.
CARDÍACAS	Palpitações e arritmias; taquicardia ventricular.

Fonte: EMS, 2020.



Tabela 2 – Principais interações medicamentosas da Azitromicina

MEDICAMENTOS	REAÇÕES
DIGOXINA	Possibilidade de afetar o metabolismo da digoxina em alguns pacientes; em casos de uso concomitante com azitromicina, há possibilidade de aumento dos níveis cardiotônico.
ANTIÁCIDOS	Redução do pico de concentração plasmática do antibiótico.
ZIDOVUDINA	Aumento das concentrações do metabólito ativo zidovudina fosforilada ao administrar Azitromicina concomitantemente.
VARFARINA	Não há alteração do efeito anticoagulante da varfarina, porém é necessário monitorar o tempo de protrombina se houver administração concomitante.
CARBAMAZEPINA	Não há evidências de alterações no uso concomitante, porém, é importante o monitoramento nestes casos.

Fonte: EMS, 2020.

4. CONCLUSÃO

Logo, levando em consideração o momento atual, é indispensável o papel do farmacêutico no que diz respeito à orientação do uso adequado de medicamentos, na pesquisa e busca por opções de tratamentos em que muitos fármacos estão sendo utilizados como possíveis terapias para o combate da Covid-19. Um desses é a Azitromicina, no qual o profissional farmacêutico deve informar e orientar à população sobre os riscos da automedicação, o uso incorreto e possíveis problemas relacionados com o mesmo como as reações adversas, as interações medicamentosas e a resistência bacteriana os quais podem contribuir para a piora do quadro clínico e o mascaramento de possíveis problemas secundários.

5. REFERÊNCIAS

AZITROMICINA. Responsável técnico Dio, Ronoel Caza. São Paulo: EMS, 2020. Bula de Remédio.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Gerência Técnica de Assistência Farmacêutica. **Assistência Farmacêutica: instruções técnicas para a sua organização**. Série A. Normas e Manuais Técnicos, 1.ed. Ministério da Saúde, Brasília, 2001, 114p.

BRASIL, Ministério da Saúde. Nota Técnica N°243/2013. Brasília, DF, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Diretrizes para diagnóstico e tratamento da COVID-19**. Brasília, DF: [Ministério da Saúde], 2020a. Disponível em: <https://portaldeboaspraticas.iff.fiocruz.br/atencao-mulher/diretrizes-para-diagnostico-e-tratamento-da-covid-19-ms/>.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Painel Coronavírus**. Brasília, DF: [Ministério da Saúde], 2020. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br/>. Acesso em: 13 de julho de 2020b.



COMITÉ DE CONSENSO. Segundo consenso de Granada sobre problemas relacionados com medicamentos. *Ars Pharm.*, v.43, n.3-4, p.175-184, 2002.

CORRER, Cassyano J.; OTUKI, Michel F. **A prática farmacêutica na farmácia comunitária**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

DAMLE, B.; VOURVAHIS, M.; WANG, E.; LEANEY, J., CORRIGAN, B. Clinical Pharmacology Perspectives on the Antiviral Activity of Azithromycin and use in COVID-19. *Clinical pharmacology & therapeutics*, volume 0, nº 0, 17 de abril de 2020.

HARRISON, C. Coronavirus Puts Drug Repurposing on the Fast Track. *Nat Biotechnol* 2020; 38:379-81.

KATZUNG, Bertram G. – **Farmacologia básica e clínica**. 13. ed. Porto Alegre: AMGH Editora, 2017.

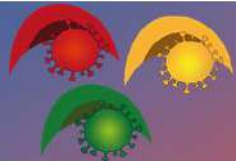
LIMA, Cláudio Márcio Amaral de Oliveira. **Informações sobre o novo coronavírus (COVID-19)**. *Radiol Bras*, vol. 53, n 2, São Paulo, 2020.

OLIVEIRA, E. H. A. Coronavírus: prospecção científica e tecnológica dos fármacos em estudo para tratamento da Covid-19. *Cadernos de Prospecção*, Salvador, v. 13, n. 2, Edição Especial, p. 412-423, abril, 2020.

OPAS – **ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE**. Folha informativa - COVID-19 (doença causada pelo novo Coronavírus), 2020. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=6101:covid19&Itemid=875. Acesso em: 13 julho de 2020.

VIEIRA, Fabiola Supino. Possibilidades de contribuição do farmacêutico para a promoção da saúde. *Cienc & Saúde Coletiva*, vol. 12, n. 1, Rio de Janeiro, 2007.

ZHU, N.; ZHANG, D.; WANG, W.; LI, X.; YANG, B.; SONG, J, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 Feb [cited 2020 Jul 13]; 382:727-33. Available from: Available from: <http://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Assistência Farmacêutica

ARMAZENAMENTO DE MEDICAMENTOS NA CENTRAL DE ABASTECIMENTO FARMACÊUTICO (CAF) DE UM MUNICÍPIO DO PIAUÍ, BRASIL

. E.C.HOLANDA¹; E. P.FONTENELE¹ e S. M. de ANDRADE²

¹ Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia;

² Centro Universitário Santo Agostinho, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia.

E-mail para contato: holandap2@outlook.com

RESUMO - *Introdução: O armazenamento adequado e a preservação de medicamentos são fatores fundamentais para sua eficácia. A vasta oferta de medicamentos, a falta da atenção farmacêutica referente ao modo de armazenamento dos mesmos e a má conservação podem afetar as características do fármaco e o pode trazer riscos à saúde de pacientes nos hospitais. Diante deste cenário, foi elaborado um estudo, com o objetivo de avaliar o processo de armazenamento de medicamentos na Central de Abastecimento Farmacêutico em um município do Piauí- Brasil. Metodologia: Trata-se de um estudo transversal, de caráter descritivo-exploratório, desenvolvido no mês de junho de 2020. A coleta de dados se deu por meio da aplicação de roteiro de inspeção, elaborado com base nas Boas Práticas para Estocagem de Medicamentos e nos requisitos de armazenamento preconizados pela RDC nº 44/09, da Anvisa. Resultado e Discussão: Dos 16 itens avaliados, 63% apresentaram não conformidade. Itens como a não existência de procedimentos escritos sobre armazenamento, falta de instalações elétricas em adequado estado de segurança e piso, paredes e teto em adequadas condições de conservação. Também ausência de iluminação adequada, de medicamentos protegidos da ação direta da luz solar e controle da umidade e temperatura ambiente. O sistema de armazenamento da Central de Abastecimento Farmacêutico do município em estudo, necessita ser otimizado em diversos pontos, visando ao fortalecimento do ciclo da assistência farmacêutica. Conclusão: Os resultados revelam a precariedade em que se encontram esta unidade e, conseqüentemente, o que pressupõe a necessidade de atuação mais intensa por parte de gestores e da vigilância sanitária.*

Palavras-chave: Farmácia hospitalar, Assistência farmacêutica, Armazenamento de medicamentos, Farmacovigilância.

ABSTRACT - *Introduction: Adequate storage and preservation of medicines are fundamental factors for their effectiveness. The vast supply of medications, the lack of pharmaceutical attention regarding the way they are stored and their poor conservation can affect the characteristics of the drug and can bring risks to the health of patients in hospitals. The objective of evaluating the drug*



storage process at the Central de Abastecimento Farmacêutico in a municipality in Piauí-Brazil. Methodology: This is a cross-sectional, descriptive-exploratory study, carried out in June 2020. The data collection took place through the application of an inspection script, prepared based on Good Practices for Stocking Medicines and in the storage requirements recommended by RDC nº 44/09, of Anvisa. Result and Discussion: Of the 16 items evaluated, 63% showed non-compliance. Items such as the lack of written procedures on storage, lack of electrical installations in an adequate state of security and floor, walls and ceiling in adequate conservation conditions. In addition, lack of adequate lighting, medicines protected from direct sunlight and control of humidity and ambient temperature. The storage system of the Pharmaceutical Supply Center of the municipality under study needs be optimized in several points, aiming at strengthening the pharmaceutical assistance cycle. Conclusion: The results reveal the precariousness where this unit is located and, consequently, what presupposes the need for more intense action on the part of managers and health surveillance.

Keywords: Hospital pharmacy, Pharmaceutical assistance, Drug storage, Pharmacovigilance.

1. INTRODUÇÃO

A assistência farmacêutica é parte indispensável nos processos de atenção à saúde em todos os níveis de complexidade, especialmente no âmbito hospitalar. Assim torna-se essencial que as atividades do serviço de farmácia sejam executadas de forma que garantam efetividade e segurança no processo de utilização dos medicamentos, valorizando resultados clínicos e econômicos (SILVA, 2015). Fato que o farmacêutico é o responsável legal por todo o fluxo do medicamento dentro da unidade hospitalar. Assim, as atividades de logística neste local englobam a armazenagem de materiais médico-hospitalares, medicamentos e outros materiais. Além disso, inclui também a elaboração de normas e controles que garantam a sistemática da distribuição (CRF-SP, 2010). Desse modo, a Portaria GM Nº 3.916/98, determina a Política Nacional de Medicamentos, instrumento que passa a orientar as ações no campo dos medicamentos, com o propósito principal de garantir a necessária eficácia de fármacos (BRASIL,1998).

Entretanto, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu como seu grande desafio para a próxima década a melhoria na racionalidade do uso de medicamentos, havendo uma necessidade de promover a avaliação desse uso e supervisionar o seu consumo (SILVA; GERON,2018). Os medicamentos devem ser dispensados de acordo com a garantia de adequadas condições de transporte, rastreabilidade do produto e a preservação da identificação até o consumidor final. Fato que a segurança de um fármaco inicia com o balanço de seu inerente potencial de risco, sendo atribuída corretas prescrições, dispensação, aquisição, administração, armazenamento e termina com a adesão do paciente ao tratamento (BALK et al.,2015). Dessa forma, é possível evitar internações desnecessárias, melhorar a equidade, diminuir o uso de medicamentos e, conseqüentemente, facilitar o controle público sobre o sistema e oferecer mais satisfação aos usuários. Embora o medicamento seja o recurso terapêutico com melhor relação custo efetividade, o uso inadequado torna-se um importante problema de saúde pública mundial, com grandes conseqüências econômicas (RIBEIRA; HEINECK,2010).

No ambiente hospitalar, a armazenagem de medicamentos compreende um conjunto de atividades de caráter técnico, administrativo e operacional que engloba procedimentos de recebimento, estocagem, segurança, conservação e controle de estoque, contemplando, desde a avaliação das instalações físicas, externas e internas, até a garantia de que o medicamento prescrito, na apresentação farmacêutica e dose correta, chegaram até o paciente. O armazenamento



inadequado pode gerar os mais variados tipos de perigos, portanto, dependendo do tipo do produto e da maneira como eles são armazenados, pode haver, desde simples prejuízos financeiros, até complicações mais graves, como morte ou intoxicação. Portanto, o armazenamento é uma atividade necessária para garantir a qualidade dos medicamentos, através da proteção contra os riscos de alterações físico-químicas e microbiológicas, incluindo recebimento de medicamentos, segurança, conservação e controle de estoque (SOUZA et al.,2011). Diante deste cenário, foi elaborado um estudo, com o objetivo de avaliar o processo de armazenamento de medicamentos na Central de Abastecimento Farmacêutico em um município do Piauí- Brasil.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo transversal, de caráter descritivo-exploratório, desenvolvido no mês de junho de 2020. Foi realizada por meio da aplicação, pelo farmacêutico lotado na CAF e acadêmicos de farmácia da Universidade Federal do Piauí, de um roteiro de inspeção, elaborado com base nas Boas Práticas para Estocagem de Medicamentos e nos requisitos de armazenamento preconizados pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 44/09, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o qual contém 16 itens (variáveis independentes), cujo resultado para cada um é sim (conforme) ou não (não conforme). Os dados da tabela foram tratados por meio de cálculo de porcentagem e apresentados em gráfico e tabela via programa Excel. No que toca os aspectos éticos, por se tratar de estudo que não envolveu seres humanos, direta ou indiretamente, foi dispensável a apreciação por Comitê de Ética.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As instituições de saúde devem ter como meta o atendimento das necessidades e expectativas de seus usuários. Para tanto, é fundamental que a infraestrutura de suas Centrais de Abastecimento Farmacêutico (CAF) sejam capazes de garantir um elevado padrão de qualidade na assistência. Cabe ressaltar que a qualidade da assistência apoia-se concretamente na avaliação de três dimensões - estrutura, processo e resultados, sendo estes fundamentais para o desempenho da organização (PERTENCE; MELLEIRO,2010). Entretanto, das dentre 16 variáveis independentes analisadas, 10 estavam não conformes no momento da coleta de dados (63%) conforme a Figura 1 e Quadro 1. Tais itens são importantes para garantir a utilização segura de medicamentos, porém não estavam presentes, por exemplo contemplar a existência de procedimentos escritos sobre armazenamento, instalações elétricas em adequado estado de segurança e uso (fios soltos, tomadas insuficientes) e piso, paredes e teto em adequadas condições de conservação. Também de iluminação adequada, medicamentos protegidos da ação direta da luz solar, controle da umidade e temperatura ambiente, medicamentos armazenados em prateleiras e afastados de piso e parede, área específica e identificada para medicamentos vencidos/avariados, destino correto aos medicamentos com prazo de validade expirado e medicamentos examinados fisicamente (integridade, prazo de validade, quantidade), quando de sua chegada.



■ Itens em conformidade ■ Itens em não conformidade

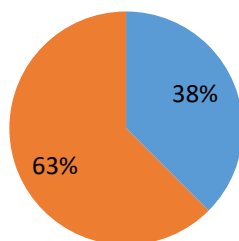


Figura 1. Distribuição dos itens do roteiro de inspeção quanto à conformidade às Boas Práticas para Estocagem de Medicamentos, na Central de Abastecimento Farmacêutico (CAF) em Teresina-Piauí, 2020.

Fonte: próprio autor, 2020

Quadro 1: Roteiro de Inspeção, elaborado com base nas Boas Práticas para Estocagem de Medicamentos, aplicado na Central de Abastecimento Farmacêutico (CAF), em Teresina, Piauí, em junho de 2020.

ITENS AVALIADOS	SIM	NÃO
(A) Existência de responsável técnico	x	
(B) Existência de procedimentos escritos sobre armazenamento de medicamentos		x
(C) Instalações elétricas em adequado estado de conservação, segurança e uso		X
(D) Existência de equipamento de segurança para combate a incêndio	X	
(E) Piso, paredes e teto em adequadas condições de conservação		X
(F) Iluminação adequada		x
(G) Medicamentos protegidos da ação direta da luz solar		X
(H) Controle de umidade e temperatura ambiente		x
(I) Medicamentos armazenados em prateleiras e afastados de piso e parede		X
(J) Todos os medicamentos apresentam número de registro, número de lote, data de fabricação e prazo de validade	X	
(K) Todos os medicamentos com prazo de validade vigente	x	
(L) Área específica e identificada para medicamentos vencidos/avariados		X
(M) Destino correto aos medicamentos com prazo de validade expirado		x
(N) Existência de local fechado para guarda de medicamentos controlados	X	
(O) Medicamentos examinados fisicamente (integridade, prazo de validade, quantidade), quando de sua chegada		x
(P) Inexistência de produtos que não medicamentos e correlatos	x	

Legenda: Sim: Conformidade; Não: Em não conformidade.

Fonte: próprio autor, 2020.



A quantidade de farmacêuticos dependerá das atividades desenvolvidas, da complexidade do cuidado, do grau de informatização e mecanização da unidade (SBRAFH, 2007). Assim, a existência do responsável técnico farmacêutico exerce papel fundamental neste contexto. A Resolução nº492 de 26 de novembro de 2008, do Conselho Federal de Farmácia (CFF) estabelece como funções do farmacêutico, em âmbito hospitalar, o cumprimento da legislação vigente no que diz respeito ao armazenamento, conservação, controle de estoque de medicamentos, produtos para a saúde, saneantes, insumos e matérias-primas, bem como as normas relacionadas com a distribuição e utilização dos mesmos (SOUZA et al., 2011). Portanto, o farmacêutico hospitalar contribuir na promoção do uso racional de medicamentos, na qualidade dos serviços prestados e na gestão das atividades de assistência farmacêutica (FONSECA, 2017).

Enquanto aos procedimentos escritos sobre armazenamento de medicamentos, para Organização Mundial de Saúde, deve-se tomar cuidado com a maneira de armazenar, pois se não forem seguidas as recomendações dos procedimentos de armazenamento, o medicamento pode tornar-se ineficaz ou trazer consequências graves a saúde do usuário. Fato que é importante que a farmácia hospitalar possa garantir a qualidade dos medicamentos, tornando o armazenamento uma das peças chave para garantir eficácia do fármaco, pois o mau acondicionamento propicia a degradação e com isso os medicamentos podem não exercerem o efeito desejado (SILVA; GERON, 2018).

No armazenamento de medicamentos é essencial a prática de estocagem em ambientes apropriados, de acordo com as suas características e condições específicas de conservação requeridas por cada medicamento conforme instruções do fabricante. Qualquer edifício que seja destinado à estocagem de medicamentos deve ter área, construção e localização bem como facilidades para manutenção, limpeza e inspeção adequadas. Deve-se precaver, também, de dispositivos de alerta que detectem sinais de defeitos nos equipamentos de refrigeração (câmaras frias e/ou equipamentos de ar condicionado) para pronta manutenção (BRAGA; VITAL, 2019). Apesar disso no presente hospital não apresentou instalações elétricas em adequado estado de conservação, segurança e uso.

Enquanto que em relação à ação direta da luz solar os medicamentos e produtos devem estarem armazenados ao abrigo da luz solar direta. Assim, é importante evitar lugares quentes, pois este fator pode interferir na ação do fármaco podendo perder a sua eficácia e até mesmo podendo prejudicar o organismo, o melhor local para o armazenamento é um local arejado com temperatura mais agradável. Quando armazenados de forma incorreta, em ambientes com incidência direta da luz, pode ocorrer alterações na composição (química, física e microbiológica) dos medicamentos, com a diminuição da efetividade terapêutica ou elevação do risco de efeitos tóxicos de acordo com o tipo de degradação sofrida pelo fármaco (SILVA; GERON, 2018).

Adicionalmente, os riscos inerentes à má utilização e ao armazenamento de medicamentos, a falta de cuidados pode afetar a efetividade e a segurança dos medicamentos. (PIVETA et al., 2015). Assim, chama a atenção o pouco cuidado com a aferição de temperatura e umidade, especialmente nas regiões mais quentes e úmidas como no Nordeste, que pode chegar a apresentar temperaturas superiores a 30°C. Disso destaca-se a importância do mapeamento de temperatura nos equipamentos refrigerados que são destinados ao armazenamento de medicamentos termolábeis, para assegurar que estes estão propícios à utilização humana. Neste caso o armazenamento deve ser feito com temperatura controlada entre 2° e 8° C, monitorados constantemente, no mínimo, por duas vezes ao dia, durante todos os dias da semana e que estes registros sejam arquivados durante toda a validade do medicamento para eventuais avaliações



(BRAGA;VITAL,2019).Visto que há possibilidade de perda da estabilidade do fármaco, que é antecipada por fatores como temperatura, presença de oxigênio, luz solar, radiação e umidade, demonstra a necessidade do profissional farmacêutico quanto a orientação do uso e do armazenamento correto desse medicamento (SILVA;GERON,2018).

De acordo com as Boas Práticas, as instalações devem possuir superfícies internas (piso, paredes e teto) lisas e impermeáveis, em perfeitas condições (GOMES; BATISTA,2019).Desse modo, os medicamentos e produtos devem estar armazenados em prateleiras amplas, paredes claras ou sobre estrados espaçados, respeitando uma distância mínima das paredes, evitando a umidade e o acúmulo de sujidade, além de iluminação adequada e extintores bem localizados (SILVA;GERON,2018).Quanto à estrutura da CAF do presente hospital, foram observadas algumas inadequações, como falta de locais adequados, suportes e prateleiras para armazenamento dos medicamentos, as quais levaram a dificuldades de organização. Observou-se também a ausência de pisos e paredes lisos, que facilitem a higienização do local e, conseqüentemente, dificultando a garantia da segurança para o acondicionamento dos medicamentos dentro do hospital. Percebeu-se ainda que devido à falta de espaço no hospital em estudo, parte do medicamento é estocado em um depósito que fica integrado a CAF (Central de Armazenamento Farmacêutico). Nesse depósito há base *pallet* de plásticos que consiste em um estrado de dimensões variadas de acordo com as necessidades do local.

Quanto à verificação do prazo de validade dos medicamentos, essa prática evita a utilização de produtos com prazo de validade expirado, o que, na maioria das vezes, os tornam inefetivos, além da possibilidade de causarem efeitos indesejados ou intoxicações (GENARRO, 2003).Assim, de acordo com os roteiro de inspeção da tabela 1,todos os medicamentos estavam com o prazo de validade vigente das Boas Práticas para Estocagem de Medicamentos, aplicado na Central de Abastecimento Farmacêutico (CAF) do hospital em estudo.

O Gerenciamento de Resíduos tem como principal objetivo minimizar a produção de resíduos e proporcionar seu encaminhamento seguro. Assim, segundo a Resolução RDC ANVISA nº 306/2004, o gerenciamento de resíduos deve abranger todas as etapas de planejamento dos recursos físicos, dos recursos materiais e da capacitação dos recursos humanos envolvidos no manejo dos resíduos. Modo que o gerenciamento dos medicamentos no setor hospitalar é de extrema importância para a qualidade dos atendimentos dos pacientes assistidos e este trabalho deve ser obrigatoriamente feito por profissional farmacêutico, único habilitado para a execução de todas as atividades relacionadas ao controle de medicamentos em âmbito hospitalar (SOUZA et al.,2011).

Entretanto, no hospital dessa pesquisa não há área específica e identificada para medicamentos vencidos/avariados e de destino correto aos medicamentos com prazo de validade expirado. Como conseqüências da sobra de medicamentos, muitos destes produtos acabam sendo descartados de forma inadequada, sendo um fato preocupante, uma vez que dependendo do grau de toxicidade, podem causar contaminação ao meio ambiente. Nesse sentido, os medicamentos não devem ter a mesma destinação final de resíduos comuns (lixo domiciliar). De acordo com a Política Nacional de Resíduos Sólidos, os serviços de saúde são os responsáveis pelo correto gerenciamento de todos os resíduos dos serviços de saúde (RSS) por eles gerados. Além disso, os produtos farmacêuticos, segundo a Secretaria de Saúde do Município de São Paulo, quando vencidos, contaminados, interditados ou não utilizados, são resíduos que apresentam risco potencial à saúde pública. Desta forma, a farmácia hospitalar, em estudo, deve estabelecer um sistema de gerenciamento de resíduos, de forma a dar destinação final aos produtos descartados (SOUZA et al.,2011).



A área de estocagem propriamente dita deve conter: área distinta para medicamentos e correlatos; área fechada à chave para psicotrópicos (os quais são mantidos dentro da farmácia em um armário e fechados a chave). Fato este em que o hospital em estudo está de acordo com a portaria nº 344, de 12 de maio de 1998, que consta que deverão ser obrigatoriamente guardados sob chave ou outro dispositivo que ofereça segurança, em local exclusivo para este fim, sob a responsabilidade do farmacêutico (BRASIL, 1998).

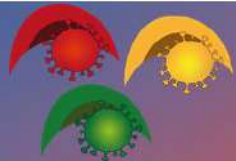
Além do prazo de validade, é necessário observar outros aspectos físicos (integridade e quantidade) dos medicamentos antes de sua utilização, a fim de evitar o risco de exposição a produtos degradados ou contaminados, a fim de descartar os medicamentos vencidos ou inadequados para o uso (PIVETA et al., 2015). Assim, a análise dos medicamentos quanto sua integridade é uma atividade de controle administrativo que visa a eficiente programação e aquisição de produtos no momento e na quantidade para atender a demanda sem que haja sobre carregamentos físicos e no sistema, mantendo-se em equilíbrio, para evitar danificações, perdas e obsolescências de produtos. Assim, deve ser visto o acondicionamento dos produtos conforme nome, número do lote e data de validade, sendo que os medicamentos com datas de validade mais próxima devem ser dispostos na frente para que sejam distribuídos primeiramente, bem como com registros de todas as retiradas, evita perdas, seja por obsolescência e/ou extravios (BRAGA; VITAL, 2019).

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos por meio desse estudo revelaram a fragilidade no processo de armazenamento e que há necessidade de melhorias quanto às características físico-estruturais e em que se encontram a Central de Abastecimento Farmacêutico do hospital em estudo. Assim, necessita ser otimizado em diversos pontos, para que haja um fortalecimento do ciclo da assistência farmacêutica. Por exemplo, mudanças na estrutura física, que garantam a estabilidade físico-química dos produtos, são cruciais. Além disso, uma melhor organização do processo de trabalho e o cumprimento das boas práticas que regem todo o processo de armazenamento são necessários, a fim de propor melhorias para a construção de uma forma mais adequada de armazenamento, assegurando acesso a medicamentos de qualidade.

5. REFERÊNCIAS

- BALK, R. S. et al. Avaliação das condições de armazenamento de medicamentos em domicílios do município de Uruguaiana – RS. Saúde (Santa Maria), Santa Maria, 41(2):233-240, Jul./Dez, 2015.
- BRAGA, E.S.; VITAL, J. C. M., A Logística no transporte e armazenamento de medicamentos termolábeis. x fatecloglogística 4.0 & a Sociedade do conhecimento FATEC Guarulhos – Guarulhos/SP - Brasil 31 de Maio e 01 de Junho de 2019, ISSN 2357-9684.
- BRASIL. Portaria n.º 344, de 12 de maio de 1998. Aprova o Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial. 1998.
- BRASIL. Portaria GM n.º 3.916, 30 de outubro de 1998. Aprova a Política Nacional de Medicamentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 1(215): 18. Nov., 1998.
- CRF-SP. Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo. Farmácia Hospitalar. Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo. – São Paulo, 2010.
- COSTA, E. A. et al. Situação sanitária dos medicamentos na atenção básica no Sistema Único de



Saúde. RevSaude Publica.,51 Supl 2:12s, 2017.

GOMES,G.S.S., BATISTA,A.M. Armazenamento de medicamentos na Central de Abastecimento Farmacêutico (CAF) de um município do Rio Grande do Norte, Brasil.Infarma. 31: 276-284,2019.

RIBEIRO,M.A.; HEINECK,I.Saúde Soc. São Paulo,19(3):653-663, 2010.

SBRAFH. Sociedade Brasileira de Farmácia Hospitalar. Padrões Mínimos para Farmácia Hospitalar. São Paulo, 3ª ed., ISBN: 978-85-61645-00-7,2017.

SILVA, S. A. A prescrição farmacêutica: uma análise da percepção dos profissionais farmacêuticos da cidade Cascavel-PR. Trabalho de conclusão de curso (Curso de Farmácia) - Faculdade Assis Gurgacz, Cascavel, 2015.

SILVA,J. M.; GERON,V. L. M. G. Avaliação de armazenamento de medicamento em domicílio em um bairro de Ariquemes / RO. RevCient FAEMA: Revista da Faculdade de Educação e Meio Ambiente - FAEMA, Ariquemes, Ano 9, n. edesp, p. 491- 499, maio-jun. 2018.

SOUZA, M. N.. Boas práticas de armazenamento e distribuição de medicamentos em farmácias hospitalares: importância do profissional farmacêutico. Faculdade de Educação e Meio Ambiente.Tese(TCC-Farmácia), Ariquemes – RO. 2011.

PIVETA,L.N. et al. Armazenamento e descarte de medicamentos por acadêmicos da área da saúde de uma universidade pública paranaense. Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, 36(1): 55-66, jan./jun., 2015.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Assistência Farmacêutica

PROTOCOLO DE AUDITORIA DE MEDICAMENTOS DE ALTA VIGILÂNCIA: UMA ESTRATÉGIA PARA SEGURANÇA DO PACIENTE

L. M. BATISTA¹, T. C. S. AMORIM¹, A. M. B. SILVA¹, A. C. S. NEVES¹, V. M. P. GALINDO², G. K. V. GALINDO² e A. L. VASCONCELOS²

¹Programa de Residência Multiprofissional em Terapia Intensiva do Real Hospital Português de Beneficência em Pernambuco, COREMU UFPE.

²Real Hospital Português de Beneficência em Pernambuco.

E-mail para contato: loorenameideiros@gmail.com

RESUMO – Introdução: No ambiente hospitalar, a categoria dos medicamentos de alta vigilância (MAV) requer atenção especial por apresentarem risco aumentado de provocar danos por falha no processo de utilização. Dessa forma, eles necessitam de monitoramento constante principalmente quanto ao armazenamento, identificação e administração, fazendo-se necessária a realização de vistorias internas para garantir a conformidade quanto a esses critérios. **Objetivo:** Verificar aspectos referentes à conformidade das estratégias adotadas no ciclo de cuidados para prevenção e redução de erros relacionados aos MAV em postos de enfermagem. **Metodologia:** Estudo transversal, retrospectivo, realizado no período de abril a junho de 2020 em postos de enfermagem da instituição. O tamanho da amostra foi definido a partir do cálculo amostral (95% de confiança), baseado no total de MAV dispensados e foram avaliadas as variáveis local de armazenamento, presença de etiqueta sinalizadora e etiqueta de identificação do paciente. **Resultados:** Houve uma redução gradativa das não conformidades em relação à etiqueta sinalizadora e à identificação do paciente, no entanto, o quesito armazenamento não teve o mesmo comportamento, sugerindo ser o quesito de maior fragilidade dentre os analisados. **Conclusão:** O presente estudo demonstra a necessidade da constante ação de correção de não conformidades relacionadas a esses medicamentos, bem como a necessidade de futuras ações educativas à equipe de saúde, com a finalidade de garantir a qualidade da assistência e segurança do paciente.

Palavras-chave: Ações educativas; Conformidade; Medicamentos; Vistorias.

ABSTRACT – Introduction: In hospital environment the drug category named high alert medications (HAM) needs special attention, due to an increased risk of causing significant damage as a result of failure in administration process. Thus, they need constant monitoring mainly regarding storage, identification and administration making it necessary to carry out internal inspections to ensure compliance with these criteria. **Objective:** Verify aspects related to the compliance of the strategies adopted in the care cycle for the prevention and reduction of errors



related to HAMs in nursing stations. **Methodology:** Cross-sectional, retrospective study, carried out from April to June 2020 at institutional nursing stations. Sample size was defined according to sample calculation (95% confidence), based on the total number of HAMs monthly dispensed and the parameters location of storage, presence of signaling tag and patient identification tag were evaluated. **Results:** There was a gradual reduction in non-conformities in relation to the signaling tag and patient identification however, the item storage did not have the same behavior, which suggests that it is the item of greatest fragility among the analyzed parameters. **Conclusion:** The present study demonstrates the need for constant actions to correct non-conformities related to these drugs, as well as the need for future educational actions for the health team, in order to guarantee the quality of care and patient safety.

Keywords: Compliance; Drugs; Educational actions; Inspections.

1. INTRODUÇÃO

Medicamentos de alta vigilância (MAV) são aqueles que apresentam risco aumentado de provocar danos significativos, inclusive óbito, se ocorrerem falhas em sua utilização no paciente. Estas falhas podem advir de diversos processos, como prescrição, administração, dispensação, identificação. Neste sentido, a Organização Mundial de Saúde e a *Joint Commission International*, criaram seis metas destinadas às áreas de maiores problemas quanto à segurança do paciente, sendo a terceira meta a melhoria da segurança dos medicamentos de alta vigilância (Menezes *et al.*, 2016; Joint Commission International, 2017; Sodré-Alves, 2018; Arduini *et al.*, 2019).

As auditorias internas hospitalares constituem-se em uma ferramenta de controle e regulação dos serviços de saúde. No passado, era associada principalmente à detecção de erros, irregularidades e fraudes, no entanto, com o passar do tempo, o seu papel começou a abranger também outras áreas, não como uma instância fiscalizadora, mas apoiadora e de caráter educativo, na busca da qualidade da assistência em saúde (Lima *et al.*, 2017; Rosa, 2017).

Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo realizar processos de auditoria interna em postos de enfermagem de um hospital privado de alta complexidade a fim de verificar a conformidade das estratégias adotadas no ciclo de cuidados dos medicamentos de alta vigilância.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo de corte transversal, retrospectivo, realizado no período de abril a junho de 2020 nos postos de enfermagem de um hospital privado de alta complexidade localizado na cidade do Recife-PE. Em cada mês foram realizadas duas auditorias, que foram mediadas por farmacêuticas residentes.

O tamanho da amostra foi definido de acordo com o cálculo amostral (95% de confiança), baseado no total de MAV dispensados por mês. As seguintes variáveis foram abordadas referentes aos MAV: local de armazenamento, presença de etiqueta sinalizadora (alta vigilância/termolábil) e etiqueta de identificação do paciente. Para cada variável analisada foi atribuída a conformidade ou não conformidade.

Após realização de cada auditoria, foi gerado um relatório de recomendações para a adequação das não conformidades encontradas no setor. Todos os dados foram registrados em planilha para análise percentual.



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir do relatório gerado através do sistema de dispensação eletrônico da instituição, foi possível obter o seguinte cálculo amostral que pode ser encontrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Cálculo para definição do tamanho da amostra

	MEDICAMENTOS DISPENSADOS	CÁLCULO AMOSTRAL (95% de confiança)	MEDICAMENTOS COLETADOS
<i>Abril</i>	38.748	381	455
<i>Mai</i>	53.957	382	521
<i>Junho</i>	44.902	381	509

Após a definição do número mínimo de medicamentos a serem analisados, foram realizadas as auditorias. Dentre as classificações quanto a conteúdo e fins, a auditoria realizada na instituição consiste em vistoria de conformidade, que compreende a verificação do cumprimento, pela entidade auditada, das condições, regras e regulamentos especificados. Em uma auditoria de conformidade de MAV, as entidades devem ser auditadas quanto à adequação às estratégias que garantirão a segurança do paciente frente aos riscos de falhas relacionadas a estes medicamentos (De Andrade, Sicheski, 2017; Costa, 2019). Os resultados encontrados após a auditoria realizada podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2 - Total de não conformidades encontradas nos meses analisados

MEDICAMENTOS COLETADOS	NÃO CONFORMIDADES			
	ARMAZENAMENTO n (%)	ETIQUETA SINALIZADORA n (%)	IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE n (%)	
<i>Abril</i>	455	40 (8,8 %)	5 (1,1%)	99 (21,7 %)
<i>Mai</i>	521	47 (9,0%)	4 (0,8%)	77 (14,8 %)
<i>Junho</i>	509	40 (7,8%)	0 (0,0%)	66 (12,9%)
TOTAL	1485	127 (8,5%)	9 (0,6%)	242 (16,3%)

Os dados apresentados demonstram a importância da realização das auditorias internas visto que, etiquetagem diferenciada (sinalização de alta vigilância), armazenamento sinalizado e identificação do paciente no medicamento fazem parte do ciclo de cuidados relacionados aos MAV, sendo importantes para diminuir e prevenir os erros (Instituto Para Práticas Seguras no Uso de Medicamentos, 2016; Silva, Oliveira, 2016).

É possível observar que houve uma redução gradativa das não conformidades em relação à etiqueta sinalizadora e à identificação do paciente, no entanto, o quesito armazenamento não teve o mesmo comportamento, o que sugere ser o quesito de maior fragilidade dentre os parâmetros analisados. Devido ao seu conhecimento técnico-científico, o farmacêutico é um profissional capacitado para visualizar tanto as não-conformidades e irregularidades e suas causas, bem como fornecer a orientação e apoios necessários, direcionando a tomada de decisão quanto às ações corretivas e preventivas (Barros, 2018).

A partir do exposto, foram implementadas ações a fim de promover a melhoria contínua nos parâmetros relativos aos MAV, sendo utilizados instrumentos visuais e verbais: produção de documento formal onde continham as orientações necessárias direcionadas à equipe de



enfermagem para realizar as correções pontuadas durante a auditoria; confecção de banner informativo sobre os medicamentos de alta vigilância, mudanças nas embalagens para facilitar a diferenciação e jogo educativo. Neste sentido, as perspectivas futuras incluem a análise dos mesmos parâmetros após a mudanças, que tornou-se mais completa, tendo como ponto de partida os dados analisados.

4. CONCLUSÃO

Os medicamentos de alta vigilância necessitam de atenção especial por estarem mais propensos a erros de medicação. A realização de auditorias internas de MAV demonstrou ser um método eficaz para promover a redução das não conformidades assim como para identificar os quesitos de maior fragilidade no ciclo de cuidados dos MAV. Assim, fica evidente a necessidade da constante ação de correção de não conformidades relacionadas a esses medicamentos e importância da continuidade das auditorias periódicas. Outra estratégia que pode vir a ser adotada para garantia da qualidade da assistência e segurança do paciente é a educação contínua da equipe de saúde como forma de reforçar a importância do cuidado no manejo dessa categoria de medicamentos.

5. REFERÊNCIAS

ARDUINI, G.O. et al. Medicamentos de alta vigilância: frequência e dupla checagem em um hospital de ensino. *Rev. enferm. atenção saúde*, v. 7, n. 3, 2019.

BARROS, J.C. A Farmácia Clínica no controle dos Fármacos de Alta Vigilância: Nos Processos de Acreditação Hospitalar. Centro Universitário de Anhanguera. *Trabalho de Conclusão de Curso*. 2018.

COSTA, A.M.C.C. Implementação do sistema de gestão da qualidade no meio hospitalar e o papel da auditoria Interna: caso do Hospitalar da Figueira da Foz, EPE. *Tese de Doutorado*. 2019.

DE ANDRADE, F.B; SICHESKI, S.J Auditoria interna hospitalar: Uma atividade de apoio à tomada de decisão. *Espacios*, v. 38, n. 24, 2017.

INSTITUTO PARA PRÁTICAS SEGURAS NO USO DE MEDICAMENTOS. Programa Nacional de Segurança do Paciente. Medicamentos potencialmente perigosos: lista dos medicamentos para instituições de longa permanência. *Boletim ISMP Brasil*. v. 5, n. 3 p. 1-5, 2016.

JOINT COMMISSION INTERNATIONAL. Padrões de Acreditação da Joint Commission International para Hospitais. *Consórcio Brasileiro de Acreditação de Sistemas e Serviços de Saúde* – Rio de Janeiro: CBA: 2017.

LIMA, F.H.A. et al. Implantação da comissão de auditoria interna em instituição de saúde pública do Brasil Central. Faculdade de Medicina. Universidade Federal de Goiás. *Tese de Doutorado*. 2017.



MENEZES, M.S. et al. Perfil de segurança dos medicamentos de alta vigilância: uma revisão sistemática de ensaios clínicos randomizados. Universidade Federal de Sergipe. *Dissertação de Mestrado*. 2016.

ROSA, M.R. Padronização da gestão do processo de auditoria interna em um hospital privado na cidade de Santa Maria. Universidade do Vale do Rio dos Sinos. *Dissertação de Mestrado*. 2017.

SILVA, J.Q.; OLIVEIRA, V.B. Medicamentos de alta vigilância em meio hospitalar: uma revisão. *Revista Saúde e Desenvolvimento*, v. 7, n. 4, p. 179-194, 2016.

SODRÉ-ALVES, B.M.C. Prevalência de danos causados por erros de medicação envolvendo medicamentos de alta vigilância. Universidade Federal de Sergipe. *Dissertação de Mestrado*. 2018.

6. AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e ao Real Hospital Português de Beneficência em Pernambuco.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Assistência Farmacêutica

ATUAÇÃO DO FARMACÊUTICO NA LINHA DE CUIDADO DE PESSOAS VIVENDO COM HIV/AIDS EM UM HOSPITAL DE REFERÊNCIA EM DOENÇAS TROPICAIS DO ESTADO DO PIAUÍ-BRASIL

E. C.HOLANDA¹, E. P.FONTENELE¹ e S. M. de ANDRADE²

¹ Centro Federal do Piauí, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia;

² Centro Universitário Santo Agostinho, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia.

E-mail para contato: holandap2@outlook.com

RESUMO-Introdução: Muitos fatores contribuem para a resposta do paciente à terapia antirretroviral (TARV), incluindo adesão farmacológica. Neste contexto, a presença do farmacêutico é imprescindível para orientar o paciente em relação à terapia tornando mais simples a compreensão da importância do uso correto do medicamento. Desse modo, o objetivo do trabalho é relatar a experiência de acadêmicos de farmácia na atuação na linha de cuidado de pessoas vivendo com HIV/AIDS em um hospital de referência em doenças tropicais do estado do Piauí- Brasil. Metodologia: Esse estudo trata-se de um relato de experiência. Foram feitas entregas de antirretrovirais e revisão da farmacoterapia em pacientes portadores de HIV/AIDS admitidos na farmácia ambulatorial e internados no período de agosto de 2019 a dezembro de 2019. Resultados e Discussão: Foi possível que os acadêmicos aprofundassem seu estudo clínico com medicamentos de uso em pacientes de HIV/AIDS. Isso foi essencial por informar aos pacientes sobre cada medicamento prescrito, como também fornece instruções claras sobre o tratamento, tais como de uso, dose, frequência, via de administração, reações adversas, forma de armazenamento, possíveis efeitos colaterais e interações com outros medicamentos. Conclusão: Possibilitou compreender a importância do profissional farmacêutico na prática clínica para pacientes em terapia HIV/AIDS, bem como contribuir para reflexões e discussões sobre a importância desse profissional na atenção farmacêutica.

Palavras- chave: Linhas de cuidado; Assistência Farmacêutica; Educação em saúde.

ABSTRACT-Introduction: Many factors contribute to the patient's response to antiretroviral therapy (ART), including pharmacological adherence. In this context, the presence of the pharmacist is essential to guide the patient in relation to therapy, making it easier to understand the importance of the correct use of the medication. In this way, the objective of the work is to report the experience of pharmacy students working in the care of people living with HIV / AIDS in a referral hospital for tropical diseases in the state of Piauí-Brazil. Methodology: This study is



an experience report. Deliveries of antiretrovirals and revision of pharmacotherapy were provided to patients with HIV / AIDS admitted to the outpatient pharmacy and hospitalized from August 2019 to December 2019. Results and Discussion: It was possible for academics to deepen their clinical study with medications for use in HIV / AIDS patients. This was essential for informing patients about each medication prescribed, as well as providing clear instructions on treatment, such as use, dose, frequency, route of administration, adverse reactions, form of storage, possible side effects and interactions with other medications. Conclusion: It made it possible to understand the importance of the pharmaceutical professional in clinical practice for patients undergoing HIV / AIDS therapy, as well as to contribute to reflections and discussions about the importance of this professional in pharmaceutical care.

Keywords: Care lines; Pharmaceutical care; Health education.

1. INTRODUÇÃO

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um retrovírus causador da AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Humana) que ataca o sistema imunológico. Atinge, principalmente, os linfócitos T CD4+ que modifica o DNA de células para fazer cópias de si mesmo e, após se multiplicarem, rompem os linfócitos em busca de outras células para infectar (BRASIL, 2013). A epidemia do HIV/AIDS é um problema de saúde pública mundial que mobiliza órgãos internacionais em programas de prevenção e combate à disseminação da doença (NASCIMENTO et al.,2019).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) supõe que, em 2018, existiam aproximadamente 37,9 milhões de pessoas infectadas pelo HIV, sendo que 1,7 milhões foram infectados recentemente. No estado do Piauí, de janeiro de 2007 a 2019, houve registro de 1.898 casos de HIV no SINAN. Destes, o ano de 2018 apresentou a maior quantidade de casos, somando 411 novas notificações registradas (BRASIL, 2019).

O controle do HIV/AIDS depende, na maioria absoluta dos pacientes, da utilização da terapia antirretroviral (TARV) (BRASIL, 2013) que consiste na combinação de medicamentos para suprimir ao máximo o vírus, interromper a progressão da doença e reduzir a possibilidade de transmissão (NASCIMENTO et al.,2019). No Brasil, esta foi introduzida no sistema de saúde como parte da política nacional de medicamentos. Isso possibilitou uma melhora dos resultados clínicos, maior controle do avanço da doença e redução da taxa de mortalidade associada à AIDS (MEIRELES et al.,2019). Em contrapartida a esses benefícios, os efeitos colaterais dos antirretrovirais (ARV) contribuem para a descontinuidade do tratamento, que resulta no aumento da carga viral no sangue e diminuição da contagem dos linfócitos TCD4+ (MEIRELES et al.,2019).

Diante disso, um dos pontos chaves no sucesso do tratamento depende do grau de adesão à terapia. Para alcançar bons resultados com o uso da TARV, a interação entre pacientes e profissionais de saúde tem grande importância (SILVA, 2016). O Ministério da Saúde (MS) trabalhando nessa conjuntura elaborou o Protocolo de Assistência Farmacêutica em DST/HIV/AIDS. Esse prevê o cuidado ao paciente com HIV/AIDS como um dos objetivos centrais no campo da atenção farmacêutica (VIELMO et al.,2014). Assim, estudos sugerem que a atenção farmacêutica seja uma ferramenta para aumentar a adesão aos ARVs e proporcionar benefícios clínicos, além de sugerir aumento do vínculo do usuário com o serviço. Fato que altos índices de adesão são fundamentais para a preservação da função do sistema imunológico dos pacientes, do contrário podem ocorrer mutações e seleção de vírus resistentes que necessitarão de terapia de resgate, o que determina um alto custo para o SUS (VIELMO et al.,2014).



Diante disso, o profissional farmacêutico desempenha importante papel atuando nas unidades dispensadoras de medicamentos para pacientes com HIV/AIDS (BRASIL, 2010). Porém, a qualidade da assistência oferecida também deve fazer parte da estratégia de geral de combate ao avanço da epidemia e sua avaliação pode gerar futuras melhorias nas políticas públicas de saúde (SIVA, 2016). Diante disso, este trabalho tem por objetivo relatar a experiência de acadêmicos de farmácia na atuação na linha de cuidado de pessoas vivendo com HIV/AIDS em um hospital de referência em doenças tropicais do estado do Piauí- Brasil.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Esse estudo trata-se de um relato de experiência de acadêmicos do curso de Farmácia da Universidade Federal do Piauí, pela a participação de um projeto de extensão. Foram realizadas visitas semanais a um hospital em referências em doenças tropicais do estado do PI- Brasil. O período de participação ocorreu de agosto de 2019 a dezembro de 2019.

Foi observado e feito entrega de antirretrovirais e revisão da farmacoterapia em pacientes portadores de HIV/AIDS admitidos na farmácia ambulatorial e internados no hospital, respectivamente, sob a supervisão de um farmacêutico habilitado. Na farmácia ambulatorial, o paciente é acolhido no para terapia antirretroviral ou quando há dificuldade de adesão ao tratamento, fornecendo suporte relevante ao autocuidado apoiado, além de realizar a revisão da farmacoterapia desenvolvido por docente e estagiário do curso de graduação em farmácia da universidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na farmácia ambulatorial no primeiro momento realiza a impressão do termo de esclarecimento, a análise dos aspectos técnicos e legais do receituário, e verificando se a prescrição estava de acordo com o protocolo vigente, e fazendo a orientação do paciente com base no termo. Os acadêmicos responsáveis precisavam repassar as informações colhidas nesse serviço, por meio do preenchimento de uma ficha, onde são colocadas todas as informações do paciente desde a doença de base, sorologias e exames, até os medicamentos em uso no momento (BRASIL, 2018). Percebeu que o ponto chave que torna esse repasse de informações no diferencial do serviço é o relato de como está à adesão a medicação, se o paciente possui alguma demanda a ser resolvida ou se o mesmo e seus acompanhantes demonstram alguma dificuldade de entendimento que possa gerar problemas na adesão ao tratamento (ASSUNÇÃO; URSINE, 2008). Todas essas informações foram fundamentais visto que o profissional que estava no ambulatório pouco conhecia os pacientes, mas de posse dessa ficha era possível ter um panorama geral sobre os pacientes e suas necessidades individuais, possibilitando um atendimento ambulatorial de melhor qualidade.

A partir do esquema prescrito era feita a orientação sobre o uso adequado e seguro dos medicamentos, por exemplo, informar que se devia evitar ingestão de bebidas alcoólicas no período de tratamento, se poderia ser tomado com ou sem alimento, conservar o medicamento em local seco e arejado, longe de fonte de calor e umidade, e em caso de sobra devolver a unidade para o correto descarte (BRASIL, 2010). Diante disso, percebeu-se a importância de integrar os saberes populares, como o uso de plantas medicinais que possam a vir a interagir com os ARV. Nesse momento, os discentes podiam avaliar se o ARV estava de acordo com condições específicas como gravidez e com atenção especial para pacientes com diabetes, hipertensão arterial descontrolada ou insuficiência renal. Destaque ainda para situações na qual o paciente polimedicado, visto a possibilidade de interações medicamentosas, por exemplo, com os Inibidores da Bomba de Próton, Ranitidina e Fenitoína (BRASIL, 2017).



Nesse cenário, o farmacêutico e os estagiários ficaram responsáveis ainda por informar o paciente acerca de instruções sobre horários e quantidades. Nesse sentido, foi permitido compreender o estado geral do paciente, sintomas e queixas, para associar a terapia medicamentosa e identificar situação problema e estabelecer melhores condutas. Os principais medicamentos envolvidos nas reações adversas foram Efavirenz, Zidovudina e Lopinavir (SANTOS et al., 2016). As reações detectadas incluíram anemia, cefaléia, tonturas, insônia, náuseas, vômitos, diarreia, dislipidemia e reações cutâneas. No decorrer desse momento com o paciente, os acadêmicos estavam abertos a esclarecer as dúvidas relacionadas a métodos de prevenção e transmissão da doença. Onde o paciente atendido recebia informações decisivas, possibilitando que o mesmo retornasse ao seu domicílio com as informações e documentos necessários para a continuidade do tratamento, visto que esse paciente necessitava receber instruções para conseguir seguir com o tratamento, além de saber lidar com qualquer tipo de negligência que poderia acontecer.

Portanto, o conhecimento aferido após o acompanhamento com o farmacêutico, ocorreu o aumento da compreensão por parte dos pacientes em relação a sua condição e tratamento (LUSTOSA et al., 2016). Fato esse, que demonstrou a contribuição da atenção farmacêutica para o entendimento dos sujeitos e que poderia influenciar positivamente na manutenção de taxas satisfatórias de adesão ao longo do tratamento. Diante disso, percebeu que quando surgiam dificuldades com o uso dos medicamentos e antes que essas possam prejudicar a adesão a TARV, o farmacêutico era o profissional de fácil acesso no sistema de saúde do hospital e orientava na conduta. As condutas foram no sentido de minimizar ou evitar efeitos colaterais, ao verificar a forma com que os medicamentos eram administrados pelos pacientes. E em casos onde era preciso adequar ou trocar de esquema ARV o encaminhamento do paciente ao médico ocorria com maior brevidade.

Enquanto no processo de revisão de farmacoterapia os discentes com o auxílio do farmacêutico clínico analisavam as prescrições e participava da reunião semanal para revisão do plano terapêutico dos pacientes internados no serviço, onde se buscava um diálogo mais efetivo da equipe, possibilitando compreender as demandas dos pacientes, traçar planos de cuidados e organizar, analisando individualmente a necessidade e garantir um tratamento efetivo e seguro. Após as análises os discentes poderiam sugerir adequações farmacêuticas (MATILE, 2008). Fato que percebeu várias recomendações de ajustes na prescrição, suspensão ou reintrodução de novos medicamentos, por meio da avaliação de prescrições quanto à indicação, dose, posologia, horários, reconstituição, diluição, administração e interações medicamentosas potenciais através da análise de importantes bases de dados e informações científicas da literatura.

Outros parâmetros avaliados e acompanhados foram quanto à forma farmacêutica prescrita e o período de tratamento, buscando minimizar os riscos quanto ao uso prolongado sem indicação, bem como minimizar os custos, além de vias de administração, com especial atenção para pacientes com sonda nasoentérica/nasogástrica ou gastrostomia, que necessitavam de cuidados diferenciados, decorrente da restrição de uso em alguns medicamentos pelo risco de obstrução da sonda, perfil de absorção ou perda da eficácia terapêutica devida interação com alimento e orientação quanto à trituração da forma farmacêutica (ISMP, 2015). Cita-se ainda na revisão da farmacoterapia a avaliação da evolução clínica do paciente, observando a efetividade e a segurança da terapia farmacológica, monitoramento por meio dos sinais, sintomas e exames; e orientações a equipe de enfermagem com informações relativas aos horários e modos de uso adequados.

Contatou-se no processo de revisão da farmacoterapia a atuação do profissional farmacêutico no sentido de recuperar a saúde do paciente com HIV/AIDS, objetivando a otimização da farmacoterapia por meio da resolução de problemas relacionados ao uso de medicamentos, o que



viabilizou a prática de uma terapia medicamentosa mais segura e racional e que melhorou a qualidade de vida do paciente. Desse modo, as intervenções e orientações feitas durante o período foram essenciais para ampliar o conhecimento dos pacientes e dos acadêmicos em relação ao HIV/AIDS, à TARV e aos exames laboratoriais, visto alcançaram propósito de melhorar a adesão ao tratamento, pois se acreditou que a adesão a terapêutica seria efetiva quanto maior fosse a compreensão do paciente sobre a sua própria saúde. Fato que a intervenção farmacêutica demonstrou influenciou de forma positiva na qualidade de vida e no prognóstico clínico, suprimindo a carga viral e aumentando a contagem de CD4 por meio da melhora da adesão à TARV (BRASIL, 2013) indicando melhora da adesão dos pacientes em uso de principalmente do uso da Zidovudina, um fármaco que o mecanismo de reação adversa ainda não está totalmente esclarecido.

Nessa experiência, foi ainda um momento de integração da equipe, de troca de conhecimentos e que possibilita identificar as diferentes percepções de cada profissional que acompanhava o paciente, tendo um olhar mais ampliado (SILVEIRA et al.,2020). Assim, é importante relatar a elaboração de projetos conjuntos com outros profissionais de saúde, como educadores físicos, assistentes sociais, médicos, enfermeiros, nutricionistas e fisioterapeutas na melhora da qualidade de vida dos pacientes com HIV/AIDS na adesão e melhor qualidade de vida. A integração do farmacêutico na equipe multiprofissional contribui para a segurança do paciente em relação à terapia medicamentosa propiciando desta forma a continuidade do cuidado no hospital e organização dos cuidados a nível familiar. Assim, a qualidade dos serviços de saúde passava por várias dimensões do cuidado, sejam técnicas, de disponibilidade de recursos, de gerenciamento, e mesmo as relações estabelecidas entre usuários e profissionais (NEMES et al.,2009).

Fato que percebeu que o abandono do tratamento era um desfecho que refletia a qualidade da atenção e que devia ser evitado. A irregularidade no comparecimento às consultas, na retirada dos medicamentos e na realização dos exames de seguimento, bem como a detectabilidade da carga viral eram fatores de monitoramento que podiam servir de alerta para o estabelecimento de saúde acerca do risco de desmotivação para o tratamento e o possível abandono deste. Entretanto, foram nítidas ainda várias limitações no período de experiência com paciente em TARV, como a impossibilidade de consultas farmacêuticas independentes da agenda médica, ausência de informações no prontuário como resultados de exames laboratoriais, posologias dos medicamentos, prescrições de medicamentos isentos de prescrição e dificuldade dos pacientes na adesão a terapia. Cita-se ainda as dificuldades encontradas pelos farmacêuticos na execução desses serviços, como a desproporção do número de profissionais com a demanda, muitas vezes, sendo responsável por atividades clínicas e logísticas ao mesmo tempo e estrutura física com apenas uma sala para atendimento individual (BASTOS et al.,2011).

Diante disso, durante a extensão os acadêmicos tiveram a oportunidade de conhecer algumas atividades importantes de atuação do profissional farmacêutico desenvolvidas na assistência farmacêutica e cuidados farmacêuticos em portadores de HIV/AIDS (BARBERATO et al.,2019). Além disso, se apropriaram de atitudes reflexivas, proativas e emancipadoras para que pudesse se desenvolver independentemente em situações distintas, a execução das atividades exigia que o farmacêutico e os discentes estivessem preparados para atender aos pacientes e orientá-los da melhor forma possível, de maneira a contribuir para a adesão a Terapia Antirretroviral - TARV. Um das percepções obtidas foi de que um dos principais objetivos da terapia antirretroviral é a de reduzir morbidade e mortalidade associadas ao HIV, melhorar a qualidade de vida, preservar e, quando possível, restaurar o sistema imunológico e suprimir de forma sustentada a replicação viral. Percebeu-se ainda que a adesão à terapia antirretroviral é complexa para o paciente, pois envolve diversos medicamentos, reações adversas e preconceito da sociedade. Diante dessa experiência com pacientes com HIV/AIDS, mostrou-se que há diversas barreiras para que seja alcançada a



adesão à TARV, como falta de suporte social, falta de compreensão, intolerância e reações adversas aos medicamentos, tensas relações tanto com profissionais de saúde quanto com planos de saúde. Diante disso, analisou-se que para que a adesão seja efetiva é importante que o paciente esteja de acordo com o tratamento proposto, disposto a cumprir com as orientações recebidas e se sinta responsável por sua saúde.

4. CONCLUSÃO

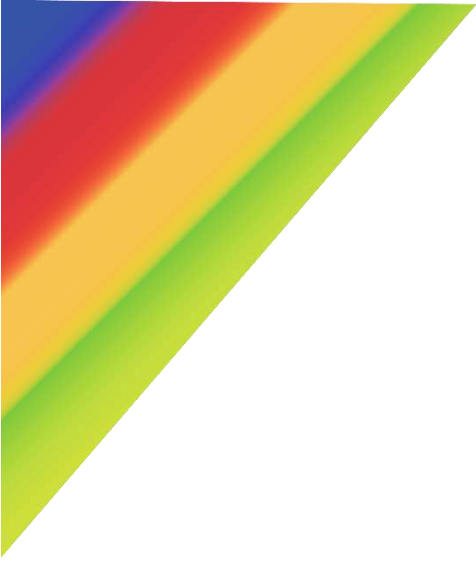
A partir da experiência contatou-se que atenção farmacêutica é essencial para o desenvolvimento de um tratamento adequado de pacientes com HIV/AIDS, colaborando para a compreensão da importância do farmacêutico ao atuar nessa estratégia no auxílio em uma maior adesão terapêutica, além de contribuir de forma significativa no conhecimento dos estudantes. Além disso, possibilitou compreender a importância desse profissional na prática clínica, bem como contribuir para reflexões e discussões. Ainda, a experiência aqui relatada vem contribuir para aprimorar esses serviços, tornando benéfica para pacientes, familiares e profissionais envolvidos. Desse modo, futuros estudos devem ser estimulados a fim de correlacionar a ocorrência destas ações com a adesão ao tratamento ARV e seu impacto na qualidade de vida das pessoas vivendo com HIV/AIDS.

5. REFERÊNCIAS

- ASSUNÇÃO, T. S.; URSINE, P. G. S. Estudo de fatores associados à adesão ao tratamento não farmacológico em portadores de *diabetes mellitus* assistidos pelo Programa Saúde da Família, Ventosa, Belo Horizonte. Ciênc. saúde coletiva, Rio de Janeiro, 13 (2) : Dec. 2008.
- BARBERATO, L. C.; SCHERER, M. D. A.; LACOURT, R. M. C. O farmacêutico na atenção primária no Brasil: uma inserção em construção. Ciênc. saúde coletiva, Rio de Janeiro, 24 (10) : Oct. Epub Sep 26, 2019.
- BASTOS, A. A.; COSTA, E. A.; CASTRO, L. L. C.. Fatores facilitadores e dificuldades no exercício da vigilância sanitária de farmácias em Salvador-Bahia. Ciênc. saúde coletiva, Rio de Janeiro, 16 (9): Sept. 2011.
- BRASIL (2010). Higiene, Armazenamento e Conservação dos Alimentos. Programa de Mobilização e Educação para o Consumo Alimentar. Belo Horizonte, 2010.
- BRASIL. (2013). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. *Manual técnico para o diagnóstico da infecção pelo HIV*. Brasília: Ministério da Saúde, 56 p.
- BRASIL. Capacitação no Processo de Ressuprimento e Distribuição de Medicamentos Antirretrovirais-2017. Interação Medicamentosa e Coinfecções em PVHIV. Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de IST/AIDS e Hepatites Virais 25/09/2017.
- BRASIL (2018). 126 Reunião da Comissão Nacional de IST, HIV/Aids e Hepatites Virais – CNAIDS. INFORMES Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. Brasília, outubro, 2018.
- BRASIL. (2019). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis – DCCI. *Vigilância em Saúde no Brasil 2003/2019*. Brasília: Ministério da Saúde. 72 p.
- ISMP. Instituto para Práticas Seguras de uso de medicamentos. Preparo e administração de medicamentos via sonda enteral ou ostomias. 4(4): DEZ. 2015. ISSN: 2317-2312



- LUSTOSA, M. A.; ALCAIRES, J. COSTA, J. C., Adesão do paciente ao tratamento no Hospital Geral. Rev. SBPH .Rio de Janeiro.14(2): dez. 2011.
- MATILE E. Papel do Farmacêutico na Oncologia: da manipulação à assistência farmacêutica. Rev. Bras. Oncologia Clínica 2008 . Vol. 5 . N.º 14 (Mai/Ago) 29-31 .
- MEIRELES, M. R. O., RODRIGUES, L. M., MESQUITA, D. P., ROMEU, G. A., Avaliação da Alteração da Terapia Antirretroviral de Pessoas Vivendo com HIV/AIDS. Congresso Brasileiro de FARMACIA HOSPITALAR. XI Congresso & XII Sul Americano. Fortaleza, mai., CE, 2019.
- MOURÃO, E. M. S., VIANA LELIS, J. M. V., ASSIS, M. S. S., OLIVEIRA, D. F., Perfil Epidemiológico e Clínico de Pessoas Vivendo com Hiv/Aids de uma Unidade Dispensadora de Medicamentos de Fortaleza-CE. Congresso Brasileiro de FARMACIA HOSPITALAR. XI Congresso & XII Sul Americano. Fortaleza, mai., CE, 2019.
- NASCIMENTO, M. M. G., BERTOLLO, C. M., Avaliação da Efetividade e Segurança do dolutegravir: uma Revisão da Literatura. Congresso Brasileiro de FARMACIA HOSPITALAR. XI Congresso & XII Sul Americano. Fortaleza, mai., CE, 2019.
- NEMES, M. I. B. et al., Adesão ao tratamento, acesso e qualidade da assistência em Aids no Brasil. Rev. Assoc. Med. Bras, São Paulo, 55 (2): 2009.
- SANTOS, W. M.; SECOLI, S.R.; PADOIN, S. M. M.; Potential drug interactions in patients given antiretroviral therapy. Rev. Latino-Am. Enfermagem. 2016;24:e2832.
- SILVEIRA, J. L. G. C. et al. Percepções da integração ensino-serviço-comunidade: contribuições para a formação e o cuidado integral em saúde. Interface, Botucatu, 24(15): Epub May 15, 2020.
- SILVA, N. A. Análise dos resultados da implantação de consulta farmacêutica para pessoas vivendo com HIV/Aids na farmácia escola do hospital universitário de Brasília. Trabalho apresentado ao curso de graduação em Farmácia da Universidade de Brasília, como requisito parcial para aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso. Brasília, 2016.
- VIELMO, L., CAMPOS, M. M. A., BECK, S. T., ANDRADE, C. S. Atenção farmacêutica na fase inicial de tratamento da AIDS como fator importante na adesão aos antirretrovirais. Revista Brasileira de Farmácia. 95(2): 617-635. Abril-Junho 2014. ISSN - 2176-0667.



BIDENSAIOS



ÁREA DE SUBMISSÃO: Bioensaios

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINEOPLÁSCIO DE UMA IMIDAZACRIDINA EM ASSOCIAÇÃO COM A TÉCNICA DE TERAPIA FOTODINÂMICA EM CÉLULAS DE MELANOMA.

R. CLAUDIANO¹, R. CAVALCANTI², A. PINHEIRO³, A. F. BARBOSA⁴, M. G. R. PITTA⁵,
M.J.B REGO⁶.

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Fisiologia;

^{2,3,4,5,6} Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT);

E-mail para contato: raquelclaudiano@gmail.com

RESUMO – *Melanoma é o tipo de câncer de pele mais agressivo, com altos índices de mortalidade. O melanoma apresenta altos índices de resistência às opções terapêuticas disponíveis na clínica. Uma modalidade terapêutica para tratar doenças de pele não neoplásicas e neoplásicas é a Terapia fotodinâmica (TFD), por seus benefícios e vantagens comparadas a outras modalidades. Neste estudo, o princípio da terapia fotodinâmica foi utilizado em conjunto com um imidazacridina, o LPSF/AC05, para avaliar os possíveis efeitos antineoplásicos em células de melanoma. Os testes de citotoxicidade e de migração celular revelaram que o LPSF/AC05 e o Laser apresentam promissores efeitos antineoplásico quando avaliados de forma isolada, mas não em associação com a TFD. Não foram induzidas alterações na produção de espécies reativas de oxigênio em nenhuma das condições avaliadas. Os resultados revelam certa ação do LPSF/AC05 contra células tumorais do melanoma.*

Palavras-chave: Acridina, Atividade Anticâncer, Melanoma, Laser.

ABSTRACT - *Melanoma is the most aggressive type of skin cancer, with high mortality rates. Melanoma has high rates of resistance to the therapeutic options available in the clinic. A therapeutic modality to treat non-neoplastic and neoplastic skin diseases is Photodynamic Therapy (PDT), for its benefits and advantages compared to other modalities. In this study, the principle of photodynamic therapy was used in conjunction with an imidazacridine, LPSF / AC05, to assess the possible antineoplastic effects in melanoma cells. The cytotoxicity and cell migration tests revealed that LPSF / AC05 and Laser have promising antineoplastic effects when evaluated in isolation, but not in association with PDT. No changes in the production of reactive oxygen species were induced under any of the conditions evaluated. The results reveal a certain action of LPSF / AC05 against melanoma tumor cells.*



Keywords: Acridin, Anticancer activity, Melanoma, Laser.

1. INTRODUÇÃO

Dentre os cânceres mais prevalentes, as neoplasias de pele são as mais abundantes, sendo o tipo melanoma, o mais agressivo, responsável por cerca de 75% das mortes relacionadas ao câncer de pele (BITEGHE; DAVIDS, 2017) (MILLER et al., 2019) (WARD WILLIAM, 2018). Quando diagnosticado, a terapia de escolha inicial é a ressecção cirúrgica, seguida por quimioterapia e radioterapia, porém, as altas taxas de recidiva e insucesso das alternativas terapêuticas evidenciam a necessidade de desenvolvimento de novas opções de tratamento (MATTIA et al., 2018) (TUDOR et al., 2017)(COHEN; BUCHBINDER, 2019) (ALMEIDA, 2016).

Uma modalidade terapêutica bem estabelecida contra doenças de pele neoplásicas e não neoplásicas é a terapia fotodinâmica (TFD), que representa uma categoria de terapia antitumoral bastante promissora, devido à sua ação contra as células neoplásicas. Trata-se de um tratamento não invasivo, com alto perfil de segurança, sem importantes efeitos colaterais ao paciente, que vem sendo cada vez mais explorada na literatura (TUDOR et al., 2017) (BORGIA et al., 2018) (BITEGHE; DAVIDS, 2017). A TFD já é utilizada em tratamentos de tumores de bexiga, esôfago, pulmão e algumas doenças dermatológicas neoplásicas (STRATEN et al., 2017). A técnica se baseia na administração de um fotossensibilizador, seguida de ativação por meio de luz em determinado comprimento de onda, levando à geração de altos níveis *reactive oxygen species* (ROS), e conseqüentemente a morte das células tumorais, de maneira específica. (PEREIRA et al., 2018)(PATRIZIA AGOSTINIS¹, KRISTIAN BERG², KEITH A. CENGEL³, THOMAS H. FOSTER⁴ et al., 2012) (BORGIA et al., 2018). O número de pesquisas envolvendo essa técnica tem aumentado gradualmente, tendo em vista suas características e a necessidade de desenvolvimento de novas opções para tratamento de câncer.

Cada vez mais pesquisas têm sido desenvolvidas, com o objetivo de se obter maiores elucidações a respeito de moléculas com potenciais ações antineoplásicas, dentre elas, moléculas que vem se destacando, com muitos achados na literatura apontando para sua potencial ação contra células tumorais, são os derivados de acridina. Trata-se de moléculas biologicamente ativas, bem conhecidas, amplamente utilizadas, com diversas propriedades biológicas, e dentre elas, propriedades com potencial efeito antineoplásico (LAFAYETTE et al., 2013). As atividades anticâncer são atribuídas às suas características intercalantes de DNA (FELIP-LEÓN et al., 2018) (BARROS et al., 2012). Utilizamos um derivado de acridina, em especial, que vem sendo relatado na literatura com diversas ações antitumorais, entre outras. O referido derivado de acridina é uma imidazacridina, resultante de hibridização molecular dos núcleos imidazolidina e acridina (3-acridin-9-ylmethylthiazolidine-2,4-dione (7), (LPSF/AC05). Neste estudo, fizemos a associação do derivado de acridina com a técnica de TFD, afim de se somar suas características e potencializar o provável efeito antineoplásico gerado por essa sociedade.

A relação da TFD com compostos de acridina não é recente, desde sua descoberta a associação de ambas é relatada como potente em provocar injúria celular (FELIP-LEÓN et al., 2018). Então, levando em conta todas as propriedades biológicas apresentadas pelas acridinas e seus derivados, assim como sua comprovada eficácia junto à TFD, este trabalho buscou avaliar os possíveis efeitos antineoplásicos da associação entre o LPSF/AC05 com a estratégia da TFD. Para a técnica de TFD, utilizamos Laser de luz vermelha, e Ácido aminolevulpinico (ALA) como fotossensibilizador.



2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Ensaio de citotoxicidade

Para o presente trabalho foram utilizadas células de melanoma, A375, SK-MEL-28 e UACC-62. Para os primeiros ensaios da TFD, se administrou inicialmente o LPSF/AC05 nas concentrações de 1 μ M, 25 μ M e 50 μ M. Nas condições onde o laser foi administrado com o ALA, estabeleceu-se a concentração a 250 μ M para o ALA, conforme o desenho experimental. Para a eficácia da terapia fotodinâmica, antes que se houvesse a administração do laser, se administrou o ALA e/ou o LPSF/AC05. Para a irradiação das células se utilizou o laser portátil (MM Optics, Brasil), que emite luz vermelha no comprimento de onda de 660nm, com potência de 100mW +/- 20%. Foi realizado o ensaio de citotoxicidade, inicialmente, pelo método de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT). Além das condições experimentais, houveram o grupo controle, que foi representado por células não tratadas, havendo também o grupo de células tratadas com o DMSO (veículo), e células tratadas com a Doxorrubicina a 1 μ M, como controle positivo. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços de cor preta, (0,5 x 10⁴ células por poço) e mantidas a 37 °C e 5% de CO₂. Após 24 horas do plaqueamento, foram incubadas as condições experimentais: LPSF/AC05 nas concentrações de 1, 25 e 50 μ M; ALA dissolvido em meio completo nas doses de 250, 1000 e 2000 μ M; Irradiação a laser a 1, 2 e 3J/cm²; LPSF/AC05 nas doses de 1 μ M, 25 μ M e 50 μ M + Laser 2J/cm²; ALA 250 μ M + laser; LPSF/AC05 nas doses de 1 μ M, 25 μ M e 50 μ M + Laser 2J/cm² + ALA 250 μ M. A leitura do experimento foi realizada em um leitor de microplacas (El808–Biotek) a 570nm. Com os valores obtidos no ensaio, foi possível calcular o IC₅₀.

2.2 Ensaio de Migração celular (Wounding healing)

O ensaio de *wounding healing* foi realizado para análise da migração celular. As células foram incubadas em placas pretas de 24 poços, com densidade de 4 x 10⁴ células por poço. Ao atingir a confluência adequada de aproximadamente 90%, foi feito um risco no meio dos poços com ponteira de 10 μ L, e tratadas com as devidas condições experimentais logo em seguida. Após adição dos compostos, foram feitas imagens nos intervalos de tempo de 0h e 24h. As imagens foram obtidas através do microscópio invertido Nikon (eclipse TS 2) e analisadas no software image J (Java 1.8.0_112). Para análise dos resultados, foram utilizadas as médias das duplicatas de cada condição e a razão da área livre entre os tempos de 24h e 0h.

2.3 Mensuração de espécies reativas de oxigênio

Foi realizado o ensaio de mensuração dos níveis de ROS, por citometria de fluxo. As células foram plaqueadas em placas pretas de 24 poços, na densidade de 4 x 10⁴ células por poço, mantidas a 37°C e 5% de CO₂, por 24h. Após o período esperado, foi realizado o tratamento nas células seguindo as seguintes condições: LPSF/AC05 em diferentes condições, LPSF/AC05 + TFD e TFD de forma isolada; Laser sozinho; células não tratadas; Células com DMSO. Foram analisadas as ROS produzidas após o período de 24h e 48h, tanto mitocondrial como citoplasmática, com sonda CellROX® Oxidative Stress Reagents (Molecular Probes).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaio de Citotoxicidade e Seletividade



O ensaio de citotoxicidade revelou diferenças quanto a viabilidade das linhagens neoplásicas avaliadas, frente a incubação com o LPSF/AC05 de maneira isolada e em combinação com a TFD. Nas células SK-MEL-28 e A375 não houve redução significativa da viabilidade celular em nenhuma das condições avaliadas do derivado de acridina isolado, apenas em associação com TFD nas células de A375. Já as células UACC-62 apresentaram maior sensibilidade ao LPSF/AC05, tanto isolado quanto em associação com a TFD (Tabela 1). Essas diferenças podem ser atribuídas as diferenças entre os perfis moleculares das células de melanoma (MATTIA et al., 2018). Não foi observada toxicidade do LPSF/AC05 em células mononucleares de sangue periférico (PBMC), com $IC_{50} > 100\mu M$. A análise do índice de seletividade (IS), foi realizado por nosso grupo, a partir de células mononucleares de sangue periférico, conforme descrito por Chagas et al (2016) onde compostos com valor de $IS > 3$ foram considerados de alta seletividade (ISLAM et al., 2016). Os experimentos posteriores foram realizados apenas com as células UACC-62 devido a maior sensibilidade ao tratamento.

Os resultados do ensaio de citotoxicidade apontaram para a provável ação antineoplásica por parte do LPSF/AC05, uma vez que a redução a viabilidade celular ocorreu de maneira significativa em célula de melanoma ao passo que não induziu citotoxicidade em PBMC, evidenciando sua seletividade. A redução da viabilidade celular quando administrado o derivado de acridina em associação com a TFD sugere à provável ação conjunta do derivado com a TFD uma vez que não houve redução significativa da população de células quando a última foi aplicada de forma isolada.

Tabela 1 - Valores de IC_{50} e do IS das células A375, UACC62 e SKMEL-28 quando submetidas às condições testadas. $P \leq 0,05$. $IS^* = IC_{50}$ células normais/ IC_{50} células tumorais. PBMC: Células mononucleares de sangue periférico

Treatment	A375	UACC62	SKMEL-28	PBMC
AC05	$\geq 50\mu M$	$28,74\mu M \pm 0,9$	$\geq 100\mu M$	$\geq 100\mu M \pm 0$
TFD1	$V\% > 50$	$V\% > 50$	$\geq 100\mu M$	
AC05 + TFD1	$31,24\mu M \pm 4,24$	$20,41\mu M \pm 1,3$	$\geq 100\mu M$	
*IS LPSF/AC05	> 2	$> 3,4$	-	
*IS AC05+TFD1	$> 3,2$	$> 4,8$	-	

3.2 Ensaio de Migração

Uma vez que os menores valores de IC_{50} foram observados nas células UACC-62, as células SK-MEL-28 e A375 não foram submetidas aos ensaios posteriores. A combinação da TFD com o LPSF/AC05 (TFD-ACO5I e TFD-ACO5II) não promoveu alterações significativas na inibição da migração das células UACC-62 em nenhuma das duas concentrações testadas ao final de 24h. No entanto, a incubação com o LPSF/AC05 sozinho inibiu de forma considerável a migração celular (Figura 1). A inibição da migração ocasionada pelo LPSF/AC05 mostra seu potencial efeito inibitório sobre a motilidade celular, o qual por sua vez sugere efeito anti-migratório sobre as células UACC-62. A ausência de alterações na associação do derivado de acridina com a TFD revela que a combinação dos tratamentos não tem efeitos sobre a migração das células UACC-62. A associação não produz eficácia quanto a inibição da migração, mas apresenta toxicidade ao final de 72h. Assim, o LPSF/AC05 possui ação tanto citotóxica quanto inibitória de migração ao final de 24h, apontando para seu possível potencial de ação contra células tumorais de melanoma.

A

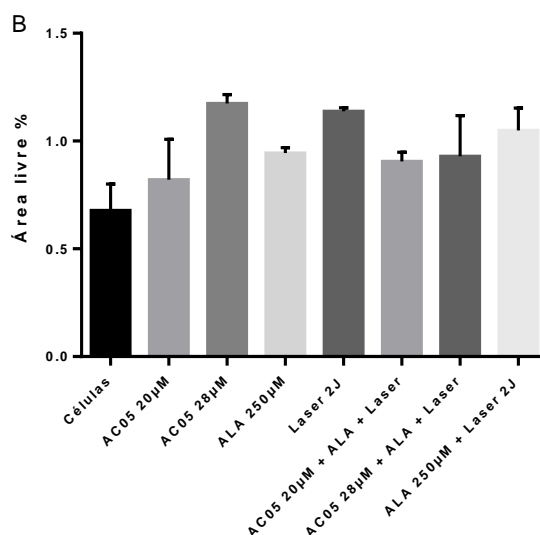
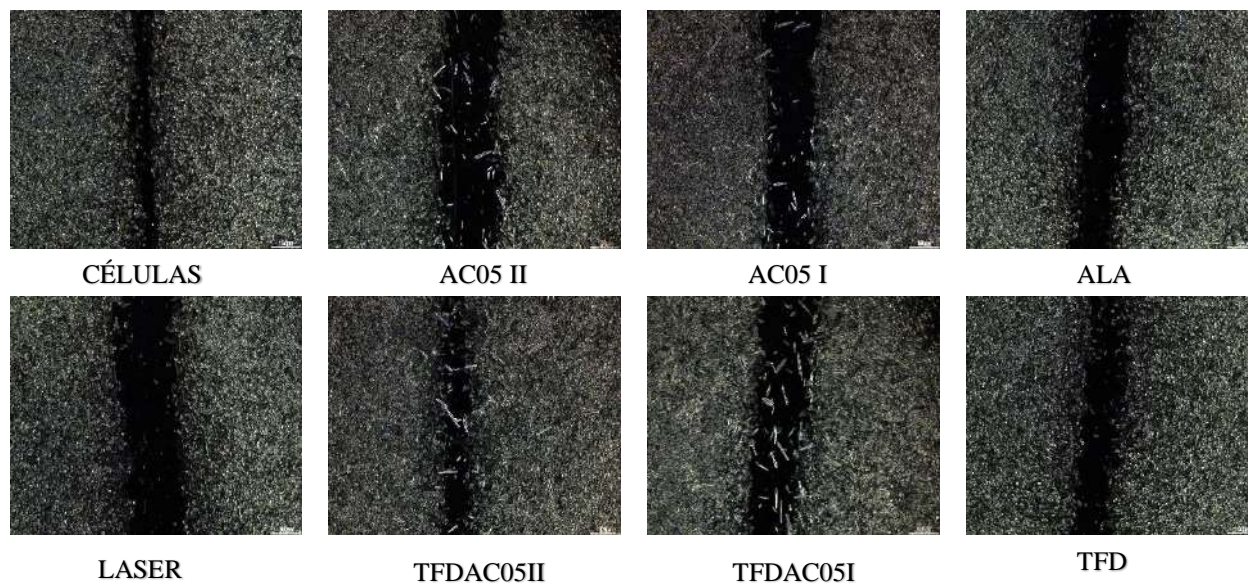


Figura 1 - Wounding healing nas células UACC-62. (A) Fendas após o período de 24h nas condições testadas (B) Razão da condição/Veículo das condições testadas, após 24h. $p \leq 0,05$.

3.3 Mensuração de ROS

A fim de se elucidar por meio de qual mecanismo de ação ocorreu os achados de citotoxicidade os níveis de ROS mitocondrial e nuclear foram mensurados. Os resultados de produção de ROS mitocondrial e citoplasmático revelaram que em 24h houve uma maior produção de ROS no citoplasma na condição em que houve apenas administração de laser, porém na mitocôndria, o ROS encontrava-se mais elevado na condição do AC05II, como também na de laser isolado. Nas outras condições experimentais não foram observadas diferenças na indução de ROS (Figura 2). Após 48h de tratamento, a produção de ROS foi maior onde houve a administração do AC05 de

forma isolada, como também nas condições onde houve apenas a radiação com laser, tanto no citoplasma quanto na mitocôndria (Figura 2). A combinação da TFD com o composto não promoveu alterações na produção de ROS em nenhum dos compartimentos celulares avaliados. Em suma, todos os achados apontam para uma provável ação antineoplásica por parte do LPSF/AC05. O não aumento de ROS para as condições onde foram tratadas células com TFD, mesmo que em associação com o derivado de acridina, confirma os achados anteriores, de que a técnica não se mostrou eficaz contra células de melanoma *in vitro*. Todos os ensaios culminaram na conclusão da potencial ação antineoplásica do derivado de acridina, agora, contra o melanoma, de forma *in vitro*, com provável mecanismo de ação independente de ROS.

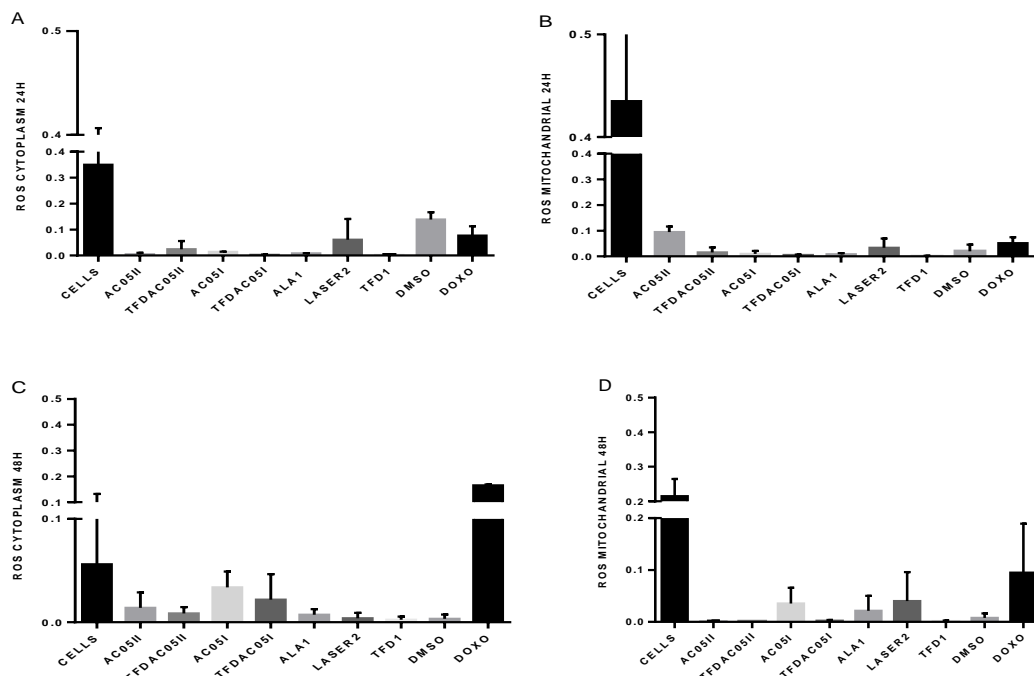


Figura 2 - Produção de ROS citoplasmático e mitocondrial em 24 e 48h.

4. CONCLUSÃO

O presente trabalho revelou a potencial ação citotóxica contra células de melanoma do derivado LPSF/AC05, bem como ação contra migração celular, por mecanismos independentes da produção de ROS. O derivado de acridina em associação com a TFD não apresenta eficácia antineoplásica, porém todos os achados relacionados ao LPSF/AC05 sugerem a realização de trabalhos futuros, que possam elucidar os mecanismos de ação responsáveis pela citotoxicidade, e demais características antineoplásicas apresentadas por ele, como a inibição da migração celular. Contudo, são necessário pesquisas mais aprofundadas, tanto nas vias isoladas como na combinação dos tratamentos aqui estudados, para melhor compreensão de sua forma de ação antineoplásica.

5. REFERÊNCIAS

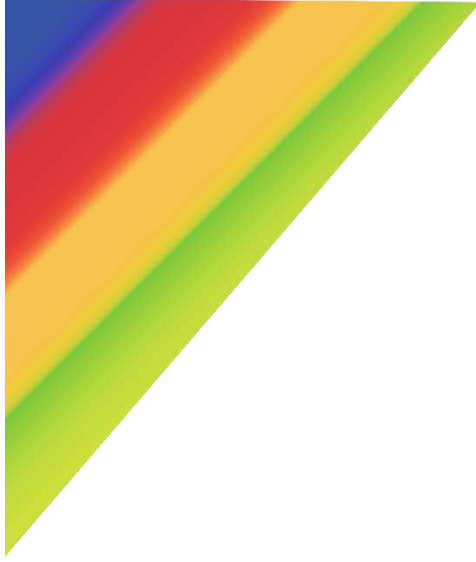
- ALMEIDA, D. B. DE. Recidiva tardia de melanoma cutâneo: relato de caso. p. 16–17, 2016.
 BARROS, F. W. A. et al. Synthesis and cytotoxic activity of new acridine-thiazolidine derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 20, n. 11, p. 3533–3539, 2012.



- BITEGHE, F. N.; DAVIDS, L. M. A combination of photodynamic therapy and chemotherapy displays a differential cytotoxic effect on human metastatic melanoma cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 166, p. 18–27, 2017.
- BORGIA, F. et al. Early and Late Onset Side Effects of Photodynamic Therapy. 2018.
- COHEN, J. V; BUCHBINDER, E. I. The Evolution of Adjuvant Therapy for Melanoma. 2019.
- CHAGAS, M. Avaliação da Atividade Anticâncer e Mecanismo de Ação de Novos Agentes Acridínicos. [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2016.
- FELIP-LEÓN, C. et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Synthesis*, spectroscopic studies and biological evaluation of acridine derivatives: The role of aggregation on the photodynamic efficiency. v. 28, p. 869–874, 2018.
- LAFAYETTE, E. A. et al. Synthesis, DNA binding and topoisomerase i inhibition activity of thiazacridine and imidazacridine derivatives. *Molecules*, v. 18, n. 12, p. 15035–15050, 2013.
- MATTIA, G. et al. Cell death-based treatments of melanoma: conventional treatments and new therapeutic strategies. *Cell Death and Disease*, 2018.
- MILLER, K. D. et al. *Cancer Treatment and Survivorship Statistics*, 2019. v. 69, n. 5, p. 363–385, 2019.
- PATRIZIA AGOSTINIS¹, KRISTIAN BERG², KEITH A. CENGEL³, THOMAS H. FOSTER⁴, A. W. G. et al. PHOTODYNAMIC THERAPY OF CANCER: AN UPDATE. v. 61, n. 4, p. 250–281, 2012.
- STRATEN, D. VAN et al. *Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions*. p. 1–54, 2017.
- TUDOR, D. et al. Combined regimen of photodynamic therapy mediated by Gallium phthalocyanine chloride and Metformin enhances anti-melanoma efficacy. p. 1–23, 2017.

6. AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – INCT, ao Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas – LINAT.



BIOLOGIA MOLECULAR



ÁREA DE SUBMISSÃO: **Biologia Molecular**

RNA DE INTERFERÊNCIA E SUA APLICABILIDADE NAS NEOPLASIAS

ALEIXO, L. L. P.¹ e BARBOSA, E. A. S.¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami;
E-mail para contato: lucas.aleixo@ufpe.br, elias.almeidabarbosa@ufpe.br

RESUMO – *O RNA de interferência (RNAi) apresenta-se como um dos principais mecanismos biológicos na correção de possíveis alterações no processo de transcrição proteica, atuando no RNA mensageiro. As neoplasias, processos que induzem a proliferação exacerbada das células, levam a morte celular induzida por apoptose e constituem a maior ameaça à saúde pública global uma vez que toda a população mundial está suscetível ao surgimento de cânceres, seja devido aos hábitos alimentares que podem ter efeito mutagênico, seja devido às demais causas de mutação genética ou de má conformação proteica. Embora existam vários tratamentos, muitos deles possuem atuação muito invasiva ou com efeitos colaterais severos. Visto isso, trazemos nessa revisão a aplicabilidade do RNAi como terapia alternativa no tratamento oncológico.*

Palavras-chave: RNAi, Câncer, mutação, terapia alternativa, mRNA.

ABSTRACT - *The RNA interference presents itself as a paramount biological mechanism in the repairment of possible alterations in protein transcription process by acting in the regulation of mRNA. The neoplasias, processes that induce an exacerbation in cell proliferation and to cell death via apoptosis, constituted the biggest threat to world's public health, once the entire world is susceptible to the appearance of cancers, either due to eating habits that can have a mutagenic effect, or due to other causes of genetic mutation or protein malformation. Although there are several treatments, many of them are very invasive or have severe side effects. According to that, we bring in this review the applicability of RNAi as an alternative therapy in cancer treatment.*

Keywords: RNAi, cancer, mutation, alternative therapy, mRNA.

1. INTRODUÇÃO

O termo RNAi se refere às moléculas que são capazes de silenciar e/ou inibir a transcrição do mRNA. O início do processo de interferência pós-transcricional dá-se a partir de um transcrito do DNA, denominado de pri-miRNA, que após sofrer um processo de clivagem pela enzima DROSHA, juntamente com uma enzima zinco-dependente denominada de *DiGeorge syndrome critical region 8* (DGCR8), transforma-se em um pré-miRNA (YONG X et al, 2017). Este, por



sua vez, é transportado para fora do núcleo pela proteína argonauta, sendo novamente clivado por uma proteína DICER que poderá dar origem a um miRNA ou a um siRNA. O miRNA possui ação inibitória na atividade translacional do mRNA ligando-se na porção 2'-3', enquanto o siRNA é um RNA de fita dupla que liga-se a um complexo proteico denominado RISC, do inglês *RNA-induced silencing complex*, que descarta uma de suas fitas, enquanto a outra irá clivar ou bloquear algum alvo no mRNA (LI, S. e PATEL, D, 2016; WILSON RC e DOUDNA JA, 2013).

O câncer é uma doença que se caracteriza pela multiplicação celular desordenada e reparação celular, diferenciação e interação célula/tecido/hospedeiro aberrantes, de caráter maligno, gerado como consequência de alterações genéticas e epigenéticas acumuladas ao longo do tempo ou causadas por fatores diretos, como exposição à radiação, fármacos extremamente mutagênicos, entre outros (SKUSE A, 2015). Essas neoplasmas podem aparecer em quase todos os órgãos humanos, podendo crescer em tamanho físico ou não, como é o caso da leucemia. A nível celular, o mecanismo dos neoplasmas podem variar bastante, no entanto a premissa é a mesma: células que devido a mutações, passam a não seguir o ciclo de vida pré-definido, faltando-lhes o mecanismo de ativação da apoptose - que leva a morte celular - além de ativação de processos mitóticos de proliferação que se tornam imparáveis (FOLKERTS J, 2017) .

A fim de tratar os pacientes, várias estratégias de terapias já foram propostas, sendo as mais tradicionais a quimioterapia, radioterapia, a cirurgia para remoção de tumor e a imunoterapia. Atualmente, emprega-se as terapias a depender do caso e do tipo de tumor, sendo recomendado a radioterapia e retirada do tumor via cirurgia, caso se trate de uma neoplasma localizada. Para metaplasias ou tumores maiores, recomenda-se a imunoterapia ou a quimioterapia, na qual fármacos específicos para os tipos de câncer, visam a interrupção do ciclo celular, diminuindo o tamanho do câncer, além de diminuir a chance de espalhamento do câncer e reduzir sintomas recorrentes (TRAPANI JA e DARCY PK, 2017). No entanto, os fármacos quimioterápicos também acarretam uma série de efeitos colaterais nos pacientes, além de diminuir o número de células do sistema imune (FURUE H. 2003). Por isso, a comunidade científica internacional tem se movimentado a fim de traçar novas estratégias e terapias para aplicação no câncer.

Uma dessas terapias é o RNAi, visto que se trata de uma terapia que envolvem silenciamento gênico específico, podendo então silenciar genes causadores de fatores aberrantes celulares, como proliferação exacerbada, divisão celular, expressão de imunossuppressores, entre outros (WANG et al, 2011). Várias estratégias de aplicação de RNAi tem sido aplicada para diferentes tipos de câncer. Muitas delas, são associadas a outras terapias, como a imunoterapia e quimioterapia. Uma dessas moléculas é a APN401, que utiliza de um siRNA para aumenta a reatividade do sistema imune antitumoral através do uso da terapia de vacinação por células dendríticas, que utilizaram de lisados de tumores pancreáticos como antígeno (APEIRON BIOLOGICS, 2014). Essa terapia está sendo aplicada a pacientes com tumores refratários sólidos como melanomas, câncer renal, câncer pancreático e outros tumores metastáticos que não podem passar por cirurgia.

A terapia visa tratar células mononucleares do sangue periférico com siRNA associado ao gene Cbl-b. Através desse silenciamento, é possível melhorar a ativação de células T, produção de citocinas e a proliferação de células imunes, uma vez que o gene Cbl-b é expresso como um imunossupressor em células tumorais (MAGGIE L. BOBBIN e JOHN J. ROSSI, 2016; SALZBERG MO et al, 2014). Outra terapia que se utiliza de vacina para câncer como vetor é a FANG (NENUNAITIS J et al, 2014.). Esta abordagem utiliza de DNA de plasmídeo contendo um único promotor de RNA polimerase II para induzir a expressão de GM-CSF e dois shRNAs bifuncionais *downstreams*, que consistem em uma combinação. Esse shRNA tem por alvo a furina, a qual é uma protease para TGF- β maturação isoforme, porque o TGF- β é um imunossupressor



super expressado no câncer. Uma alternativa para a utilização de RNAi, é através de nanopartículas de lipídios, como é o caso da TKM-PLK1. A terapia com TKM-PLK1 tem sido usada para tratar tumores neuroendócrinos gastrointestinais, hepatocarcinomas e carcinomas adrenocorticais. Ele se utiliza dessas nanopartículas para entregar siRNA contra o gene polo-like quinase (PLK), que é super expressado no câncer, aumentando a divisão celular (HOFFMANN M e STEEGMAIER et al, 2007).

O silenciamento pelo siRNA causa inibição do mecanismo de divisão celular, e, uma vez aplicado em tumores neuroendócrinos, as nanopartículas conseguem se distribuir melhor devido as vias dos hormônios secretados. O EphA2 é um receptor de superfície tipo tirosina quinase envolvido na migração celular neuronal e no desenvolvimento de mamíferos que é ausente em tecidos adultos. A molécula f siRNA-EphA2-DOPC *knockdown* o receptor EphA2. Envolvidas por lipossomos, o siRNA EphA2 tem atividade anti neoplásicas, pois interferem tanto na transcrição como na tradução EphA2, portanto restringindo o crescimento celular (LANDEN CN jr, 2005). Em modelos pré clínicos, EphA2 *knockdown* leva a redução da mutagenicidade em câncer de mama e pancreático. O adenocarcinoma ductal representa grande parte dos cânceres de pâncreas e possui poucos tratamentos disponíveis, a maioria por cirurgia. O siG12D LODER é composto de ácido glicólico poli lático como matriz e um siRNA não modificado contra o KRASG12D, uma versão mutante do gene KRAS, o qual é superexpresso em grande parte dos adenocarcinomas ductais pancreáticos (ZORD et al, 2013).

Com base nas informações acima elencadas, esta revisão de literatura visa demonstrar evidências científicas achadas por demais autores que há viabilidade de aplicação de terapias baseadas em RNAi no tratamento de neoplasias.

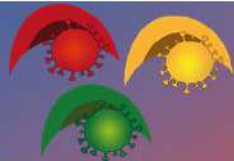
2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado um levantamento de dados e posterior revisão de literatura com base em artigos disponíveis nas plataformas *PubMed*, *Google Scholar*, *Scopus* e *Scielo*.

3. RESULTADOS

Devido ao avanço biotecnológico, diversas moléculas de RNAi podem ser desenhadas e sintetizadas atualmente, cada qual com sua nanoestrutura, podendo atuar nos mais diversos tecidos. Por se tratar de uma técnica ainda não utilizada amplamente e que carece de avanço nas pesquisas clínicas a fim de que haja a aprovação do uso delas, foi montada uma tabela abaixo (Tabela 1) demonstrando a atuação dessas moléculas silenciadoras em diferentes fases clínicas, e em diversos tipos de neoplasias.

Número do Registro do teste clínico	Tipo de Molécula RNAi	Câncer atuante	Fase dos testes clínicos	Resultados	Previsão de conclusão
-------------------------------------	-----------------------	----------------	--------------------------	------------	-----------------------



NCT02346747	APN401 - células mononucleares do sangue periférico transfectadas com siRNA APN401	Melanoma, câncer de rim, câncer de pâncreas ou outros tumores sólidos que são metastáticos ou que não podem ser removidos pela cirurgia.	FASE 1	Em conjunto com a segurança demonstrada, a alta taxa de indução da ativação das células T e a correlação com a melhoria no RFS justificam uma avaliação mais aprofundada da Vigil na Fase II / III.	Concluído em 2016
NCT02166255	FANG - bi-shRNAfurin e GMCSF	Câncer de ovário em estágio de alto risco IIIb-IV	FASE 2	Resultados ainda não disponíveis	Agosto de 2021
NCT01829971	MicroRNA miR-RX34	Câncer primário do fígado; SCLC; Linfoma; Melanoma; Mieloma múltiplo; Carcinoma de células renais; NSCLC;	FASE 1	Houve entrega de miR-34a aos tumores e modulação dependente da dose da expressão do gene alvo nos glóbulos brancos	Setembro de 2016
NCT01437007	TKM 080301 - siRNA contra o PLK1	Câncer colorretal com metástases hepáticas Câncer de pâncreas com metástase hepática Câncer gástrico com metástase hepática Câncer de mama com metástase hepática Câncer de ovário com metástase hepática	FASE 1	Bloqueou a proliferação de células Hela S3 a uma EC 50 de 45 nM	Junho de 2012



NCT01676259	siG12D LODER	Adenocarcinoma ductal pancreático; Câncer de pâncreas	FASE 2	Resultados ainda não disponíveis	Junho de 2020
NCT01591356	EphA2 siRNA	Neoplasia Sólida Maligna Avançada	FASE 1	Resultados ainda não disponíveis	Julho de 2021

Tabela 1: Na tabela acima pode-se observar os diversos tipos de RNAi que já foram testados em alguma fase clínica, em diversos tipos de neoplasias e seus respectivos resultados. (BOBBIN et al, 2016)

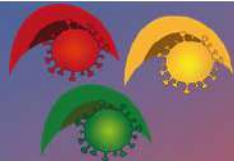
Observa-se porém que mesmo com bons resultados clínicos, os impasses da aplicabilidade de RNAi em procedimentos que possam ser utilizados comumente em tratamentos deve-se ao fato de ainda não existir uma garantia de que essas moléculas silenciadoras serão entregues nos tecidos acometidos por neoplasias, situação essa que poderia trazer outros problemas que afetariam a saúde do possível paciente. No entanto, estudos utilizando compostos nanoencapsulados vem sendo realizados no intuito de solucionar esta problemática, visto que estes conseguem ser direcionados para tecidos específicos.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se então que as terapias baseadas em RNAi no tratamento de neoplasias podem de fato oferecer um novo tipo de abordagem menos agressiva do que as convencionais, tais como, quimioterapia e procedimentos cirúrgicos. No entanto, ainda persistem alguns obstáculos que precisam ser ultrapassados, como a manutenção e permanência deste tipo de molécula durante a terapia. Além disso, em muitos estudos o delivery do RNAi nas células específicas ainda não demonstrou ser tão eficaz, sendo necessário uma validação e um aprimoramento da viabilização das rotas de inoculação dessas moléculas em tratamentos clínicos.

5. REFERÊNCIAS

- Apeiron Biologics. 2014. APN401 (Cbl-b). Disponível em: <http://www.apeironbiologics.com/index.php/projects/apn401-cbl-b.html>. Acessado em: 10/07/2020
- Furue H. Gan To Kagaku Ryoho. 2003;30(10):1404-1411.
- Krieghoff-Henning E, Folkerts J, Penzkofer A, Weg-Remers S. Cancer – an overview. Krebs – ein Überblick. Med Monatsschr Pharm. 2017;40(2):48-54.
- Landen CN Jr, Chavez-Reyes A, Bucana C, Schmandt R, Deavers MT, et al. 2005. Therapeutic EphA2 gene targeting in vivo using neutral liposomal small interfering RNA delivery. Cancer Res. 65:6910–18
- Li, S., Patel, D. Drosha and Dicer: Slicers cut from the same cloth. Cell Res 26, 511–512 (2016). <https://doi.org/10.1038/cr.2016.19>
- Maggie L. Bobbin and John J. Rossi. RNA Interference (RNAi)-Based Therapeutics: Delivering on the Promise?. Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 2016 56:1, 103-122



Nemunaitis J, Barve M, Orr D, Kuhn J, Magee M, et al. 2014. Summary of bi-shRNA/GM-CSF augmented autologous tumor cell immunotherapy (FANG) in advanced cancer of the liver. *Oncology* 87:21–29

Salzberg MO, Lametschwandtner G, Schuster M, Loibner H, Sachet M, et al. 2014. Development of a personalized cellular ex-vivo CBL-b silencing cancer immunotherapy. *Proc. 2014 ASCO Annu. Meet., Chicago, IL*

Shen H, Rodriguez-Aguayo C, Xu R, Gonzalez-Villasana V, Mai J, et al. 2013. Enhancing chemotherapy response with sustained EphA2 silencing using multistage vector delivery. *Clin. Cancer Res.* 19:1806–15

Skuse A. *Constructions of Cancer in Early Modern England: Ravenous Natures* [Internet]. London (UK): Palgrave Macmillan; 2015. Chapter 1, What Was Cancer? Definition, Diagnosis and Cause. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547261/>. Acessado em: 10/07/2020

Stegmaier M, Hoffmann M, Baum A, et al. BI 2536, a potent and selective inhibitor of polo-like kinase 1, inhibits tumor growth in vivo. *Curr Biol.* 2007;17(4):316-322.

Trapani JA, Darcy PK. Immunotherapy of cancer. *Aust Fam Physician.* 2017;46(4):194-199.

Wang Z, Rao DD, Senzer N, Nemunaitis J. RNA interference and cancer therapy. *Pharm Res.* 2011;28(12):2983-2995. doi:10.1007/s11095-011-0604-5

Wilson RC, Doudna JA. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu Rev Biophys.* 2013;42:217-239. doi:10.1146/annurev-biophys-083012-130404

Yong Xin , Min Huang, Wen Wen Guo , Qian Huang1 , Long zhen Zhang1 and Guan JiangXin, Y., Huang, M., Guo, W.W. et al. Nano-based delivery of RNAi in cancer therapy. *Mol Cancer* 16, 134 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0683-y>.

Zorde Khvalevsky E, Gabai R, Rachmut IH, Horwitz E, Brunschwig Z, et al. 2013. Mutant KRAS is a druggable target for pancreatic cancer. *PNAS* 110:20723–28

6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami por prover o apoio necessário para a realização desta revisão de literatura.



ÁREA DE SUBMISSÃO: **Biologia Molecular**

BIOMARCADORES DE RELEVÂNCIA NO DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DO CÂNCER GÁSTRICO

A.R. N. de SALES¹, E.B.F. GOMES ¹, L.V. B. OLIVEIRA¹, A.A SILVA Jr²

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico do Agreste, Núcleo de Ciências da Vida;

² Doutorando em Cancerologia pelo Programa de pós-graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências. .

E-mail para contato: leonardoo08@hotmail.com

RESUMO - *Introdução: O câncer gástrico ainda é uma importante causa de mortalidade no mundo, principalmente pelo diagnóstico tardio na maioria dos pacientes, a sobrevida tende a ser limitada além de apresentar um expressivo número de recidivas. Atualmente, observa-se um maior esforço científico para detectar precocemente o câncer gástrico, que devido ao advento da engenharia genética, através dos biomarcadores, há maiores chances de ser identificado. Objetivo: Verificar os principais novos biomarcadores envolvidos no diagnóstico e prognóstico do câncer gástrico, caracterizando as possíveis aplicabilidades, limitações e desafios deles. Metodologia: Trata-se de revisão integrativa, realizada por meio de uma pesquisa bibliográfica nas bases de dados MEDLINE/PubMed e ScienceDirect, com a utilização dos descritores gastric cancer OR stomach neoplasms AND biomarker. Foram incluídos artigos em inglês, texto completo disponível e publicados nos últimos cinco anos. Os critérios de exclusão foram relacionados ao tipo do texto, ao passo que relatos de caso/experiência e editoriais foram excluídos. Resultados: Foram selecionados 12 artigos para compor essa revisão literária sobre os biomarcadores de câncer gástrico, sendo descritos 9 dos mais novos marcadores tumorais, sendo eles o HER-2, E-caderina, MET, o qual é receptor do fator de crescimento dos hepatócitos (HGF-R), Microssatélites, o FGFR-2, VEGF, PD-L1, MiRNA e o FOX-M1. Estes biomarcadores podem auxiliar no diagnóstico, prognóstico e tratamento do câncer gástrico, uma doença que ainda possui elevada taxa de letalidade. Conclusão: Os 9 marcadores descritos demonstram uma potencial habilidade para diagnosticar, prognosticar e prever a resposta clínica a alguns medicamentos.*

Palavras-Chave: câncer de estômago, marcadores tumorais, metástase gástrica,

ABSTRACT - *Introduction: Clinical cancer is still an important cause of mortality in the world, since most patients are diagnosed with advanced disease. As a result, there is a drastic decrease in treatments and in the average survival of diagnosed patients. No advances in genetic*



engineering, an advanced molecular biology and initiated in the search for biomarkers Objective: To verify the main new biomarkers involved in the diagnosis and prognosis of gastric cancer, characterizing them as possible applications, tests and challenges. Methodology: this is an integrative review, carried out through a bibliographic search in the databases MEDLINE / PubMed and ScienceDirect, using the descriptors of gastric cancer OR stomach neoplasms and biomarker. Articles in English, full text available and published in the last five years were included. The exclusion criteria were related to the type of text, while case / experience and editorial reports were excluded. Results: 12 articles were selected to compose this literary review on gastric cancer biomarkers, with 9 of the newest tumor markers being described, namely HER-2, E-cadherin, MET, which is a receptor for hepatocyte growth factor (HGF -R), Microsatellites, FGFR-2, VEGF, PD-L1, MiRNA and FOX-M1. These biomarkers can assist in the diagnosis, prognosis and treatment of gastric cancer, a disease that still has a high mortality rate. Conclusion: The 9 registered markers demonstrated a potential ability for diagnosis, prognosis and prediction of clinical response to some drugs.

Keywords: stomach cancer, tumor markers, gastric metastasis

1. INTRODUÇÃO

O câncer gástrico (CG) é uma das principais causas de morte por câncer, sendo a quinta neoplasia maligna mais comum no mundo. No Brasil, representa a quinta neoplasia mais frequente em homens e, no Nordeste do país, é o terceiro câncer mais frequente em homens e o sexto em mulheres, excetuando-se o câncer de pele não-melanoma (INCA, 2019). O tipo histológico mais comum é o adenocarcinoma (95%) e o principal fator de risco para o surgimento do CG é a infecção por *Helicobacter pylori*, mas outras condições são descritas, como o excesso de peso, obesidade, dieta com baixa ingestão de frutas, vegetais e fibras, consumo excessivo de álcool, tabagismo, exposição à doenças gástricas hereditárias (síndrome do câncer gástrico hereditário, polipose gástrica), toxinas e radiação ionizante (OTTAVIAX *et al.*, 2018; INCA, 2019). Em razão do prognóstico ominoso com sobrevida limitada, principalmente em virtude do diagnóstico tardio na maioria dos pacientes e da alta taxa de recidiva, existem esforços a fim de estabelecer uma detecção cada vez mais precoce de CG, modificando diretamente a história natural da doença, uma vez que estratégias terapêuticas adequadas, objetivando uma maior sobrevida ou até a cura, dependem intrinsecamente da identificação da neoplasia ainda em estágios iniciais (BARETTON; AUST, 2017).

O desenvolvimento de biomarcadores ganhou destaque nos últimos anos, pois a compreensão das estruturas presentes em vias de sinalização do CG, sejam receptores, fatores de crescimento, genes, nucleotídeos ou proteínas reguladoras, representam um potencial promissor para uma abordagem terapêutica direcionada, para a detecção precoce e para a redução considerável no risco de recidivas da doença (BARETTON; AUST, 2017; ANVAR *et al.*, 2018). Dessa forma, existem biomarcadores que são utilizados na prática clínica do câncer gástrico, mas também há pesquisas atuais que buscam marcadores neoplásicos cada vez mais sensíveis, específicos e de fácil acesso.

Essa revisão tem como objetivos identificar os principais novos biomarcadores envolvidos no diagnóstico e prognóstico do câncer gástrico, caracterizando as possíveis aplicabilidades clínicas, limitações e os desafios presentes no desenvolvimento de cada um deles. No presente



estudo, não abordaremos os biomarcadores convencionais, a exemplo do antígeno carcinoembrionário (CEA), do CA-19,9, do CA-125 e da alfafetoproteína (AFP), uma vez que priorizou-se a identificação de biomarcadores atuais.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de revisão integrativa, realizada por meio de uma pesquisa bibliográfica nas bases de dados MEDLINE/PubMed e ScienceDirect, com a utilização dos descritores *gastric cancer OR stomach neoplasms AND biomarker*. Os critérios de inclusão da pesquisa foram artigos em inglês, disponíveis online e publicados entre 2015 e 2020, ao passo que relatos de caso, relatos de experiências e editoriais foram excluídos da seleção, bem como os artigos que não abordaram o tema de forma direta.

As buscas dos artigos foram realizadas entre os meses de junho e julho de 2020 e, de início, os autores avaliaram títulos e resumos dos artigos encontrados para selecionar os estudos elegíveis para a produção. Dos selecionados, foram filtrados a partir de tradução e leitura minuciosa daqueles que atendiam aos critérios de inclusão e que tinham conexão importante com o tema central. Após isso, fez-se uma transcrição sistemática das informações extraídas, para possibilitar a organização dos dados de forma coerente e que atingisse o objetivo do estudo em sintetizar dados que demonstrem e analisem os principais novos biomarcadores envolvidos no diagnóstico, prognóstico e tratamento do câncer gástrico e as perspectivas futuras, de forma que limitasse e excluísse pontos de menor relevância para a produção.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na pesquisa inicial foram encontrados 30.780 resultados no total. Sendo 13.193 na MEDLINE/PubMed e 12.714 no Science Direct. Em ambas as plataformas foram usados os mesmo descritores já mencionados na metodologia. Através dos critérios de inclusão, já relatados no tópico anterior, um total de 1.272 artigos foram identificados na primeira base e 272 na segunda. Em seguida, houve uma minuciosa leitura dos títulos e resumos dos artigos encontrados e foram excluídos os relatos de caso, relatos de experiência, editoriais e todos aqueles que não se relacionavam estritamente com o tema central da pesquisa, o que resultou na seleção final de 12 artigos para compor a presente revisão. Na TABELA 1, estão descritos os biomarcadores encontrados, sendo classificados em diversas classes, como os genes relacionados à metástase, pontos de verificação imune, instabilidade de microssatélites e microRNAs.

TABELA 1. Principais novos biomarcadores moleculares associados ao câncer gástrico

Biomarcadores	Alteração	Aplicabilidade clínica	Método de detecção
HER-2	Superexpressão	Prognóstico, terapêutico	Biópsia tecidual



E-caderina (gene CDH1)	Mutação, alteração epigenética	Diagnóstico, prognóstico	Biópsia tecidual, níveis séricos
MET	Superexpressão	Prognóstico, terapêutico	Biópsia tecidual
FGFR2	Superexpressão	Prognóstico, preditor de falha terapêutica	Biópsia tecidual
Microssatélites	Alterações na quantidade, instabilidade	Prognóstico, terapêutico	Biópsia tecidual
VEGF	Superexpressão	Prognóstico	Biópsia tecidual
PD-L1	Superexpressão	Diagnóstico, terapêutico	Biópsia tecidual
MiRNA	Alteração, desregulação	Diagnóstico, prognóstico	Biópsia tecidual
FOX-M1	Alteração, mutação	Prognóstico	Biópsia tecidual

Dados adaptados de Matsuoka e Yashiro (2018) e Zhang *et al.* (2016).

Com o surgimento de novas tecnologias que possibilitaram a biologia molecular avançar bastante, no contexto dos biomarcadores tumorais, entende-se que qualquer molécula ou característica biológica que indiquem possíveis alterações fisiológicas são elegíveis como tal. Em casos de câncer essa característica pode fornecer desde informações diagnósticas e prognósticas até informações terapêuticas e preditivas sobre a doença. Há um esforço especial para identificar biomarcadores significativos a fim de se realizar um diagnóstico precoce e até um prognóstico do paciente. Nessa revisão optamos por abordar os biomarcadores mais recentes de câncer gástrico e selecionamos 9 são eles:

HER-2

O receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER-2) é um proto-oncogene localizado no cromossomo 17 pertencente à família do receptor de fator de crescimento epidérmico.



A amplificação genética e superexpressão do HER-2 favorece determinadas vias de sinalização (principalmente PI3K/Akt e MAPK), que culminam em uma maior divisão celular, proliferação e menor atividade apoptótica das células. Uma série de estudos evidenciaram uma prevalência do HER-2 em 7 a 38% dos cânceres, dentre os principais, o gástrico e, em pacientes metastáticos, esse receptor tem sido proposto como um biomarcador preditivo muito importante que permite aos médicos identificar pacientes que terão um benefício de sobrevivência de uma terapia biológica com anticorpos monoclonais e ensaios clínicos estão avaliando possíveis benefícios. No entanto, existem outros estudos que não evidenciaram uma diferença significativa no prognóstico de pacientes HER-2 positivos quando comparados aos negativos (BANIAK *et al.*, 2016; MATSUOKA; YASHIRO, 2018; PANARESE *et al.*, 2017; YE *et al.*, 2020).

E-CADERINA

Codificada pelo CDH1, gene presente no cromossomo 16, tem uma importante função na diferenciação celular adequada e na correta adesão das células epiteliais gástricas, diminuindo a chance de expressão maligna. Devido ao efeito supressor tumoral do CDH1, a disfunção desse gene, seja por mutações, silenciamento epigenético, hipermetilação ou repressão transcricional, está relacionada com carcinoma invasor e maior propensão à metástases, em virtude do funcionamento aberrante da E-caderina. Em estudos clínicos, alterações estruturais no CDH1 foram descritas em pacientes portadores da síndrome do câncer gástrico hereditário (SCGH), com padrão histológico tipo difuso e sobrevida reduzida, quando comparados à pacientes sem mutações no CDH1. Conseqüentemente, a pesquisa por alterações na E-caderina/CDH1 é indicada nos casos descritos acima com o objetivo de detecção precoce, estratificação de risco e definição de terapia nos portadores dessa síndrome hereditária (SHENOY, 2019; BANIAK *et al.*, 2016; MATSUOKA; YASHIRO, 2018; PANARESE *et al.*, 2017; YE *et al.*, 2020).

MET

O MET é um receptor do fator de crescimento de hepatócitos (HGF-R) e está presente em quinases transmembranas, fosforilando diversas vias de transdução de sinal, envolvidas no crescimento de proliferação, ciclo celular, diferenciação, angiogênese e apoptose. A superexpressão do gene que codifica o MET, situado no cromossomo 7, está associada a uma propensão maior em invadir o sistema linfático e, conseqüentemente, revelou-se um preditor de mau prognóstico e menor sobrevida livre de progressão. Portanto, espera-se que a pesquisa da superexpressão de MET em pacientes com carcinoma gástrico possa ter potencial futuro na avaliação do prognóstico da doença, bem como proporcionar o desenvolvimento de agentes terapêuticos dirigidos ao complexo (BANIAK *et al.*, 2016; MATSUOKA; YASHIRO, 2018; PANARESE *et al.*, 2017; YE *et al.*, 2020).

MICROSSATÉLITES

Microssatélites (MS) são sequências repetitivas de 1 a 6 nucleotídeos que compõem parte do material genético. Em alguns indivíduos com câncer, há instabilidade de microssatélites (MSI), isto é, alterações no número de unidades repetidas nas células tumorais em relação às células saudáveis, devido ao comprometimento do sistema reparativo de incompatibilidade do DNA. Tumores com mais de 30% de MSI são considerados de alta instabilidade e, particularmente no CG, ela surge através de silenciamento epigenético, pela hipermetilação do MLH1. Dentre outros genes relacionados a MSI que sofrem mutação, o *PIK3CA* é particularmente especial em indivíduos



com alta instabilidade, visto que agentes inibidores desse gene mostraram-se eficientes na terapêutica personalizada. Surpreendentemente, pacientes com tumores de alta instabilidade obtiveram um melhor prognóstico quando comparados aqueles com baixa instabilidade de MS, provavelmente pelo menor potencial invasivo e metastático de tumores com MSI elevado (BANIAK *et al.*, 2016; PANARESE *et al.*, 2017; MATSUOKA; YASHIRO, 2018; YE *et al.*, 2020).

FGFR-2

Os receptores de fator de crescimento de fibroblastos (FGFR), interagem com o fator para controlar diversos mecanismos celulares e, na vigência de amplificação do gene codificador, os FGFR, em particular os do tipo 2, exacerbam os processos de mitogênese, diferenciação, angiogênese e potencial invasivo do tumor. A expressão aberrante de FGFR-2 está ligada a estágios tumorais e linfonodais avançados, bem como maior potencial metastático, além de estar relacionada com maior taxa de recidiva em 5 anos nos pacientes estágio II/III que receberam tratamento cirúrgico associado à quimioterapia com fluoropirimidinas de quarta geração (S-1). Destarte, como a superexpressão de FGFR-2 possui uma prevalência considerável no CG (próxima dos níveis de HER-2 e MET), podendo auxiliar como biomarcador para prever tanto o prognóstico, como a chance de falha terapêutica e recidiva nos pacientes submetidos à ressecção cirúrgica com S-1 adjuvante (BANIAK *et al.*, 2016; PANARESE *et al.*, 2017; MATSUOKA; YASHIRO, 2018; YE *et al.*, 2020).

VEGF

A angiogênese é o processo de criação de novos vasos sanguíneos a partir de outros pré-existentes e é de extrema importância para o desenvolvimento celular. Ao se tratar de células cancerígenas, a angiogênese possui forte associação com o desenvolvimento, expansão e metástase do tumor, assim como a ausência desse processo representa pouco crescimento e malignidade dessa massa celular anormal. A família dos fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF), os quais são, principalmente, o VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, ativam vias de sinalização que estimulam o processo da angiogênese. Estudos indicam que até 49% dos cânceres gástricos possuam superexpressão de VEGF e 36% apresentam expressão aumentada do receptor de VEGF-A, assim, tanto o VEGF, quanto os seus receptores, vêm sendo estudados para serem futuros biomarcadores para o prognóstico de neoplasia maligna gástrica (ABBAS *et al.*, 2018; MATSUOKA; YASHIRO, 2018; LIU *et al.*, 2018).

PD-L1

Uma das funções do sistema imune é estabelecer a citotoxicidade em células anormais. Os monócitos, as células natural killer, células dendríticas e linfócitos T possuem o receptor da morte programada 1 (PD1), o qual é um ponto de regulação imune que determina suas funções. As células neoplásicas, mesmo anormais, conseguem regular negativamente a atividade das células de defesa e promover a tolerância imunológica. Isso acontece porque muitos tumores apresentam superexpressão dos ligantes da morte programada 1 e 2 (PD-L1 e PD-L2), os quais se ligam ao PD1 das células de defesa e inibem o ataque do sistema imunológico. Esse mecanismo é utilizado por vários tipos de neoplasias, dentre elas estão as de estômago, esôfago e as gastrointestinais, estudos indicam que 40% dos cânceres gástricos possuam alta expressão de PD-L1. Dessa forma,



o PD-L1 representa uma estrutura que demonstra grande habilidade para ser usada como biomarcador de diagnóstico, além de representar um possível alvo terapêutico, então o PD-L1 também pode ser um futuro marcador preditivo de terapia para o câncer gástrico (ABBAS *et al.*, 2018; GU *et al.*, 2017; MATSUOKA; YASHIRO, 2018).

MiRNA

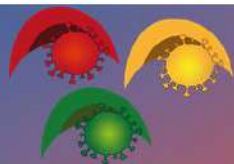
Os micro RNA's não codificantes (MiRNA) são responsáveis pela regulação da expressão de inúmeros genes no organismo e, ao atuarem de forma equivocada, podem contribuir para o desenvolvimento de neoplasias. Existem vários tipos de MiRNA associados a diferentes tipos de câncer, etapas da carcinogênese e, muitos dos que se relacionam com o câncer gástrico, já foram descobertos, como o miR-21, miR-23a, miR-27a, miRNA-194, entre outros. Os MiRNA também podem apresentar-se na forma de MiRNA livre de células (MiRNA-cf), os quais advêm de células tumorais e podem ser identificados em fluidos corporais, o que facilita sua obtenção. Muitos MiRNA vêm sendo estudados para o uso na prática clínica de câncer gástrico, o miR-331 e o miR-21 apresentaram alto potencial para diagnosticar câncer de estômago, enquanto o miR-20b, miR-125a, miR-137, entre outros, mostraram habilidade para identificar o prognóstico desse tipo de neoplasia. Dessa forma, os MiRNA representam marcadores tumorais promissores tanto para o diagnóstico quanto para o prognóstico de CG (PENG *et al.*, 2016; MATSUOKA; YASHIRO, 2018).

FOX-M1

O Forkhead box transcription factor 1 (FOXM1) é um gene da família FOX de fatores de transcrição, que desempenha um importante papel na progressão do ciclo celular. Com relação a progressão do ciclo celular nas fases G1-S e G2-M, essa proteína controla a expressão de genes essenciais para progressão mitótica, além de se relacionar com o reparo de DNA. O FOXM1, tem sido, ainda, muito associado à gênese tumoral e a evolução de várias malignidades devido a sua relação com mitose. Atualmente, tem sido visto como um novo biomarcador prognóstico para pacientes com câncer gástrico. Na clínica, esse fator foi associado a classificação TNM de carcinomas, profundidade da invasão, metástase linfonodal e mau prognóstico nos pacientes com câncer gástrico. A comunidade científica não observou diferenças significativas da expressão de FOXM1 em relação ao gênero (JIANG *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2016).

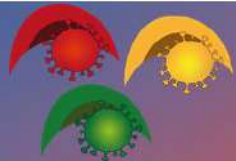
4. CONCLUSÃO

Assim, percebe-se que a descoberta de substâncias e estruturas, as quais desempenhem o papel de biomarcadores tumorais de diagnóstico, mensuração de prognóstico e predição de determinados tratamentos, é de extrema importância, especialmente para o câncer gástrico, pois esse tipo de neoplasia é uma das mais agressivas do mundo. Notou-se a existências de vários estudos com diversas substâncias que possuem um promissor futuro como marcador tumoral para o câncer gástrico e, dentre elas, destacaram-se HER-2, E-caderina, MET, o qual é receptor do fator de crescimento dos hepatócitos (HGF-R), Microssatélites, o FGFR-2, VEGF, PD-L1, MiRNA e o FOX-M1. Essas substâncias e estruturas demonstraram enormes habilidades para diagnosticar, prognosticar e prever a resposta clínica a determinados medicamentos para um dos cânceres mais malignos e de difícil tratamento, a neoplasia maligna de estômago.



5. REFERÊNCIAS

- ABBAS, M. *et al.* Current and future biomarkers in gastric cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 103, p. 1688-1700, 2018.
- ANVAR, Mohammad Saberi *et al.* Gastric cancer biomarkers; A systems biology approach. **Biochemistry And Biophysics Reports**, [S.L.], v. 13, p. 141-146, mar. 2018.
- BANIAK, N. *et al.* Gastric biomarkers: a global review. **World Journal of Surgical Oncology**, [S.i.], v. 14, n. 212, p. 1-14, ago./2016.
- BARETTON, G. B.; AUST, D. E.. Aktuelle Biomarker beim Magenkarzinom. **Der Pathologe**, [S.i.], v. 38, n. 5, p. 93-97, fev./2017.
- GU, L. *et al.* PD-L1 and gastric cancer prognosis: A systematic review and meta-analysis. **PLoS ONE**, [s.l.], v. 12, n. 8, p. 1-14, 2017.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Ministério da Saúde. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2019.
- JIANG, D. *et al.* Clinicopathological and prognostic significance of FoxM1 in gastric cancer: a meta-analysis. **International Journal of Surgery**, [S.i.], v. 48, p. 38-44, dez/ 2017.
- LIU, W. *et al.* Association of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Gene Polymorphisms With Gastric Cancer and Its Development, Prognosis, and Survival. **Technology in cancer Research & Treatment**, [s.l.], v. 17, p. 1-8, 2018.
- MATSUOKA, T.; YASHIRO, M. Biomarkers of gastric cancer: Current topics and future perspective. **World J Gastroenterol**, [s.l.], v. 24, n. 26, p. 2818-2832, 2018.
- OTTAVIAX, Cavatorta *et al.* Epidemiology of gastric cancer and risk factors. **Acta Biomedica**, v. 89, n. 8, p. 82-87, 2018.
- PANARESE, I. *et al.* Predictive Biomarkers Along Gastric Cancer Pathogenetic Pathways. **Expert Rev Anticancer Ther**, [S.i.], v. 17, n. 5, p. 417-425, mai./2017.
- PENG, Y. *et al.* MiRNA-194 activates the Wnt/ β -catenin signaling pathway in gastric Q5 cancer by targeting the negative Wnt regulator, SUFU. **Cancer Letter**, [s.l.], v. 30, p. 1-11, 2016.
- SHENOY, Santosh. CDH1 (E-Cadherin) Mutation and Gastric Cancer: Genetics, Molecular Mechanisms and Guidelines for Management. **Cancer Management and Research**, [S.i.], v. 11, n. 5, p. 10477-10486, dez./2019.



YE, Dong Mei. *et al.* Significant function and research progress of biomarkers in gastric cancer. **Oncology Letters**, [S.i.], v. 19, n. 1, p. 17-29, jan./2020.

ZHANG, J. *et al.* Expression of FoxM1 and the EMT-associated protein E-cadherin in gastric cancer and its clinical significance. **Oncology Letters**, v. 12, n. 4, p. 2445-2450, jul/2016.



ÁREA DE SUBMISSÃO: **Biologia Molecular**

CLONAGEM DE DNA EM 4 DIAS: UTILIZAÇÃO DE UMA TÉCNICA *RESTRICTION FREE* PARA ACELERAR A CONSTRUÇÃO DE LINHAGENS RECOMBINANTES

C.K.S. ROCHA², D.B.B. CAJUEIRO¹, F.C.B. LEITE² e D.A. SIMÕES¹.

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica

² Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia

E-mail para contato: crislaine.kelly@ufpe.br

RESUMO – *Em um cenário de emergência de doenças infecciosas virais, como é o caso da Covid-19, uma resposta rápida no desenvolvimento de estratégias vacinais e de diagnóstico eficiente é requerida. O desenvolvimento de plataformas de rápida obtenção de linhagens geneticamente modificadas acelera esse processo, pois permite sua aplicação no desenvolvimento de imunorreagentes para a Covid-19. As técnicas de clonagem de DNA que dispensam o uso de enzimas de restrição (Restriction-Free) foram desenvolvidas para acelerar e baratear as etapas de construção de linhagens recombinantes. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo apresentar a obtenção rápida de um vetor recombinante mediante a utilização da técnica de fusão USER, destacando as vantagens de sua utilização para acelerar a produção de linhagens recombinantes em substituição à métodos convencionais. Foi realizada ainda, uma estimativa do custo dos insumos moleculares necessários à construção deste DNA recombinante em comparação com a utilização da técnica de clonagem convencional. A construção do vetor recombinante foi realizada num processo de apenas quatro dias, demonstrando a drástica redução de etapas necessárias para a sua obtenção. Foi obtido um alto número de transformantes com 53% de clones positivos. Além disso, a estimativa realizada mostra que a clonagem de DNA utilizando a fusão USER tem um custo três vezes menor que a clonagem convencional. Este trabalho demonstra a eficiente utilização da técnica de fusão USER para a rápida construção de vetores recombinantes, permitindo acelerar o processo de obtenção de linhagens geneticamente modificadas para diversas aplicações biotecnológicas.*

Palavra-chave: fusão USER, engenharia genética, linhagem recombinante

ABSTRACT - *In a scenario of emergence of viral infectious diseases, such as Covid-19, a rapid response in the development of vaccine strategies and efficient diagnosis is required. The development of platforms for obtaining genetically modified strains quickly accelerates this process, as it allows its application in the development of immunoreagents for Covid-19. The DNA cloning techniques that do not require the use of restriction enzymes (Restriction-Free) were*



developed to accelerate and cheapen the stages of construction of recombinant strains. In view of this, the present work aimed to present the rapid obtaining of a recombinant vector using the USER fusion technique, highlighting the advantages of its use to accelerate the production of recombinant strains in substitution to conventional methods. An estimate was also made of the cost of the molecular inputs needed to build this recombinant DNA compared to the conventional cloning technique. The construction of the recombinant vector was carried out in a process of just four days, demonstrating the drastic reduction in the steps required to obtain it. A high number of transformants was obtained with 53% positive clones. In addition, the estimate made shows that DNA cloning using the USER fusion costs three times less than conventional cloning. This work demonstrates the efficient use of the USER fusion technique for the rapid construction of recombinant vectors, allowing to accelerate the process of obtaining genetically modified strains for several biotechnological applications.

Keyword: USER fusion, genetic engineering, recombinant strain

1. INTRODUÇÃO

A clonagem de DNA é uma das técnicas da biologia molecular que consiste em montar moléculas de DNA recombinante para expressão num organismo hospedeiro. Convencionalmente, esta técnica é realizada utilizando-se enzimas de restrição para tornar as extremidades coesivas, tanto do gene de interesse quanto do vetor que receberá o gene. É possível enumerar algumas desvantagens na utilização da clonagem convencional: 1) necessidade de uma grande diversidade de enzimas de restrição adequadas a cada clonagem, implicando em custo para o grupo de pesquisa; 2) enzimas de restrição com diferentes eficiências de atividade, impondo sucessivas repetições desta etapa; 3) necessidade de etapas de purificação em gel utilizando kits comerciais de purificação, os quais apresentam baixa eficiência de recuperação de fragmentos de DNA; 4) várias etapas sucessivas e uso de DNA ligase comercial.

Por outro lado, desde o início dos anos 90, novas tecnologias *Restriction-Free* para a clonagem de DNA têm sido desenvolvidas visando a redução de etapas metodológicas e menor custo (por exemplo, García-Nafría *et al.*, 2016 e Bond & Naus, 2012). A exemplo da metodologia de fusão USER, a qual permite que fragmentos de DNA sejam clonados numa única etapa, dispensando o uso de enzimas de restrição e DNA ligase comercial (Bitinaite *et al.*, 2007). A metodologia de fusão USER se baseia na criação de extremidades coesivas e complementares nos fragmentos a serem fusionados, mediante a excisão de resíduos de uracila contidos nos primers utilizados para amplificar o gene de interesse e o vetor (Bitinaite *et al.*, 2007; Geu-Flores *et al.*, 2007). Isso é conseguido através do tratamento destes fragmentos com o reagente USER que é capaz de remover os resíduos de uracilas presentes tornando o DNA instável e promovendo a formação de extremidades coesivas. Estes fragmentos de DNA são capazes de formar um produto de hibridização circular estável que é utilizado para a transformação de células competentes, as quais farão a ligação do DNA circular utilizando sua DNA ligase endógena.

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo apresentar a obtenção rápida de um vetor recombinante mediante a utilização da técnica de fusão USER, destacando as vantagens de sua utilização para acelerar a obtenção de linhagens recombinantes em substituição à métodos convencionais. Foi realizada ainda, uma estimativa do custo dos insumos moleculares necessários à construção deste DNA recombinante em comparação com a utilização da técnica de clonagem convencional.



2. MATERIAIS E MÉTODOS

O gene de interesse (fragmento PGAL1-AGA2-E7, com tamanho de 1491 pb) e o vetor de expressão EasyClone pCfB2909 (4567 pb) foram amplificados com primers USER específicos (Figura 1) e tratados com 5 unidades da enzima *DpnI* (para degradação do DNA molde plasmidial). Em seguida, foram adicionados em um microtubo de 200 μ L, 0,5 μ L do reagente USER, 0,5 μ L de tampão CutSmart 10x e 30 ng do vetor amplificado. O gene de interesse amplificado foi acrescentado à reação na proporção molar de 3:1 em relação ao vetor. A reação foi incubada em termociclador seguindo o protocolo do reagente USER (*New England BioLabs* - NEB). Células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 α foram transformadas utilizando a reação de fusão e selecionadas em meio *Luria-Bertani* (LB) suplementado com ampicilina (100 μ g/mL). A verificação da correta clonagem foi realizada por PCR de colônia, utilizando os primers indicados na tabela 1.

Tabela 1 - Lista de primers utilizados.

Nome	Sequência
Vetor_for	<u>ATCGCGTGCA</u> U TTCATCCGCTCTAACCGAAAAGG
Vetor_rev	<u>ATCGCACGCA</u> U TCCGTTGGTAGATACGTTGTTGAC
Gene_for	<u>ATGCGTGCGA</u> U ACGGATTAGAAGCCGCCGAGC
Gene_rev	<u>ATGCACGCGA</u> U CACTGTTGTTATCAGATCAGCG
Verif_for	GAAATTCGCTTATTTAGAAGTGTC
Verif_rev	CTCCTTCCTTTTCGGTTAGAG

As seqüências sublinhadas representam as caudas dos primers que contém um resíduo de uracila (em vermelho)

Para estimar os valores de cada estratégia de clonagem (convencional x fusão USER), os insumos moleculares necessários para a clonagem de um gene de interesse num vetor foram listados. Para a clonagem convencional foi considerada a utilização das enzimas de restrição *NheI* e *XhoI* (R\$ 487,00 e 298,00, respectivamente) seguindo a quantidade recomendada pelo fabricante. Os valores obtidos para estimar o custo de cada insumo foi baseado na cotação de fornecedores brasileiros, considerando os menores valores para cada reagente obtidos no mês de janeiro de 2020.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As técnicas de clonagem de DNA que dispensam o uso de enzimas de restrição (*Restriction-Free*) foram desenvolvidas para acelerar e baratear a obtenção de linhagens recombinantes. A exemplo disso, a técnica de fusão USER se mostra mais atrativa do que a técnica convencional principalmente pela drástica redução de etapas necessárias para a obtenção de um DNA recombinante, como representado na figura 1. Essa técnica permite que a obtenção do vetor e do gene de interesse seja realizada numa única etapa, dispensando ainda a necessidade de etapas de

purificação desses fragmentos (Vaisvila & Bitinaite, 2013). Além disso, como visto na figura 1, a ligação do produto recombinante, onde na clonagem convencional é realizada *in vitro*, na fusão USER esta etapa ocorre *in vivo* utilizando a DNA ligase endógena da bactéria hospedeira. Esta etapa reduz a necessidade de mais um insumo molecular (DNA ligase comercial) e junto com as vantagens anteriormente citadas aceleram as construções genéticas (Jorgensen *et al.*, 2017).

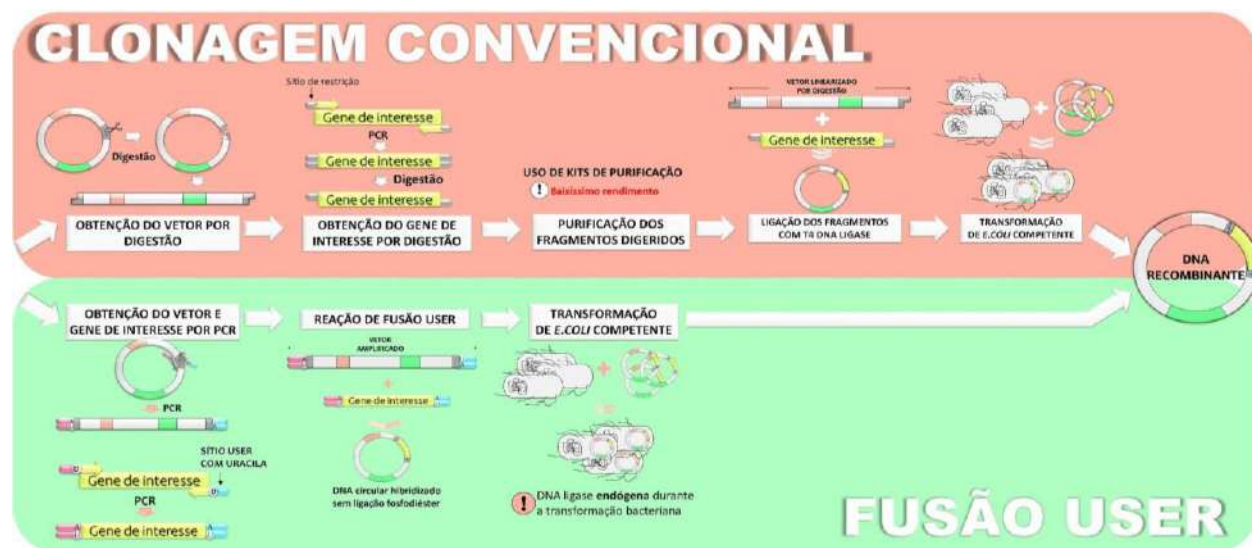


Figura 1 – Representação das principais diferenças entre a técnica de clonagem convencional e a fusão USER.

Este trabalho possibilitou a construção de um DNA recombinante expresso em *E. coli* através da utilização da técnica de fusão USER. A construção desse recombinante foi realizada num processo de apenas quatro dias, como visto na figura 2a. O gene de interesse e o vetor de expressão amplificados, foram verificados por eletroforese (Figura 2b) e a reação de fusão USER desses dois fragmentos foi utilizada para transformar células bacterianas, a qual possibilitou a obtenção de um grande número de células transformantes (mais de 900 colônias, Figura 2c). Foi observada uma boa eficiência de clonagem e, dos quinze transformantes verificados por PCR, 8 mostraram-se positivos para a presença do gene de interesse (Figura 2d). Essa eficiência deve-se à utilização do tratamento com a enzima *DpnI*. Em experimentos anteriores, a taxa de clones positivos chegou a apenas 10% dos transformantes testados (dados não publicados), com a utilização do tratamento com *DpnI* essa taxa aumentou para 53% na construção realizada neste trabalho.

As novas técnicas de clonagem possuem a desvantagem de gerarem um alto número de falsos positivos, ou seja, células transformantes que possuem o vetor de expressão sem o gene de interesse. Essas técnicas normalmente utilizam para a montagem do vetor recombinante, fragmentos obtidos por PCR que são gerados em sua maioria a partir de um molde plasmidial. Esse molde plasmidial prevalece na etapa de fusão dos fragmentos e na transformação bacteriana, gerando uma população que possui o plasmídeo residual e não o vetor recombinante. A utilização do tratamento com a enzima *DpnI* é uma saída para diminuir essa taxa de falsos positivos (Bitinaite *et al.*, 2007), pois permite que o molde plasmidial presente na PCR seja degradado e isto torna esta etapa um passo imprescindível para alcançar uma boa eficiência de clonagem genética.

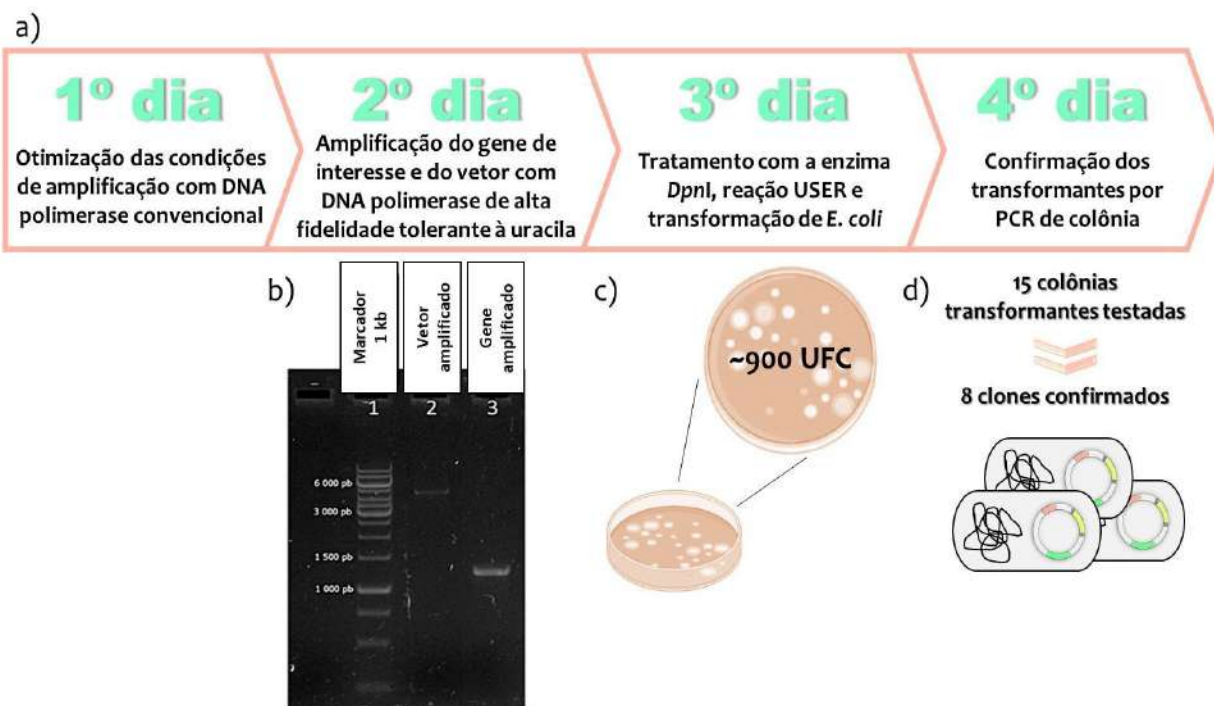


Figura 2 - Etapas do experimento de construção de um vetor recombinante em 4 dias. a) processo de construção do DNA recombinante. B) Eletroforese do gene de interesse e vetor de expressão amplificados. c) Transformação bacteriana com cerca de 900 UFC. d) verificação da clonagem de DNA com 53% de clones positivos.

Além do processo reduzido de etapas, a fusão USER se sobressai à clonagem convencional também em relação ao custo dos insumos necessários para a obtenção de um DNA recombinante. A estimativa de custos foi realizada através da cotação de insumos moleculares, onde destaca-se o valor necessário para realizar uma determinada clonagem de DNA (Tabela 2). A fusão USER pode ser 30% mais econômica do que a clonagem convencional, onde a obtenção de um DNA recombinante é avaliada em apenas R\$ 17,98. Além disso, destacamos também o custo referente a necessidade de um laboratório em realizar aquisição de todos os insumos necessários para realização da clonagem de DNA em questão. Apesar do investimento necessário para a clonagem convencional e fusão USER serem pouco diferentes, a estimativa realizada considerou a utilização de apenas duas enzimas de restrição. Geralmente, a construção de linhagens recombinantes requer que o laboratório em questão disponha de um banco de enzimas de restrição, elevando o custo da utilização dessa metodologia. Por outro lado, a técnica de fusão USER necessita apenas de novos primers de uma construção para a outra.



Tabela 2 - Estimativa do custo de insumos moleculares de cada estratégia de clonagem.

ETAPAS	INSUMOS NECESSÁRIOS						
	CONVENCIONAL			FUSÃO USER			
	Itens	Valor do item (R\$)	Valor por clonagem (R\$)	Itens	Valor do item (R\$)	Valor por clonagem (R\$)	
Obtenção do vetor e gene de interesse	Enzimas de restrição	785,00	0,31	Primers USER	320,00	0,80	
	Primers	55,00	0,14	DNA pol U-tolerante	1420,00	5,68	
	DNA pol alta fidelidade	989,52	4,95	<i>DpnI</i>	269,59	5,40	
Purificação	Kit de purificação	539,00	43,12	-	-	-	
Ligação	T4 DNA ligase	644,72	3,22	Reagente USER	610,71	6,10	
		3.013,24*	52,67**			2.620,30*	17,98**

*valor total dos insumos moleculares, **estimativa do valor por experimento de clonagem genética

4. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstra a obtenção de um DNA recombinante em *E. coli* num processo de apenas quatro dias, exemplificando a eficiente utilização da técnica de fusão USER na clonagem de DNA, a qual é capaz de agilizar as etapas de construções e diminuir o custo do processo de obtenção de linhagens recombinantes. Estas linhagens podem ser utilizadas para o desenvolvimento de estratégias vacinais e produção de imunorreagentes com aplicações diversas, por exemplo, nos estudos relacionados à Covid-19.

5. REFERÊNCIAS

- BITINAITE, J.; RUBINO, M.; VARMA, K. H.; SCHILDKRAUT, I.; VAISVILA, R.; VAISKUNAITE, R. USER friendly DNA engineering and cloning method by uracil excision. *Nucleic Acids Res.*, v. 35 (6), p.1992-2002, 2007.
- BOND, S.R.; NAUS C.C. Rf-cloning.org: An online tool for the design of restriction-free cloning projects. *Nucleic Acids Res.*, v. 40, p. W209–W213, 2012.
- GARCÍA-NAFRÍA, J.; WATSON, J. F.; GREGER, I. H. IVA cloning: A single-tube universal cloning system exploiting bacterial In Vivo Assembly. *Sci Rep.*, v. 6, 27459, 2016.
- GEU-FLORES, F.; NOUR-ELDIN, H.H.; NIELSEN, M.T.; HALKIEN, B.A. USER fusion: a rapid and efficient method for simultaneous fusion and cloning of multiple PCR products. *Nucleic Acids Res.*, v. 35 (7), p. e55, 2007.
- JORGENSEN, M.E.; WULFF, N.; NAFISI, M.; XU, D.; WANG, C.; LAMBERTZ, S.K.;



BELEW, Z.M.; NOUR-ELDIN, H.H. Design and direct assembly of synthesized uracil-containing non-clonal DNA fragments into vectors by USERTM cloning. *Bio-protocol*, 7 (22), 2017.

VAISVILA, R.; BITINAITE, J. Gene synthesis by assembly of deoxyuridine-containing oligonucleotides. *Methods Mol Biol.*, v. 978, p. 165-171, 2013.



ÁREA DE SUBMISSÃO: **Biologia Molecular**

DETECÇÃO DE DNA DE *Leishmania* spp. POR qPCR EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE CÃES DE REGIÃO ENDÊMICA NO ESTADO DE PERNAMBUCO

S. F. SOUZA¹, J. F.C. L. S. MONTEIRO¹, M. E. F BRITO¹, K. P. B. LIMA¹, A.K.S.F. SILVA¹,
E. L. ALMEIDA¹, C.J. SILVA², S.N.C. SANTOS¹, F.J. SILVA¹, S. P. BRANDÃO-FILHO¹

¹ Departamento de Imunologia do Instituto Aggeu Magalhães-FIOCRUZ-PE, Recife -PE, Brasil

² Universidade Fernando Pessoa, UFP, Portugal.

E-mail para contato: samarabiomedicina@gmail.com

RESUMO – As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, sendo um parasito intracelular obrigatório de importância médica e veterinária. O reservatório hospedeiro acidental na manutenção do ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar canina (LTC). O objetivo do estudo foi a avaliação da infecciosidade em cães (*Canis familiaris*) envolvidos no ciclo de transmissão das leishmanioses em região endêmica de Pernambuco. Foi realizado um inquérito epidemiológico com cães domésticos no Engenho Mundo Novo, no município de São Vicente Férrer, Pernambuco, Brasil. Realizou-se o exame clínico em 73 cães, e a coleta de amostras de sangue e swab conjuntival. Foi realizado teste rápido para o diagnóstico de LVC. Amostras de DNA leucocitário foram submetidas à técnica de PCR em tempo real (qPCR), para a detecção de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum*. Com relação aos sintomas clínicos dos cães, 53,4% deles apresentavam dermatopatias e em 75,3% a mucosa ocular estava pálida. Dentre todos os cães, 13,7% reagiram ao antígeno da *L. (L.) infantum*. O resultado da qPCR para as amostras testadas para *L. braziliensis* foi “não detectável” e para *L. infantum*, a qPCR teve resultado positiva o em um dos animais. A região estudada é endêmica para ambas as leishmanioses e os resultados do estudo indicam que o agente etiológico da LVC está presente no município.

Palavras-Chaves: Diagnóstico. Eco-epidemiologia. Leishmaniose Tegumentar Americana. Leishmaniose Visceral Canina. qPCR.

ABSTRACT – *Leishmaniasis* are diseases caused by protozoa of genus *Leishmania*, being a mandatory intracellular parasite with medical and veterinary importance. The definitive reservoir of canine visceral leishmaniasis (CVL) is the dog, which also participates as an accidental host on American cutaneous leishmaniasis (ACL) and contribute to maintain transmission cycle of this disease. The objective of this study was to evaluate infectivity in dogs (*Canis familiaris*) involved on leishmaniasis cycle transmission in an endemic region of Pernambuco State. An epidemiological survey was conducted with domestic dogs at Engenho Mundo Novo, in the



*municipality of São Vicente Férrer, Pernambuco, Brazil. The clinical examination was carried out blood samples and conjunctival swabs from 73 dogs. An immunological rapid test was performed to confirm CVL on blood samples. Leukocyte DNA samples were submitted to real-time PCR (qPCR), to detect *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) infantum*. Regarding the clinical symptoms of the dogs, 53.4% of them had skin diseases and in 75.3% the ocular mucosa was pale. Among all dogs, 13.7% showed reactivity to *L. (L.) infantum* antigen. The qPCR result for all samples tested for *L. braziliensis* was “undetectable” and for *L. infantum*, it was positive in one dog. The studied region is endemic for both leishmaniasis and the results of this study indicate that the etiological agent of LVC is still circulating on the area.*

Keywords: American Cutaneous Leishmaniasis. Diagnosis. Eco-epidemiology. qPCR. Visceral Canine Leishmaniasis.

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um conjunto de doenças infecciosas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, sendo transmitidas entre os vertebrados através da picada de fêmeas infectadas de diversas espécies de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* durante o repasto sanguíneo (Vasconcelos *et al.*, 2018).

Nas Américas a doença apresenta-se sob duas formas clínicas: leishmaniose tegumentar americana (LTA) e leishmaniose visceral canina (LVC). A espécie da *Leishmania* envolvida e a resposta imune do hospedeiro são fatores que interferem na manifestação clínica da doença (Burza *et al.*, 2018).

A incidência da LTA e LVA vem aumentando em Pernambuco, a maioria dos casos encontra-se na zona da rural (Brandão-Filho *et al.*, 1998; Dantas-Torres; Brandão-Filho, 2006). O cão é considerado um dos principais reservatórios domésticos de importância epidemiológica, que contribui na manutenção do ciclo de transmissão dessas doenças (Moura *et al.*, 2020).

O diagnóstico das leishmanioses é realizado através de técnicas convencionais (Guerra *et al.* 2018), porém essas técnicas apresentam algumas limitações (De Souza Silva; Winck, 2018). Com isso, a PCR quantitativa em tempo real (qPCR) vem demonstrando ser uma técnica de alta sensibilidade e especificidade, capaz de detectar e identificar a espécie da *Leishmania* envolvida dentro de poucas horas. A rapidez no resultado e alta acurácia são vantagens da qPCR em relação aos métodos de diagnóstico tradicionais (Thakur *et al.*, 2020).

Portanto, é necessária uma análise mais sensível e mais específica, que possibilite o diagnóstico rápido e a identificação da espécie. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo a avaliação a infecciosidade em cães (*Canis familiares*) envolvidos no ciclo de transmissão das leishmanioses em uma região endêmica do Nordeste brasileiro.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Engenho Mundo Novo, localizado no município de São Vicente Férrer, na Zona da Mata Norte do estado de Pernambuco.

Foram incluídos no estudo todos os cães domésticos da região e 73 cães constitui o total de amostras, com diferentes faixas etárias, sexo e raça.

Foi aplicado um questionário aos proprietários sobre os dados clínicos e epidemiológicos do



animal. A partir disto, foi possível realizar a avaliação clínica através da observação de lesões cutâneas, descamação e eczemas importantes, com localização frequente nas orelhas, focinho, cauda e articulações e pelo opaco.

Foram coletadas amostras de sangue periférico e de *swab* de lesão e de conjuntiva ocular. A coleta de sangue foi realizada pós antissepsia do local com algodão embebido em álcool etílico 70% para coletar 5 ml de sangue de cada animal, com auxílio de um adaptador acoplado à agulha 25x8 / 21G1, ao tubo de coleta à vácuo com solução de anticoagulante (EDTA 0,009 g/5 ml de sangue) 12,5x75mm.

Nos animais que apresentaram lesões, os exsudatos cutâneos foram coletados com *swab* bacteriológico, bem como, de conjuntivas oculares em todos os cães pelo veterinário do grupo.

2.1 Diagnóstico imunológico

Foi realizado o teste rápido, utilizando o soro dos cães como material biológico. O kit utilizado foi o DPP® Leishmaniose Canina/Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, fornecido por Biomanguinhos - FIOCRUZ. Todo o procedimento foi realizado seguindo as recomendações do fabricante.

2.2 Diagnóstico molecular

2.2.1 Extração de DNA

Amostras obtidas de sangue e *swab* de lesão e de conjuntiva ocular foram processadas para detecção de DNA de *Leishmania*. O DNA das amostras clínicas foi extraído com o Kit “*in house*” de acordo com o protocolo padronizado por Silva *et al.* (2017). Em seguida, o produto da extração foi utilizado na qPCR.

2.2.2 PCR em Tempo real (qPCR)

O DNA das amostras foi analisado pelo sistema de Sybr Green na qPCR, tendo como alvo o kDNA da espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* para o diagnóstico de LTC e *Leishmania (Leishmania) infantum* para LVC. As reações foram realizadas de acordo com as condições descritas por De Paiva Cavalcanti *et al.* (2013) e Ghasemian *et al.* (2016) e teve 1fg de DNA da *Leishmania* como limite mínimo de detecção para amostras positivas.

O termociclador utilizado para a realização do diagnóstico da LTC e LVC foi o Applied Biosystems QuantStudio 5 Real-Time PCR System, através do Software QuantStudio™ Design & Analysis Software versão 1.5.1.

2.3 Análises Estatísticas

Foi elaborado um banco de dados construído através do programa de SPSS 20.0, que possibilitou os registros dos dados dos animais (nome do animal, raça, sexo, idade e dados clínicos), tipo de amostra coletada e resultados parciais.



2.4 Considerações Éticas

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz - PE (IAM/FIOCRUZ- PE), sob aprovação da CEUA/IAM No. 120/2017.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Dados clínicos e epidemiológicos dos cães

A maioria dos cães era machos e não possuía raça definida. Os sintomas clínicos que o cão acometido por leishmaniose apresentará depende de alguns fatores e principalmente da sua resposta imunológica. Com isso, ele pode apresentar-se assintomático durante anos ou apresentar sintomas graves que podem o levar à morte (Ribeiro *et al.*, 2018).

Um trabalho de De Freitas *et al.* (2020) descreveu recentemente que as mudanças dermatológicas estão presentes em quase 80% dos cães com leishmaniose, porém no presente estudo as dermatopatias juntas (alopecia, dermatite, seborreia e lesão na pele) apareceram em 53,4% dos cães. Outro sintoma predominante nos cães, descrito por Salzo (2008), é a palidez da mucosa ocular que foi observada em 75,3% dos cães conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1 – Aspectos clínicos observados nos cães

Sintomas	Frequência	Percentual
Alopecia	6	8,2%
Dermatite	10	13,7%
Seborreia	12	16,4%
Lesão na pele	11	15,1%
Mucosa ocular pálida	55	75,3%
Caquexia	4	5,5%
Magro	14	19,2%

Tabela 1 – Aspectos clínicos observados nos cães

Sintomas	Frequência	Percentual (%)
Sobrepeso	5	6,8%
Condição corporal normal	50	68,5%

3.2 Teste imunológico

O teste rápido (TR DDP) é uma técnica rápida, sensível, específica, de fácil interpretação e execução (De Santis *et al.*, 2013). Entretanto, é passível de reação, diminuindo assim, a especificidade do teste (Brito *et al.*, 2001).

O TR DDP foi realizado em amostras de sangue de todos os cães. Dentre as amostras obtidas, 10 apresentaram reatividade imunológica (de fraca a forte) ao antígeno da *L.(Leishmania) infantum*, correspondendo a quase 14% da população canina estudada descrito na Tabela 2.

Tabela 2- Apresenta a frequência e o percentual da reação imunológica do Teste Rápido.

Teste rápido	Frequência	Percentual (%)
Reagente	6	8,2%
Fracamente reagente	4	5,5%
Não reagente	63	86,3%
Total	73	100%

3.3 Teste molecular – qPCR

Vinte amostras de DNA leucocitários foram processadas por qPCR para o diagnóstico de LTA. Para o diagnóstico de LVC foram analisadas 18 amostras de DNA leucocitários e 12 amostras de DNA de *swab* de conjuntiva ocular por qPCR. Totalizando um número de cinquenta amostras analisadas.

A definição da curva padrão para *L. braziliensis* e *L. infantum* foi realizada com base no estudo de Paiva-Cavalcanti *et al.* (2013) no qual o resultado obtido foi de 95.37% de eficiência para a curva padrão de *L. braziliensis* e 96.936% de eficiência para a curva padrão de *L. infantum*. Assim repetido para a análise dos resultados das reações de qPCR do presente estudo.

Houve amplificação tardia de DNA nas 20 amostras de sangue (leucócitos) submetidas à qPCR para o diagnóstico de LTA, quando comparadas à amplificação da curva padrão da *L. braziliensis*, como mostra a Figura 4. Com isso, através do padrão estabelecido para amostras positivas, não foi detectada nenhuma amostra positiva para a *L. (V.) braziliensis*.

Por outro lado, das 30 amostras analisadas para o diagnóstico de LVC, foi detectada 1 amostra biológica de leucócitos com amplificação de DNA de *L. (L.) infantum* dentro do intervalo da curva padrão, portanto, positiva. Esse animal apresentou 1,649fg de DNA de *L. infantum*.

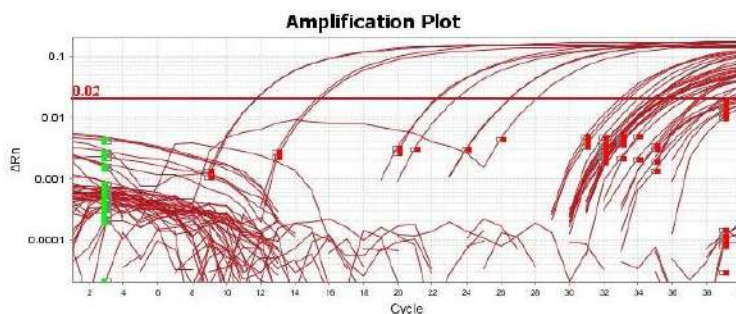


Figura 4 – Demonstração da amplificação tardia em comparação com a curva padrão de *L. braziliensis*.



4. CONCLUSÃO

Nas amostras de sangue (leucócitos) dos cães incluídos no estudo, não houve amplificação de DNA de *L. (V.) braziliensis*. Devido à alta sensibilidade de detecção pela qPCR e dos resultados negativos para a LTA canina, pode-se concluir que não havia circulação de *L. (V.) braziliensis*. Nas mesmas amostras, também testadas para *L. (L.) infantum*, apenas em uma delas a qPCR apresentou detecção de DNA para LVC. Apesar do baixo índice de infecção por LVC demonstrado, pode-se concluir que há circulação dessa espécie, embora em baixa quantidade, e em locais limitados.

Mesmo com a baixa carga parasitária dos animais, o teste rápido mostrou-se reagente para LVC em cães assintomáticos e no cão que apresentava sinais e sintomas clínicos de LVC. Portanto, o teste rápido pode confirmar a prevalência dessa infecção na região e não, necessariamente, a infecção ativa ou recente.

A região estudada é endêmica para as duas leishmanioses, e os dados obtidos indicam que há caso ativo de LVC na região.

5. REFERÊNCIAS

BRANDÃO-FILHO *et al.* Leishmaniose tegumentar americana em centro de treinamento militar localizado na Zona da Mata de Pernambuco, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v.31, n.6, p.575-578, 1998.

BRITO ME, MENDONÇA MG, GOMES YM, JARDIM ML, ABATH FG. Dynamics of the antibody response in patients with therapeutic or spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* v.95, n.2, p. 203-206, 2001.

BURZA, SAKIB; CROFT, SIMON L.; BOELAERT, MARLEEN. Leishmaniasis. *The Lancet.*; v.392, n10151, p.951-970, 2018.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting the paradigms of epidemiology and control. *Rev. IMTSP.*v.48, n.3, p.151-156, 2006.

DE FREITAS, ROBERTA CARVALHO *et al.* Alterações cutâneas secundárias à infecção por *Leishmania* sp.: revisão de literatura/Skin disturbs caused by *Leishmania* sp. *Infection. Braz. J. Dev.* v.6, n.4, p.19328-19346, 2020.

DE PAIVA CAVALCANTI, M. *et al.* Quantitative real time PCR assays for the detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in animals and humans. *Mo. Cell. Probe.* v. 27, n. 3–4, p. 122–128, 2013.

DE SANTIS, B., SANTOS, E. G., SOUZA, C. DA, & CHAVES, S. A. DE. Performance of DPP™ immunochromatographic rapid test (IRT) for canine visceral leishmaniasis: comparison with other serological methods in suspected dogs from Cuiabá, Mato Grosso State, Brazil. *Braz. J. Vet. Rev. An.Sci.* v.50, n.3, p.198-205, 2013.

DE SOUSA SILVA, CLÁUDIA MARINA HACHMANN; WINCK, CESAR AUGUSTUS. Leishmaniose visceral canina: revisão de literatura. *Rev. da Universidade Vale do Rio Verde.* v.16, n1, p1-12, 2018.

GHASEMIAN M, GHARAVI MJ, AKHLAGHI L, *et al.* SYBR green-based detection of *Leishmania infantum* DNA using peripheral blood samples. *J. Parasit. Dis.* v.40, n.1, p.81-87, 2016;



GUERRA, JULIANA MARIOTTI *et al.*, Patologia morfológica e molecular aplicadas à inovação diagnóstica e vigilância da leishmaniose visceral. *R. Inst. Adolfo Lutz*. v.77, :e1762, 2018.

MOURA CRL DE P, COSTA CHN, MOURA R DE D, BRAGA ARF, SILVA VC, COSTA DL. Cutaneous parasitism in patients with American visceral leishmaniasis in an endemic area. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v.53, 2020.

RIBEIRO, R. R. *et al.* Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. *Bio. Med. Res. Int.* p.3296893, 2018.

SALZO, P.S. Aspectos dermatológicos da leishmaniose canina. *Nosso clínico*. v.11, n.63, p.30-34, 2008.

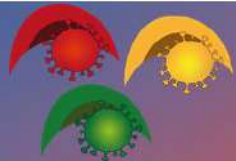
SILVA, ANGÉLICA OLIVINO DA *et al.* Avaliação de protocolos de extração e purificação de DNA alvo da reação em cadeia da polimerase na detecção de *Leishmania (Viannia) spp.* *Tese de Doutorado*, 2017.

THAKUR S, JOSHI J, KAUR S. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. *J. Parasit. Dis.* v.44, p.253-272, 2020.

VASCONCELOS, JAIRLA MARIA *et al.* Leishmaniose tegumentar americana: perfil epidemiológico, diagnóstico e tratamento. *RBAC*, v.50, n.3, p.221-7, 2018.

6. AGRADECIMENTOS

Deixo um agradecimento especial a todos que colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho, bem como ao CNPq pelo consentimento da bolsa de iniciação científica e ao LIMP-IAM-FIOCRUZ-PE pela infraestrutura laboratorial.



ÁREA DE SUBMISSÃO: **Biologia Molecular**

A AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA PCR CONVENCIONAL E qPCR NA DETECÇÃO DO ALVO kDNA DA *Leishmania (Viannia) braziliensis* EM AMOSTRAS DE ANIMAIS SILVESTRES E SINANTRÓPICOS ATRAVÉS DE SWAB

S. N. C. SANTOS¹, J. F. M JUNIOR¹, J. F.C. L. S. MONTEIRO¹, S. F. SOUZA¹, K. P. B. LIMA¹, C.J. SILVA¹, A.K.S.F. SILVA¹, E. L. ALMEIDA¹, S. P. BRANDÃO-FILHO¹, M. E. F BRITO¹

¹ Departamento de Imunologia do Instituto Aggeu Magalhães-FIOCRUZ-PE, Recife -PE, Brasil
E-mail para contato: stephane_naiara@hotmail.com

RESUMO - A *Leishmania (Viannia) braziliensis* é caracterizada por ser um parasita intracelular obrigatório que acomete pele e mucosas, sendo a principal espécie circulante no estado de Pernambuco. Animais silvestres e sinantrópicos são os principais reservatórios naturais que permitem a manutenção do ciclo biológico nas áreas endêmicas para leishmaniose tegumentar (LT). O presente estudo tem como objetivo avaliar o desempenho da qPCR e PCR convencional na detecção do alvo kDNA da *L. (V.) braziliensis* em amostras de roedores silvestres e sinantrópicos obtidas por meio de swab, coleta não invasiva. Na área de estudo, Amaraji -PE, endêmica para LT foram coletadas cerca de 50 amostras pareadas de swab de conjuntiva ocular e secreção oral de animais silvestres e sinantrópicos, das quais 20 foram submetidas aos testes moleculares. O alvo kDNA não foi detectado na PCR Convencional em ambos tipos de amostras e para qPCR o alvo foi detectável em três amostras de swabs de conjuntiva ocular. Os resultados obtidos no estudo demonstraram ser um recurso importante, que auxilia no diagnóstico da LT em reservatórios, além de contribuir para uma melhor compreensão da epidemiologia da doença.

Palavras-chaves: Diagnóstico. qPCR. Leishmaniose tegumentar. Animais sinantrópicos e silvestres. Eco-epidemiologia

ABSTRACT – *Leishmania (Viannia) braziliensis* is characterized by being a mandatory intracellular parasite that affects skin and mucous membranes, being the main circulating species in the state of Pernambuco. Synanthropic and wild animals are the main natural reservoirs that allow the maintenance of the biological cycle in the endemic areas for cutaneous leishmaniasis (CL). The present study objective to evaluate the performance of qPCR and conventional PCR in the detection of kDNA target of *L. (V.) braziliensis* in samples of synanthropic and wild rodents obtained through swab, a non-invasive collection. In the study area, Amaraji -PE, endemic to CL, about 50 paired samples of ocular conjunctiva swab and oral secretion of wild and synanthropic animals were collected, of which 20 were submitted to Conventional PCR and Real-Time PCR (qPCR). The kDNA target was not detected for Conventional PCR in both sample types and for qPCR the target was detectable in three (3) samples of ocular conjunctive swabs. The results



obtained in the study proved to be an important resource, which assists in the diagnosis of CL in reservoirs, as well as contributing to a better understanding of the epidemiology of the disease.

Keywords: Diagnosis. qPCR. Cutaneous Leishmaniasis. Synanthropic and wild animals. Eco-epidemiology.

1. INTRODUÇÃO

Na região Nordeste do Brasil, a incidência da LT é verificada nas áreas com resquícios de floresta da Mata Atlântica, que são propícias à colonização dos flebotomíneos, mamíferos silvestres e sinantrópicos (Brandão-Filho *et al.*, 2003). Sendo a espécie predominantemente associada à LT no Nordeste e em Pernambuco a *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Brito *et al.*, 2009; 2012; 2018; Brandão-Filho *et al.*, 2001). Reservatórios silvestres e sinantrópicos da *L. (V.) braziliensis*, como o *Nectomys squamipes*, *Necromys lasiurus* e o *Rattus rattus* são animais que, em geral, não apresentam as manifestações clínicas da doença, pois apresentam uma relação de adaptação e equilíbrio entre parasito-hospedeiro e vetor fazem a manutenção do ciclo biológico do protozoário nas áreas endêmicas (Brandão-Filho *et al.*, 2003).

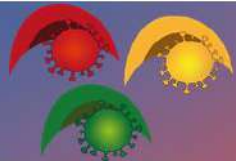
O diagnóstico por meios convencionais para LT é realizado a partir do exame direto por microscopia, cultura, sendo esta suscetível a contaminação e necessitando de mais tempo para o resultado. Além disso, a sorologia também faz parte dos meios de diagnóstico, no entanto, apresenta problemas com reações cruzadas e não permite diferenciar uma infecção passada e atual (Wilson, 1995). Diante dessas limitações dos meios tradicionais de diagnóstico, somado a coleta invasiva e as vezes dolorosa, a utilização de um procedimento não invasivo associado ao teste molecular assume grande importância para o diagnóstico (Mimori *et al.*, 2002). Nesse sentido, esta associação contribui para um diagnóstico de maneira mais rápida e específica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado no município de Amaraji, Zona da Mata Sul de Pernambuco, área endêmica para LT, nas localidades do Engenho Raiz de Dentro e Engenho Refrigério. Foram coletadas cerca de 50 amostras pareadas de *swabs* estéreis de conjuntiva ocular e de secreção oral de roedores silvestres e sinantrópicos, as quais foram submetidas a extração do DNA de acordo com o protocolo padronizado por Silva *et al.* (2017).

Dentro das 50 amostras, 20 amostras de *swabs* de conjuntiva e de secreção oral foram submetidas a PCR em tempo real (qPCR) pelo sistema da SYBR Green tendo como alvo o kDNA do subgênero (*Viannia*), que amplifica um fragmento de até 138 pares de base. As reações foram realizadas de acordo com as condições descritas por Paiva-Cavalcanti *et al.* (2013). Iniciou-se esse estudo utilizando um número de 10 amostras pareadas de *swabs* de conjuntiva e de secreção oral (estudo piloto), uma vez que, o tipo de amostras obtidas de animais de pequeno porte poderia ser uma limitação. As referidas amostras foram submetidas a PCR convencional realizada em 35 ciclos (Eresh *et al.*, 1994), a qual amplifica até 750pb da *Leishmania (V.) braziliensis*. Seguido da análise de 10µl dos produtos de PCR na eletroforese em gel de agarose 1 % com tampão TAE corado por solução de brometo de etídio 10 g/mL (Rodrigues *et al.*, 2002; Sambrook *et al.*, 2001).

Este trabalho faz parte de um projeto maior e têm aprovação e Certificado da Comissão de Ética em Uso de Animais do Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ – PE (CEUA /IAM-FIOCRUZ-PE), sob nº 017/2011.



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 20 amostras de *swabs* de conjuntiva e de secreção oral de roedores foram processadas por qPCR para diagnóstico de LT. Dessa forma, foi realizada a amplificação de uma curva padrão DNA de promastigotas em cultura de *Leishmania (V.) braziliensis*, cepa de referência cedida pelo CLIOC-RJ. A definição da curva padrão para *L. braziliensis* foi realizada com base no estudo de Paiva-Cavalcanti *et al.* (2013) tendo como maior ponto de detecção da curva 1ng e menor ponto 1fg e esta obteve uma eficiência de 105.933% como demonstrado no Gráfico 1.

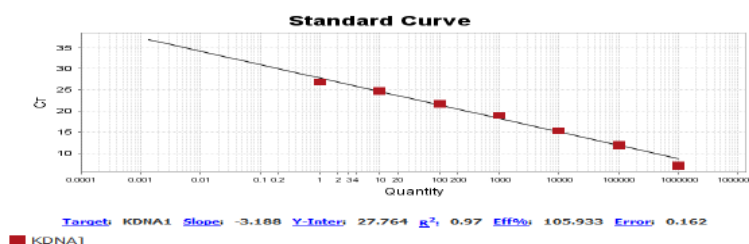


Gráfico 1 - Eficiência da Curva Padrão.

A maioria das amostras tiveram uma amplificação tardia em relação a curva padrão, logo resultou em negatividade para todas as amostras de *swabs* de secreção oral, no entanto, foram obtidas três amostras de *swabs* de conjuntiva positivas para alvo kDNA da *L. braziliensis* (Tabela 1). Tendo como base o padrão de referência de temperatura da Curva de Melting de 79°C a 81°C (Gráfico 2) conforme descrito por Morais *et al.* (2015).

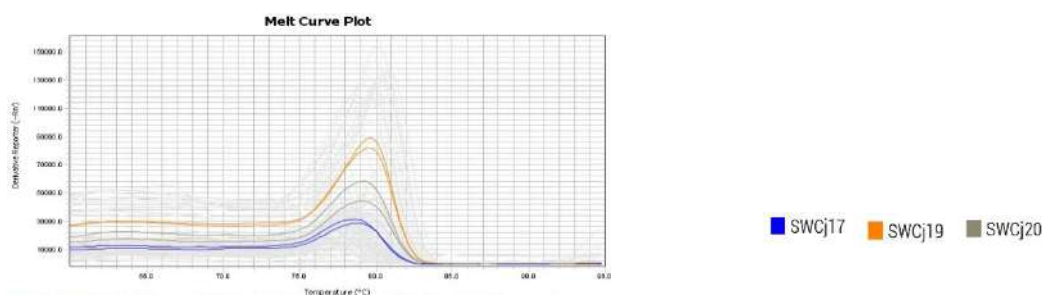


Gráfico 2 - Temperatura de Melting entre 79°C e 81°C.

Tabela 1 – Quantidade de DNA das amostras positivas.

Swabs de conjuntiva	
Roedores	Resultado
Quantidade (fg)	
Roedor 17	Positivo
10,883	
Roedor 19	Positivo
17,219	
Roedor 20	Positivo
12,093	



Além disso, 10 amostras pareadas de *swabs* de conjuntiva e de secreção oral e animais silvestres e sinantrópicos foram submetidas a PCR convencional e o produto da reação foi revelado por eletroforese em gel de agarose e os resultados foram negativos para *L. braziliensis* em todas as amostras como mostra a Figura 1. Não apresentando banda amplificada a 750pb como os controles positivos (Bruijn *et al.*, 1992), demonstrando que a quantidade de parasitos nas mesmas foram abaixo do limite de detecção do teste que é de 10pg .

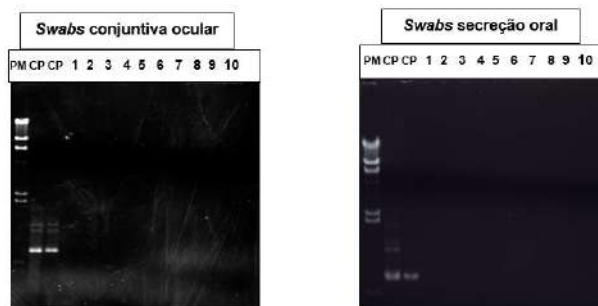


Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo, mostrando apenas as bandas dos controles positivos utilizados de 1ng e 10pg, nas demais lines de (1 a 10) as amostras de *swabs* não detectáveis.

4. CONCLUSÃO

O alvo kDNA da *L. braziliensis* em *swabs* de conjuntiva ocular foi detectado por qPCR, a qual demonstra ter uma melhor performance por ser de alta sensibilidade e especificidade que a PCR convencional.

Adicionado a isso, a união dessa técnica molecular, qPCR, ao método de coleta não invasivo por *swab* demonstram ser um recurso importante pela rapidez, praticidade no manejo e menor incômodo ao animal. Dessa forma, auxiliando no diagnóstico de LT em animais reservatórios do parasito, mesmo com baixa carga parasitária, e ajudando a entender melhor a epidemiologia da doença nas regiões endêmicas.

5. REFERÊNCIAS

BRANDÃO-FILHO et al. Leishmaniose tegumentar americana em centro de treinamento militar localizado na Zona da Mata de Pernambuco, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.31, p. 575-578, 1998.

BRANDÃO-FILHO, S.P. **Ecoepidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana associada à *Leishmania (Viannia) braziliensis* na Zona da Mata Atlântica do Estado de Pernambuco**, Brasil. 2001. Tese (Doutorado em Ciências) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

BRANDÃO-FILHO, et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 97, n. 3, p. 291-296, 2003.

BRITO, M.E.F., et al., Species diversity of *Leishmania (Viannia)* parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. **Tropical Medicine and International Health**, Barcelona, v. 14, n.10, p.1278–86, 2009.



BRITO, et al. Occupationally acquired American cutaneous leishmaniasis. **Case reports in dermatological medicine**, v. 2012.

BRITO, et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolated from the saliva of patients in a cutaneous leishmaniasis-endemic area of northeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 113, n. 4, 2018.

BRUIJN, M.H.; BARKER, D.C. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Trop**, Basel, v.52, n.1, p.45-58. 1992.

MIMORI, et al. Usefulness of sampling with cotton *swab* for PCR-diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the New World. **Acta Trop**, Basel, 81:197-202, 2002.

MORAIS, R.C.S. **Aplicabilidade da técnica de PCR em tempo real para caracterização de espécies e *Leishmania***. Tese de Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde. Recife, 2015.

PAIVA CAVALCANTI, et al. The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. **Vet J** 189:356–358. 2009.

PAIVA-CAVALCANTI, M. *et al.* Quantitative real time PCR assays for the detection *Leishmania (Viannia) braziliensis* in animals and humans. **Molecular and Cellular Probes**. London. p. 1-7, 2013

SILVA, ANGÉLICA OLIVINO DA *et al.* **Avaliação de protocolos de extração e purificação de DNA alvo da reação em cadeia da polimerase na detecção de *Leishmania (Viannia) spp.*** Tese de Doutorado, 2017.

WILSON, S. M. DNA-based methods in the detection of *Leishmania* parasites: Fields applications and practicalities. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 89, n. 1, p. 95-100, 1995.

6. AGRADECIMENTOS

Toda equipe envolvida na pesquisa, ao CNPq e ao LIMP-IAM/Fiocruz-PE pela infraestrutura para o desenvolvimento do projeto.



ÁREA DE SUBMISSÃO: **Biologia Molecular**

COLÁGENO DE SUBPRODUTOS DE PELE DE SARAMUNETE (*Pseudupeneus maculatus*) PARA USO COMO BIOMATERIAL

N.F.B. SILVA^{1,2}, B.A.M. COSTA²; A.L.F. PORTO² e V.M. OLIVEIRA²

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Curso de Graduação em Engenharia de Pesca, Departamento de Pesca e Aquicultura. PIBIC CNPq/UFRPE.

²Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, DMFA, Laboratório de Tecnologia de Bioativos, LABTECBIO.

E-mail para contato: vagne_melo@hotmail.com

RESUMO – *Colágeno tem sido utilizado amplamente como recurso para a produção de biomateriais de uso terapêutico e biomédico. As principais fontes dessa matéria-prima têm sido bovinos e suínos, porém questões religiosas e sanitárias têm tornado a busca por fontes alternativas uma questão necessária. Nesse contexto, biopolímeros de colágeno de origem marinha são alternativas viáveis, rápidas, de menor custo e são livres de problemas sanitários. Assim, este trabalho objetivou isolar colágeno de pele de saramunete (*Pseudupeneus maculatus*) pelo método ácido solúvel (ASC) e realizar sua identificação molecular usando técnica de infravermelho (FTIR). A pele foi pré-tratada para remoção de proteínas não colagenosas e gorduras, além de outras sujidades. A extração se deu pela solubilidade em ácido acético. O material colagenoso foi liofilizado. Do ponto de vista estrutural, o colágeno extraído pelo método ASC apresentaram Bandas A (3347 cm^{-1}), Amida I (1633 cm^{-1}) e Amida III (1081 cm^{-1}). Os picos são característicos das ligações amidas, que são os marcadores mais comuns da conformação do esqueleto polipeptídico. Esses picos correspondem aos amino e iminoácidos (prolina e hidroxiprolina) das moléculas de colágeno conhecidas. O colágeno ASC da pele de saramunete não apresentou as bandas Amida A e Amida II. Com a identificação molecular, é possível estabelecer as condições para aplicações biomédicas e a viabilidade do material para o desenvolvimento de novos biopolímeros à base de colágeno para ganho terapêutico.*

Palavras-chave: biopolímero, biotecnologia, peixe, marinho.

ABSTRACT – *Collagen has been widely used as a resource for the production of biomaterials for therapeutic and biomedical use. The main sources of this raw material have been cattle and pigs, but religious and health concerns have made this search for alternative sources a necessary issue. In this context, collagen biopolymers of marine origin are viable, fast, less costly alternatives and are free from sanitary problems. Thus, this work aimed to isolate collagen from skin of Spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*) by the acid soluble method (ASC) and perform its molecular identification using infrared technique (FTIR). The skin was pre-treated to remove non-*



collagenous proteins and fats, as well as other dirt. The extraction was done by solubility in acetic acid. The collagenous material was lyophilized. From a structural point of view, the collagen extracted by the ASC method showed bands A (3347 cm^{-1}), Amide I (1633 cm^{-1}) and Amide III (1081 cm^{-1}). The peaks are characteristic of the amide bonds, which are the most common markers of the conformation of the polypeptide skeleton. These peaks correspond to the amino and imino acids (proline and hydroxyproline) of the known collagen molecules. The ASC from the Spotted goatfish skin did not show the bands Amide A and Amide II. With molecular identification, it is possible to establish the conditions for biomedical applications and the viability of the material for the development of new collagen-based biopolymers for therapeutic gain.

Keywords: biopolymer, biotechnology, fish, marine.

1. INTRODUÇÃO

O colágeno é uma proteína fibrosa, abundante no tecido animal e que corresponde a 30% do total de proteínas presentes (Oliveira *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2018; Guet *et al.*, 2019). A maioria das moléculas de colágeno extraídas é proveniente de mamíferos, principalmente, suínos, ovinos e bovinos (Ghodbane; Dunn, 2016), e de aves (Li *et al.*, 2017). No entanto, o colágeno derivado de mamíferos, principalmente, de suínos e bovinos, apresenta várias deficiências, incluindo imunogenicidade, variação de lote para lote e risco de contaminação por doenças zoonóticas (Davison-Kotler; Marshall; García-Gareta, 2019).

Em contrapartida as fontes de mamíferos, as fontes de colágeno de origem aquática são abundantes e promissoras, tendo como representantes os peixes teleósteos, peixes cartilagosos e invertebrados marinhos (Davison-Kotler; Marshall; García-Gareta, 2019). Os subprodutos de peixes são os mais almejados para extração de colágeno pela indústria, tais como pele, escamas e bexiga natatória, muito devido ao baixo valor econômico e a facilidade de obtenção dessas matérias-primas (Oliveira *et al.*, 2017).

Até o presente momento, a família das moléculas de colágeno é constituída por 29 subtipos, sendo o principal para uso biomédico e farmacêutico, classificado como Tipo I, encontrado abundantemente na pele de peixes (Felician *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2019). Esses colágenos têm sido utilizados com sucesso como biomateriais em procedimentos regenerativos e tratamento de cicatrização, muito devido à sua alta biocompatibilidade e baixa imunogenicidade (Felician *et al.*, 2018; Benjakul *et al.*, 2020).

Para atender à crescente demanda comercial, várias técnicas de extração de colágeno foram utilizadas, isoladamente ou combinadas, a partir dos avanços biotecnológicos (Oliveira *et al.*, 2017). Esses avanços também permitem a fabricação de andaimes de colágeno de várias formas, com ou sem a presença de outros biomateriais (como de quitosana, por exemplo), como na produção de biofilmes, esponjas cirúrgicas e hidrogéis médicos. Os biomateriais de colágeno são amplamente utilizados para desenvolver substitutos de tecido na regeneração ou reparação de tecidos doentes ou danificados (Chowdhury *et al.*, 2018). Ainda, esses biomateriais podem ser utilizados como sutura cirúrgica, agentes hemostáticos, inclusive sendo utilizadas em matrizes básicas para sistemas celulares e substituição/substituto de vasos sanguíneos e válvulas artificiais. Pode ser fabricado como um produto purificado reconstituído de fontes animais para a produção de curativos, incluindo substituição da pele, vasos sanguíneos e válvulas artificiais, entrega transdérmica de medicamentos, nanopartículas para entrega de genes e matrizes básicas para sistemas de cultura de células (Benjakul *et al.*, 2020).



Biomateriais de colágeno ainda podem ser aplicados como substitutos na reconstrução de ossos faciais (Cicciù *et al.*, 2018) e nas preparações de produtos farmacêuticos utilizados nos tratamentos de feridas, queimaduras, cirurgias oftalmológicas, ortopédicas e orais (Muthukumar *et al.*, 2018). Assim, biomateriais a base de colágeno buscam imitar intimamente os conjuntos supramoleculares nativos e têm a capacidade de fornecer de maneira localizada e sustentada populações celulares viáveis e/ou moléculas bioativas/terapêuticas (Sorusanova *et al.*, 2019).

Para que o colágeno seja utilizado, faz-se necessário uma série de procedimentos: pré-tratamento, etapas de extração, etapas de caracterização de suas propriedades físico-químicas e sua identificação estrutural através de técnicas de espectroscopias, como através do uso da espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (Oliveira *et al.*, 2019). A espectroscopia é uma técnica vibracional utilizada na identificação molecular de moléculas proteicas, muito devido a rapidez, baixo custo e não causar alteração no material analisado. São técnicas rápidas, de baixo custo, de fácil reprodução, não causam alteração nos tecidos analisados e dão suporte informacional da estrutura molecular da molécula-alvo (Talari *et al.*, 2016; Riaz *et al.*, 2018), sendo amplamente aplicada na identificação da estrutura de colágenos extraídos de subprodutos de organismos aquáticos (Hukmi; Sarbon, 2018; Hamdan; Sarbon, 2019; Oliveira *et al.*, 2019).

Assim, este trabalho objetivou isolar colágeno de subprodutos de pele de saramunete (*Pseudupeneus maculatus*), uma espécie de fácil aquisição e encontrada em abundância nos boxes comerciais de pescado e frutos do mar, e realizar sua identificação estrutural através da espectroscopia de FTIR, visando sua aplicação no segmento terapêutico.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Subprodutos de pele de peixe

Para este trabalho, foram utilizados os subprodutos de pele da espécie de peixe marinho saramunete (*Pseudupeneus maculatus*), devido à facilidade de aquisição, abundância e o baixo preço de sua comercialização. Exemplares de saramunete (*P. maculatus*) foram adquiridos junto a comerciantes do Mercado Público de Casa Amarela, Recife-PE. As peles foram higienizadas e conduzidas ao Laboratório de Tecnologia de Bioativos, LABTECBIO, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, DMFA, Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE. A espécie utilizada está registrada no Patrimônio Genético Brasileiro sob o nº A25441A.

2.2 Pré-tratamento de subprodutos de pele

Para eliminar as proteínas não colagenosas do material, a pele foi misturada com 0,2 M de NaOH em uma solução alcalina (1:10) (p/v). A mistura foi continuamente agitada durante 3 horas a 4°C e a solução alcalina foi trocada a cada 30 minutos. A pele tratada foi então lavada com água destilada fria até um pH neutro ou fracamente básico da água de lavagem ser atingido. O pH da água de lavagem foi determinado utilizando um medidor de pH digital (Sartorius América do Norte, Edgewood, Nova Iorque, EUA). Em seguida, foi adicionado 10% de álcool butílico, na proporção de 1:10 (p/v), para remover gorduras. A mistura foi continuamente agitada durante 6 h a 4°C e para posterior lavagem da pele, como descrito anteriormente. Em seguida, adicionou-se 3% de peróxido de hidrogênio a uma taxa de 1:10 (v/v) para o branqueamento da pele (Oliveira *et al.*, 2019).



2.3 Extração ácido solúvel (ASC) do colágeno e dosagem de proteínas totais

O colágeno foi obtido pelo método ácido solúvel (ASC). O colágeno foi extraído com ácido acético 0,5 M, a proporção de ácido/amostra foi de 1:20 (p/v), durante 3 dias. A solução viscosa resultante foi centrifugada a 20,000 g durante 30 minutos, a 4°C. Os sobrenadantes foram combinados e adicionados NaCl para dar uma concentração final de 0,9 M, seguido de precipitação do colágeno por meio da adição de NaCl até à concentração final de 2,5 M em 1,5 M de Tris-HCl (pH 8,8). Depois de repousar durante a noite, o precipitado resultante foi recolhido por centrifugação a 20,000 g durante 60 minutos, para em seguida ser dissolvido em 10 volumes de ácido acético 0,5 M. A solução obtida foi dialisada contra 0,1 M ácido acético e subsequentemente contra água destilada. O dialisado foi liofilizado e referido como o colágeno solúvel em ácido (ASC) (Chen *et al.*, 2016). A concentração de proteína total foi determinada de acordo com Smith *et al.* (1985).

2.4 Espectrômetro de infravermelho FTIR

A espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para o colágeno da pele de saramunete (*P. maculatus*) foi obtida utilizando um espectrofotômetro (modelo FTLA 2000-102). Para análise espectral, as amostras de ASC foram colocadas sobre a célula de cristal e a célula foi fixada na montagem do espectrômetro FTIR. Os espectros na gama de 600-4000 cm⁻¹ com sinal automático (Oliveira *et al.*, 2019).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração do colágeno da pele de saramunete (*P. maculatus*) foi realizada com sucesso, de modo rápido e prático. Do ponto de vista estrutural, o colágeno extraído pelo método ASC apresentaram Bandas A (3347 cm⁻¹), Amida I (1633 cm⁻¹) e Amida III (1081 cm⁻¹), como visualizado na Figura 1.

Os picos são característicos das ligações amidas, que são os marcadores mais comuns da conformação do esqueleto polipeptídico. Esses picos correspondem a prolina e a hidroxiprolina das moléculas de colágeno conhecidas. O colágeno ASC não apresentou as bandas Amida B e Amida II, como ilustrado na figura 1.

A ausência das bandas Amida B e Amida II podem estar relacionadas ao procedimento utilizado para a extração do colágeno, como o fator tempo de exposição ao ácido acético, por exemplo, sugerindo que o processo extrativo influenciou na organização estrutural da proteína colagenosa. Levando em consideração que a presença da banda Amida B sinalizaria o alongamento simétrico da cadeia de CH₂, e que a presença da banda Amida II confirmaria a manutenção da estrutura helicoidal durante o procedimento de extração, é sugestivo que o procedimento utilizado tenha causado desorganização da molécula. Assim, é recomendada a utilização de outras técnicas espectroscópicas (dicroísmo circular, por exemplo) para confirmação dessa alteração.

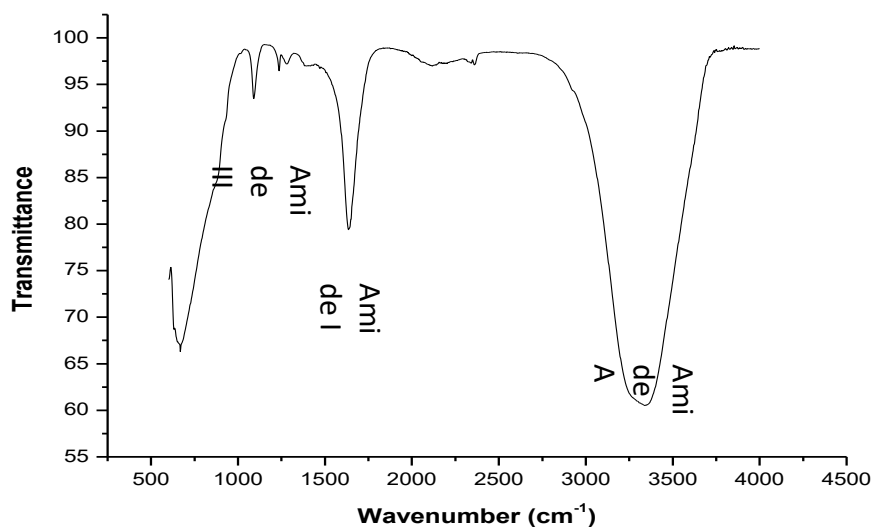


Figura 1 – Espectros de infravermelho FTIR de colágeno ASC extraído da pele de saramunete (*Pseudupeneus maculatus*).

Na prática, a ausência das referidas bandas não inviabiliza o colágeno extraído para fins de produção de biomateriais. Esses resultados são corroborados por colágenos extraídos por Hamdan; Sarbon (2019) a partir das escamas de uma espécie sardinha (*Sardinella fimbriata*) através de método solúvel em ácido (ASC) e enzimático (PSC), e que foram observados apenas as bandas Amida A (3416.90 cm^{-1} e 3423.64 cm^{-1}), Amida II (1589.77 cm^{-1} e 1400.79 cm^{-1}) e Amida III (1414.06 cm^{-1} e 1264.47 cm^{-1}), respectivamente. Também, por Hukmi; Sarbon (2018) ao extrair colágeno ASC e PSC do peixe pangá (*Pangasius sp.*), obtendo as bandas Amida A (3457.07 cm^{-1} e 3447.86 cm^{-1}), Amida II (1541.78 cm^{-1} e 1541.73 cm^{-1}) e Amida III (1242.90 cm^{-1} e 1239.39 cm^{-1}), respectivamente. Evidenciando que embora alterada estruturalmente pelo método de extração, a proteína colagenosa ainda pode ser utilizada para fabricação de filmes, esponjas e hidrogéis (Chowdhury *et al.*, 2018), por exemplo.

4. CONCLUSÃO

O colágeno extraído pelo método ASC apresentou características estruturais de interesse para utilização na produção de biomateriais para fins médicos. A fonte da matéria-prima se torna uma alternativa viável em substituição aos colágenos empregados na atualidade, como forma de redução de custos, agregação de valor ao produto aquícola e para geração de novos produtos biotecnológicos.

5. REFERÊNCIAS

BENJAKUL, S.; SAE-LEAW, T.; SIMPSON, B.K. *Byproducts from Fish Harvesting and Processing*, in: SIMPSON, B.K.; ARYEE, A.N.A.; TOLDRÁ, F. (Eds.), *Byproducts from Agriculture and Fisheries: Adding Value for Food, Feed, Pharma, and Fuels*. Wiley, p.179–217, 2020.



CHEN, S.; CHEN, H.; XIE, Q.; HONG, B.; CHEN, J.; HUA, F.; BAI, K.; HE, J.; YI, R.; WU, H. Rapid isolation of high purity pepsin-soluble type I collagen from scales of red drum fish (*Sciaenops ocellatus*). *Food Hydrocoll.*, v.52, p.468–477, 2016.

CHOWDHURY, S.R.; MH BUSRA, M.F.; LOKANATHAN, Y.; NG, M.H.; LAW, J.X.; CLETUS, U.C.; BINTI HAJI IDRUS, R. Collagen Type I: A Versatile Biomaterial. *Advances in experimental medicine and biology*, v.1077, p.389–414, 2018.

CICCIÙ, M.; CERVINO, G.; HERFORD, A.S.; FAMÀ, F.; BRAMANTI, E.; FIORILLO, L.; LAURITANO, F.; SAMBATARO, S.; TROIANO, G.; LAINO, L. Facial bone reconstruction using both marine or non-marine bone substitutes: evaluation of current outcomes in a systematic literature review. *Mar. Drugs*, v.16, p. 27, 2018.

DAVISON-KOTLER, E.; MARSHALL, W.S.; GARCÍA-GARETA, E. Sources of collagen for biomaterials in skin wound healing. *Bioeng.*, v.6, p.1–15, 2019.

FELICIAN, F.F.; XIA, C.; QI, W.; XU, H. Collagen from marine biological sources and medical applications. *Chem. Biodivers.*, v.15, p.e1700557, 2018.

GHODBANE, S.A.; DUNN, M.G. Physical and mechanical properties of cross-linked type I collagen scaffolds derived from bovine, porcine, and ovine tendons. *Journal of biomedical materials research. Part A*, v.104, n.11, p.2685–2692, 2016.

GU, L.; SHAN, T.; MA, Y.X.; TAY, F.R., NIU, L. Novel Biomedical Applications of Crosslinked Collagen. *Trends Biotechnol.*, v.37, n.5, p.464-491, 2019.

HAMDAN, F.S.; SARBON, N.M. Isolation and characterisation of collagen from fringescale sardinella (*Sardinella fimbriata*) waste materials. *Int. Food Res. J.*, v.26, p.133–140, 2019.

HUKMI, N.M.M.; SARBON, N.M. Isolation and characterization of acid soluble collagen (ASC) and pepsin soluble collagen (PSC) extracted from silver catfish (*Pangasius sp.*) skin. *Int. Food Res. J.*, v.25, p.2601–2607, 2018.

LI, H.; YUN, H.Y.; BAEK, K.J.; KWON, N.S.; CHOI, H.R.; PARK, K.C.; KIM, D.S. Avian Collagen Is Useful for the Construction of Skin Equivalents. *Cells, tissues, organs*, v.204, n.5-6, p.261–269, 2017.

LIN, K.; ZHANG, D.; MACEDO, M.H.; CUI, W.; SARMENTO, B.; SHEN, G. Advanced collagen-based biomaterials for regenerative biomedicine. *Adv. Funct. Mater.*, v.29, p.1804943, 2018.

MUTHUKUMAR, T.; SREEKUMAR, G.; SASTRY, T.P.; CHAMUNDEESWARI, M. Collagen



as a potential biomaterial in biomedical applications. *Rev. Adv. Mater. Sci.*, v.53, p.29–39, 2018.

OLIVEIRA, V.M.; CARNEIRO DA CUNHA, M.N.; NASCIMENTO, T.P.; ASSIS, C.R.D.; BEZERRA, R.S.; PORTO, A.L.F. Collagen: general characteristics and production of bioactive peptides - a review with emphasis on byproducts of fish. *Acta Fish. Aquat. Resour.*, v.5, p.70–82, 2017.

OLIVEIRA, V.M.; NERI, R.C.A.; MONTE, F.T.D.M.; ROBERTO, N.A.; COSTA, H.M.S.; ASSIS, C.R.D.; SANTOS, J.F.; BEZERRA, R.S.; PORTO, A.L.F. Crosslink-free collagen from *Cichla ocellaris*: Structural characterization by FT-IR spectroscopy and densitometric evaluation. *J. Mol. Struct.*, v.1176, p.751–758. 2019.

RIAZ, T.; ZEESHAN, R.; ZARIF, F.; ILYAS, K.; MUHAMMAD, N.; SAFI, S.Z.; RAHIM, A.; RIZVI, S.A.A.; REHMAN, I.U. FTIR analysis of natural and synthetic collagen. *Appl. Spectrosc. Rev.*, v.53, p.703–746, 2018.

SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, v.150, n.1, p.76–85, 1985.

SONG, W.K.; LIU, D.; SUN, L.L.; LI, B.F.; HOU, H. Physicochemical and Biocompatibility Properties of Type I Collagen from the Skin of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) for Biomedical Applications. *Mar. Drugs*, v.17, p.137, 2019.

SORUSHANOVA, A.; DELGADO, L.M.; WU, Z.; SHOLOGU, N.; KSHIRSAGAR, A.; RAGHUNATH, R.; MULLEN, A.M.; BAYON, Y.; PANDIT, A.; RAGHUNATH, M.; ZEUGOLIS, D.I. The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)*, v.31, n.1, Artigo e1801651, 2019.

TALARI, A.C.S.; MARTINEZ, M.A.G.; MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, I.U. Advances in Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Appl. Spectrosc. Rev.*, v.52, p.456–506, 2016.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Universidade Federal Rural de Pernambuco pela bolsa de PIBIC, além da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).



ÁREA DE SUBMISSÃO: **Biologia Molecular**

POTENCIAL DE DETECÇÃO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR POR TESTES MOLECULARES EM SWAB CONJUNTIVAL DE EQUINOS ASSINTOMÁTICOS NA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE, PERNAMBUCO

K. P. B. DE LIMA¹, **C.J. DA SILVA**^{1,2}, **J. F. C. L. S. MONTEIRO**¹, **S.F DE SOUZA**¹, **C. S. A. G E SILVA**³, **G.L. DOS SANTOS**², **A. K. S. F. SILVA**¹, **E. L. ALMEIDA**¹, **S. P. BRANDÃO FILHO**¹, **M. E. F. BRITO**¹

¹ Departamento de Imunologia, Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ-PE

² Núcleo de Vigilância em Saúde de Moreno;

³ Universidade Fernando Pessoa, Portugal

E-mail para contato: karinaabaracho@gmail.com

*RESUMO – Em Pernambuco, o município de Moreno localizado na região metropolitana de Recife, a leishmaniose tegumentar (LT) destaca-se por apresentar importante incidência, com uma média de 52 casos da doença registrados ao ano e 30% de prevalência. A LT possui hospedeiros e possíveis reservatórios naturais da doença que já foram descritos em áreas endêmicas de várias regiões do Brasil entre eles os equinos, cavalos (*Equus caballus*) e jumentos (*Equus asinus*). O diagnóstico da doença necessita de contexto epidemiológico, clínico e confirmação laboratorial que se baseiam em testes parasitológicos, imunológicos e moleculares. Esse estudo avaliou o potencial de infecção através de testes moleculares (PCR convencional e qPCR) em equinos assintomáticos para LT em área endêmica de Recife, PE. Foram cedidas 25 amostras de swab de conjuntiva ocular (método não invasivo) pelo Serviço de Referência em Leishmanioses IAM – FIOCRUZ PE. Os resultados demonstraram 20% de positividade por PCR em tempo real para LT sendo a espécie *Leishmania (V.) braziliensis*, a única até então notificada no Estado de PE e na maioria do país. Os resultados obtidos no estudo evidenciam que, os equinos podem atuar como potenciais reservatórios do parasito envolvidos no ciclo zoonótico de transmissão dessa endemia.*

Palavras Chave: *Epidemiologia, PCR convencional, qPCR*

*ABSTRACT – In Pernambuco, the Moreno county, located in Recife Metropolitan Region, the tegumentary leishmaniasis (LT) is highlighted for presenting important incidence, with a mean number of 52 cases of the disease reported yearly and 30% of prevalence. LT possesses hosts and possible natural reservoirs of the disease that already has been described in endemic areas from several regions in Brasil among them are equines, horses (*Equus caballus*) and donkeys (*Equus**



*asinus). The illness diagnosis requires epidemiologic and clinical context, as well as parasitological, immunological and molecular tests based laboratorial confirmation. The present study evaluated the infection potential for LT through molecular tests (conventional PCR and qPCR) on asymptomatic equines in a endemic area of Recife, PE. Were gave by the Serviço de Referência em Leishmanioses IAM-FIOCRUZ PE 25 ocular conjunctive swab samples (non invasive method). The results showed 20% positivity by real time PCR for LT being the species *Leishmania (V.) braziliensis*, the only one notified until now in the State of PE and most of the country. The attained results in the study show that equines can operate as potential reservoirs of the parasite involved in the zoonotic cycle of this endemy transmission.*

Keywords: *Epidemiology, conventional PCR, qPCR*

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é caracterizada por sua forma cutânea podendo atingir também a mucosa. É endêmica em 98 países, entretanto quase 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem no estado plurinacional da Bolívia, Brasil e Peru (WHO, 2016 ALVAR et al., 2012). No Brasil a LT possui padrões de transmissão onde tem-se observado uma diversidade de vetores, reservatório e hospedeiros (GOMES et al., 2014; BRILHANTE, 2016).

No Brasil e na região nordeste a principal espécie causadora da LT é a *Leishmania (V.) braziliensis* que representa uma população extremamente diversificada (BRITO et al., 2009; SÁ., 2017). É característica da espécie apresentar diferente formas clínicas, poucos parasitos nas lesões, e a maioria das manifestações clínicas é caracterizada por lesões únicas, localizada na pele a partir da inoculação das formas promastigotas por um vetor (BRASIL, 2017).

A infecção pelo gênero *Leishmania* foi descrita em animais silvestres, sinantrópicos e domésticos. Os animais domésticos podem estar infectados, porém não doentes, podendo atuar como reservatórios no ciclo de transmissão desta patologia, a exemplo do gênero *Equus* como os cavalos (*Equus caballus*) e jumentos (*Equus asinus*). No Brasil, o papel dos equinos no ciclo de transmissão da LT ainda não foi definitivamente esclarecido (BRASIL, 2010), já na Venezuela esses animais são considerados reservatório doméstico de *L. braziliensis* (AGUILAR et al., 1984; BARBOSA et al., 2010).

Os métodos clássicos disponíveis para o diagnóstico da doença não apresentam a eficácia e aplicabilidade desejada. Sendo assim, é necessário avaliar epidemiologia, aspectos clínicos e a confirmação laboratorial dos casos, o que pode ser realizado através dos métodos parasitológicos, imunológicos e moleculares (BRITO et al., 2012). O presente estudo propõe avaliar a potencial infecção de LT em cavalos (*Equus caballus*) e jumentos (*Equus asinus*) a fim de contribuir para o conhecimento de potenciais reservatórios do parasito no ciclo de transmissão.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Área de estudo

O estudo foi desenvolvido no Engenho Jardim, município de Moreno, localizado na Região Metropolitana do Recife, estado de Pernambuco, Brasil. Distância 55.7 km da capital, compreende uma área de 195.603 km² e uma densidade populacional de 311.94 hab./km². Atividade econômica predominante nessa região é o cultivo da cana-de-açúcar. As casas são construídas próximas a Mata Atlântica remanescentes com a presença do homem e de animais domésticos (cão, cavalo, gato e ovelhas). O principal vetor da região é o *Lutzomyia whitmani*, responsável pela transmissão

da *L. (V.) braziliensis*.

Animais

As amostras de *swab* de conjuntiva ocular dos equinos foram cedidas pelo Serviço de Referência em Leishmanioses do IAM/ FIOCRUZ- PE obtendo-se um n amostral de 25, que foram acondicionadas para posterior processamento no Laboratório de Imunoparasitologia-LIMP, IAM/FIOCRUZ-PE.

Extração de DNA

O DNA de *Leishmania* spp. foi extraído seguindo o protocolo de adsorção à sílica em suspensão proposto por DA SILVA (2017).

Curva de Diluição

Foi avaliada a sensibilidade de detecção de DNA de *Leishmania (Viannia) braziliensis* utilizando a cepa de referência IOC-566 (MHOM/BR/75/M2903). O DNA foi diluído em série nas concentrações de 10ng/L a 1fg/ μ L.

Reação em cadeia da polimerase (PCR convencional)

A PCR convencional foi realizada nas condições descritas por DE BRUIJN E BARKER., (1992) tendo como alvo de detecção o kDNA, que amplifica a região de 750 pb. Em seguida foi realizado eletroforese de gel em agarose a 1% corado com brometo de etídeo. A PCR convencional será utilizada como referência para definição de positivos e negativos, técnica estabelecida no diagnóstico do Serviço de Referência em Leishmanioses (SRL) do IAM – FIOCRUZ/PE.

PCR em tempo real (qPCR)

As amostras de DNA foram também submetidas à qPCR, conforme descrito por PAIVA-CAVALCANTI et al.,(2013). Este sistema utiliza o kDNA como alvo de detecção, região variável do minicírculo do cinetoplasto de *Leishmania* spp. amplificando um fragmento de 138 pb.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Relacionado aos resultados da curva de diluição de DNA de *Leishmania braziliensis* houve amplificação de 750 pb, confirmando o subgênero *Viannia* como descrito por BRUIJN E BARKER (1992). O limite de detecção de DNA para técnica de PCR foi de 10 fg (Figura1.) (RODRIGUES et al.,2002).

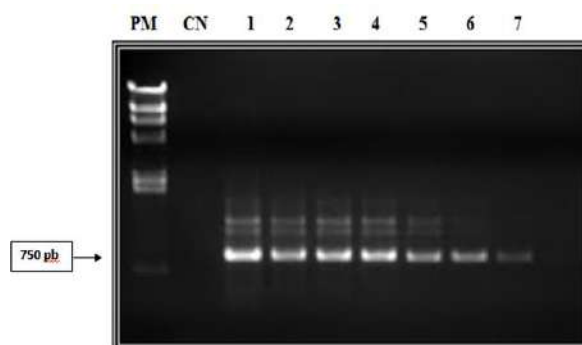


Figura 1. Curva de detecção em eletroforese em gel de agarose a 1% corado por brometo de etídeo com limite de detecção de 10fg.

Legenda: PM (Marcador de peso molecular DNA) CN (controle negativo) linhas 1 a 7 (Concentração de DNA: 10ng/ μ L, 1ng/ μ L, 100 pg/ μ L ,10pg/ μ L, 1pg/ μ L, 100fg/ μ L, 10fg/ μ L).

Para qPCR a eficiência da curva obteve-se 98.274% com limite de detecção de 1fg (Figura.2). Os achados corroboram com o estudo de PAIVA-CAVALCANTI et al.,(2013) onde foi confirmado com o mesmo limiar de detecção para o alvo kDNA.

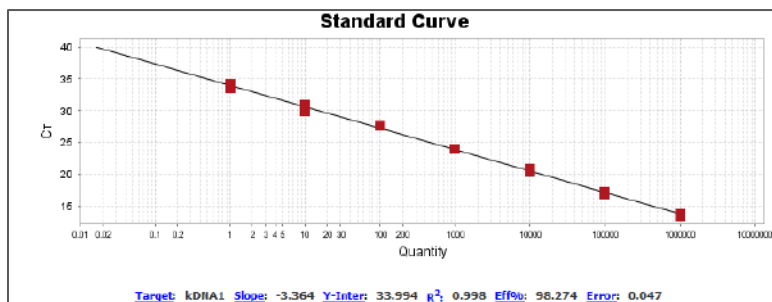


Figura 2. Curva de diluição para *L. V. braziliensis*.

A espécie identificada foi a *L. V. braziliensis* com pico de 81,3°C (específico para espécie) que varia de 78 a 81° C (Figura 3.). Estes dados também são demonstrado por PAIVA-CAVALCANTI et al., (2013). Além disso, foi a única espécie notificada até o momento no estado de Pernambuco, associada a LT (BRITO et al.,2009; 2012; 2018).

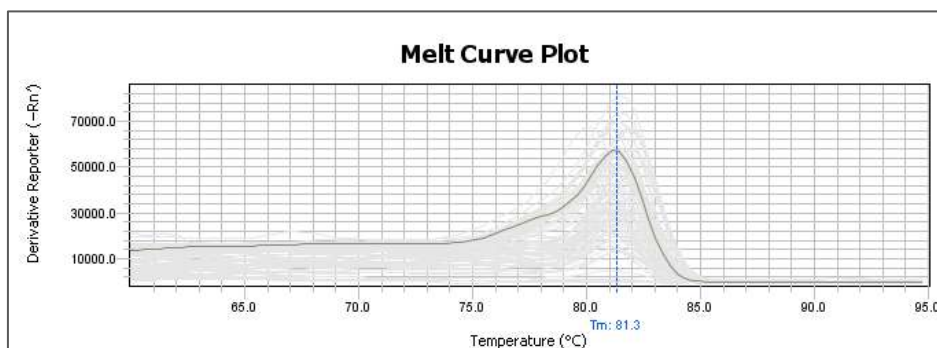


Figura 3. Curva de melting com uma amostra positiva para *L. V. braziliensis* com pico de temperatura de 81,03°C (específico para essa espécie)

Do total de 25 amostras de *swab* de conjuntiva ocular obtidas de equinos, de raça e sexo diferentes, 16 foram submetidas aos teste de PCR convencional e qPCR, 09 amostras não foram realizadas por motivos logísticos. Para qPCR as amostras apresentaram um percentual de 20% (5/16) de positividade para LT e 44% (11/16) não foram detectadas no teste. Para PCR convencional nenhuma amostra apresentou positividade.

A qPCR se mostra uma técnica cada vez mais útil na detecção e quantificação de protozoários. Estudos relatam que a qPCR demonstra ser mais sensível do que o PCR convencional, sendo o principal fator, o limite de detecção. Além disso, há grande variação entre o tempo de infecção e a carga parasitária assim como o tipo e qualidade da amostra biológica utilizada, a qual tem influência no resultado da análise (ROLÃO et al.,2004; FRANCINO et al., 2006).

A utilização de *swab* bacteriológico é relatado em literatura como método de coleta não invasivo para o diagnóstico de diversas doenças como tuberculose (SALEM et al., 2007),



coqueluche (ALMEIDA et al., 2011) e recentemente para covid 19 (PACHITO.,2020). Sua utilização na conjuntiva ocular também é descrita para outras enfermidades como leucemia viral felina (VICTOR., 2019) e leishmaniose visceral canina (FERREIRA et al., 2008; LEITE et al., 2011). Tratando da LT, MIMORI et al., (2002) e BRITO et al., (2012) obtiveram sucesso no diagnóstico ao coletar amostras utilizando *swab* combinados à técnica de PCR, onde o método se mostra efetivo na identificação do DNA do parasito nas amostras, concordando ainda com os achados de BEVENGA et al., (2013).

Os equinos são descritos no Brasil como possível hospedeiro natural da LT, uma vez que, estes animais atuam de forma íntima com humanos sendo utilizados como fonte de renda de muitas famílias de áreas rurais (ESCOBAR et al.,2019). Os resultados do estudo demonstram que mesmo sem apresentar sintomas esses animais podem estar infectados, como também foi descrito por (BENASSI.,2015) que obteve positividade de 66,66% (36/54). Já BRANDÃO-FILHO et al., (2003) obtiveram resultados de 6,9% (4/58) para raspados cutâneos e 13,8% (8/58) para PCR em amostras de equinos de área endêmica da doença.

Na região de estudo é descrito ainda a presença da espécie *Lutzomya whitmani*, vetor de transmissão da *Leishmania braziliensis*, o que contribui para possibilidade de infecção de equinos e outros animais domésticos, silvestres e sinantrópicos (BRANDÃO et al., 2003). O diagnóstico de animais domésticos assintomáticos é de considerável importância, pois podem constituir reservatórios de *Leishmania* spp (DANTAS TORRES.,2006).

4. CONCLUSÃO

Esse estudo demonstra que os equinos são animais propensos à infecção pelo protozoário *Leishmania* spp. e que podem favorecer a manutenção do ciclo epidemiológico da leishmaniose tegumentar em área endêmica. Sugere-se a continuidade na investigação do papel dos equinos na transmissão da doença para o estabelecimento de medidas efetivas no controle desta enfermidade.

5. REFERÊNCIAS

AGUILAR, C. M. et al. Study of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in Venezuela: the role of domestic animals. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, p. 181-195, 1984.

ALMEIDA, I.A.Z.C.de et al. Coqueluche: avaliação de 10 anos de diagnóstico laboratorial na região Noroeste do estado de São Paulo, 2001-2011. **BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista (Online)**, v. 8, n. 90, p. 16-23, 2011.

BARBOSA, D.S. Soroprevalência e variáveis epidemiológicas associadas à leishmaniose visceral canina em área endêmica no município de São Luís, Maranhão, Brasil. **Ciência Anim. Bras.** 11, 653–659.2010.

BENVENGA, G.U. **Ocorrência de Leishmania spp. em cães, gatos e equinos no Estado de São Paulo**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.2013

BENASSI, J.C. **Detecção de Leishmania spp. por PCR em tempo real em amostras de suabe conjuntival de cães, gatos e equinos**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2015



BRANDÃO-FILHO, S.P. et al.; Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, London, v. 97, n. 3, p. 291-296, 2003

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de vigilância em saúde. **Guia de vigilância em Saúde**. Brasília, 2017.p. 705.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010

BRILHANTE, A. F. et al. Leishmaniose tegumentar canina por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em um assentamento agrícola, área endêmica para leishmanioses. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 4, p. 927-930, 2016.

BRITO, M. E. F. et al. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 45, n. 4, p. 425–429, 26 jul. 2012.

BRITO, M. E. F et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolated from the saliva of patients in a cutaneous leishmaniasis-endemic area of northeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 113, n. 4, 2018

BRITO, M.E.F de et al. Occupationally acquired American cutaneous leishmaniasis. **Case Reports in Dermatological Medicine**, New York, v. 2012, n 4, 2012.

BRITO, M. E. F. et al. Species diversity of *Leishmania (Viannia)* parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil: Species diversity of *Leishmania* parasites. **Tropical Medicine & International Health**, Oxford, v. 14, n. 10, p. 1278–1286, out. 2009.

DANTAS-TORRES, F. et al. Leishmaniose Felina: revisão de literatura. **Rev Clín Vet**, v. 61, p. 32-40, 2006.

DE BRUIJN, M.H,L; BARKER, D.C. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta tropica**, v. 52, n. 1, p. 45-58, 1992.

DE PAIVA CAVALCANTI, M. et al. Quantitative real time PCR assays for the detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in animals and humans. **Molecular and Cellular Probes**, London v. 27, n. 3–4, p. 122–128, jun, 2013.

ESCOBAR, T.A. et al. **Identificação molecular e avaliação clínica, bioquímica e hematológica em equinos e caninos com Leishmaniose**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Pampa 2019.



FERREIRA, S.A. et al. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR–hybridization in Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 152, n. 3-4, p. 257-263, 2008.

FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, v. 137, n. 3-4, p. 214-221, 2006.

GOMES, C.M. et al. Complementary exams in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 89, n. 5, p. 701-709, 2014.

LEITE, R.S. et al. The use of conjunctival swab samples for PCR screening for visceral leishmaniasis in vaccinated dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 36-41, 2011.

MIMORI, T. et al. Usefulness of sampling with cotton swab for PCR-diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the New World. **Acta tropica**, v. 81, n. 3, p. 197-202, 2002.

PACHITO D.V. et al. Testes diagnósticos para Covid-19. Síntese de evidência. Disponível em: <https://oxfordbrazilebm.com/index.php/2020/03/27/testes-diagnosticos-covid-19/>. Acessado em [13 de julho de 2020].

RODRIGUES, E. H. G. et al. Evaluation of PCR for Diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis in an Area of Endemicity in Northeastern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington v. 40, n. 10, p. 3572–3576, 2002.

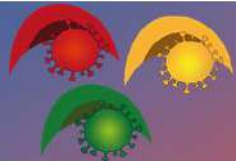
ROLAO, N. et al. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction–enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 5, p. 1150-1154, 2004.

SÁ, B.S.L.F de et al. **Estudo da diversidade genética de cepas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* isoladas em regiões endêmicas no estado de Pernambuco, nordeste do Brasil**. Tese de Doutorado. Instituto Aggeu Magalhães.2017

SALEM, J.I. et al. PKO: alternative method for isolating mycobacteria from sputum. **Acta Amazonica**, v. 37, n. 3, p. 419-424, 2007.

SILVA, A.O. da et al. **Avaliação de protocolos de extração e purificação de DNA alvo da reação em cadeia da polimerase na detecção de *Leishmania (Viannia) spp.*** Tese de Doutorado. Instituto Aggeu Magalhães.2017

VICTOR, R M. et al. **Diagnóstico molecular da Leucemia viral felina por meio da utilização de *Swab Oral, conjuntival e retal***. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. 2019



6. AGRADECIMENTOS

Agradecimentos aos autores e colaboradores, em especial ao SRL- Serviço de Referência em Leishmanioses do IAM. Ao Instituto Aggeu Magalhães- IAM (FIOCRUZ – PE) pela infraestrutura necessária ao desenvolvimento das atividades e apoio da FACEPE pelo financiamento do projeto.



ÁREA DE SUBMISSÃO: **Biologia Molecular**

PERFIL DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS PARA SARS-COV-2 NA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE E MUNICÍPIOS DO INTERIOR DO ESTADO DE PERNAMBUCO PELO NÚCLEO DE PESQUISA EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA DA UFPE

J. V. MELO GOMES¹, E. G. C. CUNHA¹, A. P. B. ALBUQUERQUE¹, S. M. C. GONÇALVES¹, P. S. S. de OLIVEIRA¹, A. R. de ALMEIDA¹, M. S. R. NETO¹, A. B. F. da PAIXÃO L. F. CAETANO¹, E. F. dos SANTOS Jr¹, P. R. G. CARDOSO¹, P. B. N. da SILVA¹, M. W. L. QUIRINO¹, L. V. GALDINO¹, E. D. L. da SILVA¹, V. C. M. da COSTA¹, V. M. F. de CARVALHO¹, L. V. N. CARVALHO¹, S. K. S. de PAULA¹, S. M. de SOUZA¹, A. P. F. A. C. de MELLO¹, D. A. A. de VASCONCELOS¹, R. E. V. M. SOUZA¹, J. P. F. de MOURA¹, R. G. G. de MORAIS¹, D. Q. NASCIMENTO¹; I. F. G. SILVA¹, B. Z. L. PARISI¹, V. A. da COSTA¹, D. M. BISPO¹, H. I. LEÃO¹, C. B. S. PEGADO¹, M. E. O. GOLÇALVES¹, F. MOTTERAN¹, F. S. DUARTE¹, R. L. GUIMARÃES¹, G. C. G. MILITAO¹, J. K. F. ANDRADE¹, M. BRAYNER CAVALCANTI¹, P. SANDRIN-GARCIA¹, M. B. O. CHAGAS¹, M. J. B. M. RÉGO¹, M. M. da ROSA¹, M. C. PEREIRA¹, M. G. R. PITTA¹

¹ Grupo de Diagnóstico do Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica – Suely Galdino, Universidade Federal de Pernambuco

E-mail para contato: joao.melogomes@ufpe.br

RESUMO – A pandemia da COVID-19 anunciada pela OMS em março ficou atribuída a elevada taxa de pacientes em leitos de enfermagem e UTI, devido a complicações respiratórias. O Brasil é o segundo maior epicentro da pandemia devido a vários fatores, incluindo a baixa testagem da população. O diagnóstico padrão ouro para detecção do vírus SARS-CoV-2 é a RT-qPCR. Diante disso, a Universidade Federal de Pernambuco firmou convênios com várias instituições, incluindo a Procuradoria Regional do Trabalho (6ª Região), a Prefeitura da Cidade do Recife, e a Associação Municipalista de Pernambuco (AMUPE) com o objetivo de ampliar o diagnóstico da COVID-19 no Estado de Pernambuco. Amostras de orofaringe provenientes do Recife e de 123 municípios foram encaminhadas ao NUPIT-SG/UFPE para realização do processamento, extração do RNA e RT-qPCR do material genético do vírus. No total, foram processadas 2224 amostras da região metropolitana do Recife, contabilizando 69.53% negativas e 29.61% positivas, com 17 amostras inconclusivas. Já os demais municípios de Pernambuco, foram processadas 2372 amostras, somando 54.51% negativas e 44.98% positivas, com 3 amostras inconclusivas. Na cidade do Recife se destaca pelo decréscimo no número de casos, enquanto para os municípios do interior do Estado os números indicam avanço COVID-19. Portanto, o NUPIT-SG/UFPE realizou o diagnóstico de mais de 4.500 pacientes contribuindo para a ampliação do diagnóstico no estado de Pernambuco. A ampliação da testagem continua sendo fundamental para o maior acompanhamento e controle epidemiológico da doença na população no Estado de Pernambuco, influenciando a tomada de decisões por parte dos governantes.



Palavras chave: Diagnóstico; COVID-19; RT-qPCR; Biologia Molecular.

ABSTRACT – The COVID-19 pandemic announced by the WHO in March was attributed to the high rate of patients in infirmary and ICU beds, due to respiratory complications. Brazil is the second largest epicenter of the pandemic due to several factors, including low population testing. The gold standard diagnosis for the detection of the SARS-CoV-2 virus is RT-qPCR. Therefore, the Federal University of Pernambuco signed agreements with several institutions, including the Regional Labor Office (6th Region), Recife City Hall and Pernambuco Municipal Association (AMUPE) with the objective of expanding the diagnosis of COVID-19 in the State of Pernambuco. Oropharyngeal samples from Recife and 123 municipalities were sent to NUPIT-SG / UFPE for processing, RNA extraction and RT-qPCR of the virus genetic material. In total, 2224 samples from the metropolitan region of Recife were processed, accounting for 69.53% negative and 29.61% positive, with 17 inconclusive samples. In the other municipalities of Pernambuco, 2372 samples were processed, totaling 54.51% negative and 44.98% positive, with 3 inconclusive samples. The city of Recife stands out for the decrease in the number of cases, while for the municipalities in the countryside of the State the numbers indicate COVID-19 progress. Therefore, NUPIT-SG / UFPE diagnosed more than 4,500 patients, contributing to the expansion of diagnosis in the state of Pernambuco. The expansion of testing continues to be fundamental for the greater monitoring and epidemiological control of the disease in the Pernambuco population, influencing the decision making by the government.

Keywords: Diagnosis; COVID-19; RT-qPCR; Molecular biology.

1. INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019, na cidade de Wuhan, na China, foi identificado o primeiro caso de uma paciente que apresentava um quadro de pneumonia de etiologia até então desconhecida. Em janeiro, foi identificado o agente etiológico como um novo vírus do gênero dos betacoronavírus, nomeado então Síndrome Respiratória Aguda Grave causada pelo Coronavírus 2 (SARS-CoV-2) (Lu et al., 2020; Sohrabi, 2020). Devido à alta capacidade de saturar os sistemas públicos de saúde de diversos países e por gerar uma elevada taxa de internação a Organização Mundial da Saúde (OMS), em meados de janeiro de 2020, declarou o SARS-CoV-2 como problema emergencial de saúde pública de preocupação internacional. Em fevereiro de 2020 a OMS nomeou o conjunto de sintomas causadas pelo vírus de Doença do Coronavírus 2019 (COVID-19, sigla em inglês) sendo em março declarada oficialmente como pandemia (Sohrabi, 2020).

A doença foi notificada pela primeira vez no Brasil em 26 de fevereiro, e já em julho o Brasil chegou à marca de 1.930.000 de infectados e 74.133 óbitos confirmados causados pela COVID-19 de acordo com *Our World in Data*. No Estado de Pernambuco, o Informe Epidemiológico nº 141/2020 da Secretaria Estadual de Saúde do Governo do Estado de Pernambuco (SES/PE), registrou 80.115 casos e 6.036 óbitos pela COVID-19 no estado até o dia 21 de julho de 2020. As cidades da região metropolitana como Recife, Olinda e Jaboatão dos Guararapes concentraram o maior número de infectados e de óbitos, assim como as internações nos leitos de enfermaria e UTI.

A Norma Técnica da SES/PE nº 16/2020 ratifica como os testes laboratoriais devem ser utilizados como definição para casos confirmados de COVID-19 em Pernambuco. Em destaque



para o diagnóstico molecular pela reação da cadeia da polimerase de transcriptase reversa em tempo real (RT-qPCR) como padrão-ouro para detecção do SARS-CoV-2. O Laboratório Central de Pernambuco (LACEN-PE) é o laboratório de referência no diagnóstico molecular da COVID-19, sendo a instituição pública do Estado de Pernambuco credenciada para a validação laudos de outros laboratórios seguindo as normas do Regulamento Técnico para Funcionamento de Laboratórios Clínicos, descrito na Resolução RDC/Anvisa nº 302. O convênio firmado entre a UFPE e a prefeitura do Recife e a Associação Municipalista de Pernambuco (AMUPE), tem o objetivo de ampliar o diagnóstico da COVID-19 no Estado de Pernambuco para diminuição da transmissibilidade viral e traçar o perfil dos pacientes, tanto positivos como negativos para a COVID-19.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica – Suely Galdino da UFPE (NUPIT-SG/UFPE) recebeu a proficiência laboratorial pelo LACEN-PE para realizar os exames de RT-qPCR e iniciou o recebimento das amostras a partir do dia 26/05/2020. Amostras de *orofaringe* provenientes do Recife e de mais 123 municípios foram encaminhadas ao LACEN-PE, que por sua vez reencaminhou ao NUPIT-SG/UFPE para realização do processamento e extração do RNA do SARS-CoV-2. A extração do RNA viral foi automatizada no equipamento Maxwell FSC (Promega™), utilizando o kit Maxwell RSC Total Viral TNA (Promega™), extraindo-se 48 amostras a cada 50 minutos. Posteriormente foi feito o processo de amplificação do material genético do vírus por RT-qPCR com o kit RT-qPCR *GoTaq Probe 1-Step RT-qPCR* (Promega™) e sondas e primers do kit 2019-nCoV CDC EUA (catálogo nº 10006770 - IDT®). Foram utilizados controles positivos para SARS-CoV-2 (kit de controle viral positivo viral 2019 NCOV N - IDT®); e o controle humano HS-RPP30 (subunidade proteica da ribonuclease P p30), nº do catálogo 10006626 (IDT®), que indica que a amostra foi extraída de forma eficiente. São considerados positivos pacientes que amplificam os dois primers (N1 e N2), com *threshold cycle* (CT) inferior a 40.

O biorrepositório vem sendo desenvolvido a partir de dados gerados do diagnóstico, na qual cada paciente foi registrado com código COV (paciente de Recife) ou AMU (paciente de outros municípios) com data de chegada ao NUPIT-SG/UFPE e data de processamento da amostra, residência do paciente, além do número de requisição do sistema Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL). Subsequentemente, é lançado os valores do CT de pacientes positivos para o SARS-CoV-2. Todos os dados confidenciais dos pacientes são protegidos de divulgação, seguindo as normas do Comitê de Ética em Pesquisa, com número de registro 31093420.4.0000.5208 CCS/UFPE. A coleta dos dados para o presente estudo iniciou no dia 26/05/2020 e foi até o dia 18/07/2020.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os convênios firmados em abril de 2020, teve o objetivo de ampliar o diagnóstico da COVID-19 no Estado de Pernambuco para reduzir a taxa de transmissão do SARS-CoV-2. Até 18 de julho de 2020, foram realizados um total de 4586 testes de RT-qPCR, contabilizando 61.67% negativas e 37.66% positivas, com 11 amostras inconclusivas. Conforme apresenta a figura 1:

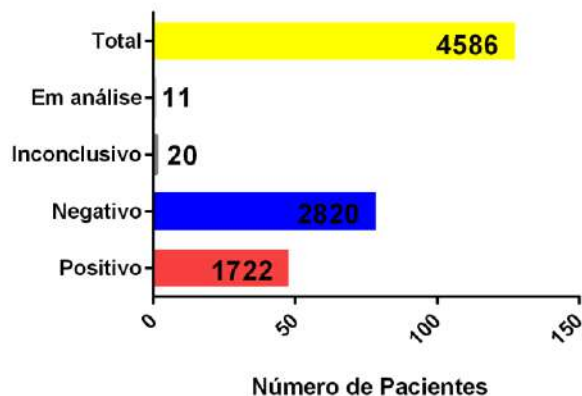


Figura 1 – Quantitativo total de amostras recebidas, a partir do dia 26/05/2020, de pacientes do Recife e de mais 123 municípios da região metropolitana e interior do estado. Em amarelo, o total de pacientes analisados, em vermelho, o quantitativo de amostras positivas e em azul, o quantitativo de negativas. Em análise, marcadas em cinza, são 11, e 20 inconclusivos identificadas em verde.

Das amostras processadas, 2224 são da região metropolitana do Recife, contabilizando 69.53% negativas e 29.61% positivas, com 17 amostras inconclusivas. Já os demais municípios de Pernambuco, foram processadas 2372 amostras, somando 54.51% negativas e 44.98% positivas, com 3 amostras inconclusivas, contribuindo para a expansão dos exames de diagnóstico para COVID-19 em Pernambuco.

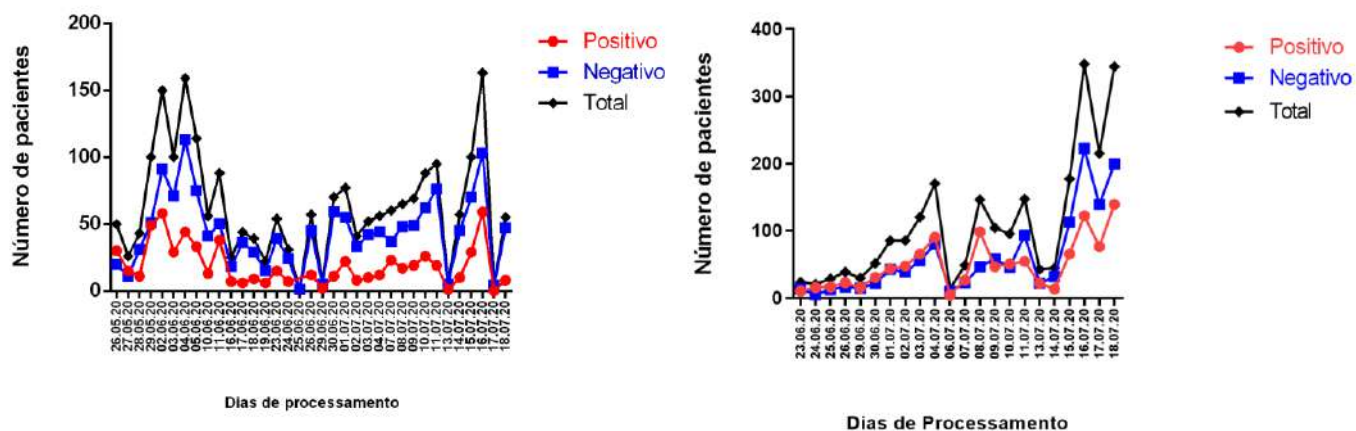


Figura 2 – (A) Quantitativo total de exames de PCR em tempo real executados para o diagnóstico da COVID-19 da cidade do Recife. Em preto, o número total de pacientes, em vermelho, o quantitativo de amostras positivas e em azul o quantitativo de negativas. (B) Quantitativo total de exames de RT-qPCR executados para o diagnóstico da COVID-19 dos demais municípios de Pernambuco. Em preto, o número total de pacientes, em vermelho, o quantitativo de amostras positivas e em azul o quantitativo de negativas.

A curva ainda mostra sinais de crescimento, o que confirma a necessidade ampliação da testagem da população pernambucana. Na cidade do Recife, representado na figura 2 (A) pode apresentar decréscimo no número de casos nas últimas semanas, apesar de ter chegado à marca de



80.115 casos confirmados, os números indicam avanço tardio da pandemia para municípios do interior do Estado, como observado na figura 2 (B).

O NUPIT-SG/UFPE realizou mais de 4.000 exames de diagnóstico para COVID-19 ampliando o quantitativo de testes demandados pelo Estado de Pernambuco. Ademais, a capacidade de realização dos exames, inicialmente 750 testes por semana, foi ampliado para até 2.000 testes por semana. Espera-se contribuir na execução massiva de exames para o diagnóstico do vírus SARS-CoV-2 e assim monitorar a transmissibilidade e incidência da COVID-19 em Pernambuco.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que a testagem continua sendo fundamental para o maior acompanhamento e controle epidemiológico da doença na população no Estado de Pernambuco, o que é essencial para a tomada de decisões por parte dos gestores, especialmente para os municípios do interior do estado.

5. REFERÊNCIAS

CARLOS, W. Graham et al. Novel Wuhan (2019-nCoV) Coronavirus. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 201, n. 4, p. P7, 2020.

ESTADO DE PERNAMUCO. Secretaria Estadual de Saúde. Informe Epidemiológico nº141/2020, Recife, Pernambuco. *Cievspe.com*. Disponível: <<https://www.cievspe.com/novo-coronavirus-2019-ncov>>. Acesso em 20 de jul. de 2020.

ESTADO DE PERNAMUCO. Secretaria Estadual de Saúde. Norma Técnica nº 16/2020 Recife, Pernambuco. *Cievspe.com*. Disponível: <<https://www.cievspe.com/novo-coronavirus-2019-ncov>>. Acesso em 8 de jul. de 2020.

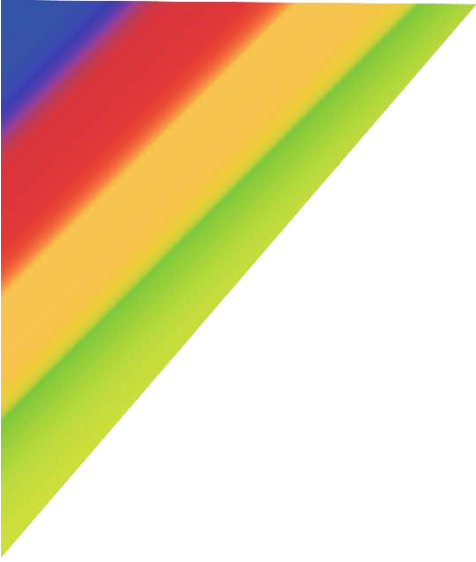
LU, Hongzhou; STRATTON, Charles W.; TANG, Yi-Wei. Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: The mystery and the miracle. *J. Med. Virol*, v. 92, n. 4, p. 401-402, 2020.

ROSER Max; RITCHIE Hannah; ORTIZ-OSPINA Esteban; HASELL Joe. Coronavirus Pandemic (COVID-19), 2020. *OurWorldInData.org*. Disponível em: <https://ourworldindata.org/coronavirus>. Acesso em: 20 de jul. de 2020.

SOHRABI, Catrin et al. World Health Organization declares global emergency: A review of the 2019 novel coronavirus (COVID-19). *Int J Surg*, 2020.

6. AGRADECIMENTOS

O NUPIT-SG agradece ao apoio financeiro da UFPE/FADE, Prefeitura da Cidade do Recife, Procuradoria Regional do Trabalho (6ª Região), Associação Municipalista de Pernambuco e ao apoio institucional da Fiocruz/IAM e do LACEN-PE.



BIOTECNOLOGIA E NANOTECNOLOGIA EM SAÚDE



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

FORMULAÇÃO NANOTECNOLÓGICA CONTENDO IMIQUIMODE: UMA NOVA ABORDAGEM TERAPÊUTICA PARA O CÂNCER CERVICAL

G. R. ONZI¹, L. A. FRANK¹, L. C. PEREIRA³, R. P. GAZZI¹, A. MORAWSKI¹, A. R.
POHLMANN^{1,2}, G. LENZ³ e S. S. GUTERRES^{1,2}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil;

² Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul;

³ Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul;

E-mail para contato: gioonzi@gmail.com

RESUMO – O câncer cervical representa o quarto tumor mais frequente na população feminina mundial. Os tratamentos convencionais apresentam limitações relacionadas ao grau de invasão dos processos cirúrgicos e à toxicidade dos fármacos. O fármaco imiquimode possui grande potencial antitumoral por atuar na ativação da resposta imunológica, e formulações nanotecnológicas de liberação controlada do mesmo podem permitir alcançar os benefícios terapêuticos ideais. **Objetivo:** Avaliar os efeitos de uma formulação nanotecnológica contendo imiquimode para o tratamento do câncer cervical. **Metodologia:** Nanopartículas contendo imiquimode (NPim) foram preparadas de acordo com metodologia específica e testadas em células de adenocarcinoma cervical humano HeLa. Seus efeitos anti-tumorais foram avaliados através de técnicas de proliferação e citotoxicidade celular, ensaios de morte celular por apoptose e ensaio de autofagia. **Resultados:** NPim mostrou atividade antitumoral significativa, reduzindo a viabilidade e a proliferação celular, e foi a única a apresentar citotoxicidade a longo prazo quando comparada aos grupos controle. O tratamento com NPim também foi capaz de aumentar significativamente os níveis de apoptose e autofagia nas células tumorais. **Conclusão:** Em conjunto, esses resultados apontaram NPim como uma formulação promissora para o tratamento do câncer cervical.

Palavras-chave: terapia do câncer; nanotecnologia; nanomedicina; imunoterapia

ABSTRACT - Cervical cancer represents the fourth most frequent tumor in the female population worldwide. Conventional treatments have limitations related to the invasive surgical processes and toxicity of the drugs. The drug imiquimod has a great antitumor potential for acting on the activation of the immune response, and nanotechnological formulations allowing its controlled release can lead to the achievement of optimal therapeutic benefits. **Objective:** To evaluate the



*effects of a nanotechnological formulation containing imiquimod for the treatment of cervical cancer. **Methodology:** Nanoparticles containing imiquimod (NPim) were prepared following a specific methodology and tested on human cervical adenocarcinoma cells HeLa. Anti-tumor effects of NPim were evaluated using techniques of cell proliferation and cytotoxicity, cell death by apoptosis and autophagy. **Results:** NPim showed significant antitumor activity, reducing cell viability and proliferation, and was the only formulation capable of achieving long-term cytotoxicity when compared to control groups. NPim treatment was also able to significantly increase levels of apoptosis and autophagy in cancer cells. **Conclusion:** Together, these results revealed NPim as a promising formulation for the treatment of cervical cancer.*

Keywords: cancer therapy; nanotechnology; nanomedicine; immunotherapy.

1. INTRODUÇÃO

O câncer cervical é causado pela infecção persistente de subtipos oncogênicos (principalmente 16 e 18) do Papilomavírus Humano – HPV, e representa o quarto tumor mais frequente na população feminina a nível mundial e também o quarto tipo tumoral com maior índice de mortalidade em mulheres (Global Cancer Observatory, 2019) (<http://gco.iarc.fr>). No Brasil, mais de 16 mil novos casos da doença foram identificados em 2018 (INCA, 2018a).

O tipo de tratamento a ser utilizado para o câncer cervical depende principalmente do grau/estágio da lesão, da idade do paciente e também de fatores pessoais do mesmo, tais como o interesse em futuras gestações (INCA, 2018a). No entanto, os tratamentos convencionais disponíveis apresentam uma série de limitações relacionadas à toxicidade e falta de seletividade dos medicamentos, e também a processos cirúrgicos invasivos, reduzindo consideravelmente a qualidade de vida dos indivíduos acometidos (Florea and Büsselberg, 2011). Por isso, diferentes agentes antitumorais têm sido investigados nos últimos anos e, dentre eles, o imiquimode, um fármaco antiviral e antitumoral, vem sendo avaliado como opção terapêutica por ser capaz de estimular a resposta imunológica contra esses tumores (Haidopoulos et al., 2005; Soong et al., 2014). Dados da literatura mostram que o imiquimode age principalmente através da ativação da resposta imune em células mononucleares, por meio de sua ligação em receptores toll-like 7 e consequente indução da liberação de citocinas pró-inflamatórias (Gupta et al., 2002). Além disso, esse fármaco tem se mostrado capaz de agir diretamente nas células tumorais, induzindo morte celular (Kohrt, 2012).

As principais barreiras para a utilização do imiquimode na clínica estão relacionadas a efeitos adversos como dor, coceira e ulceração, frequentemente levando os pacientes a abandonarem o tratamento (Gupta et al., 2002). Pesquisas recentes têm sido focadas no desenvolvimento de formas de liberação controlada de fármacos, incluindo o imiquimode, a fim de melhorar reações adversas e alcançar os benefícios terapêuticos ideais. Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa vem trabalhando no desenvolvimento de uma formulação nanotecnológica de imiquimode e também no desenvolvimento de um gel para incorporação dessa formulação que possibilite sua ótima aplicação na mucosa da região cervical. No entanto, o mecanismo de ação para o imiquimode carregado em sistemas nanoestruturados ainda não foi completamente elucidado. Diante desse cenário, no presente trabalho buscamos entender de que maneira essa nova formulação de imiquimode é capaz de agir nas células de câncer cervical, avaliando seus efeitos antitumorais *in vitro*.



2. MATERIAIS E MÉTODOS

As nanopartículas contendo imiquimode (NPim) foram preparadas conforme metodologia estabelecida em nosso laboratório, e suas caracterizações físico-químicas foram devidamente determinadas (dados não mostrados). Todas as formulações foram preparadas em condições assépticas para avaliações posteriores em cultura de células.

NPim foi testada diretamente nas células tumorais humanas HeLa na concentração de 3 μ M (do fármaco) e em intervalo de tempo de 72h. Como controle, foram utilizadas as condições sem tratamento (CTRL), formulação de nanopartículas sem imiquimode (NP) e solução de imiquimode livre não encapsulado (IM). Posteriormente, foram realizados ensaios de citotoxicidade através da técnica de ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium) (MTT) (Gazzi et al., 2020), e da avaliação de proliferação celular pelo método *cumulative population doubling (cpd)* (Silva et al., 2016a), conforme metodologias já estabelecidas e descritas nas respectivas referências. Foi também avaliado o tipo de morte celular pelo ensaio de marcação com Anexina/Iodeto de Propídeo (Silva et al., 2016b) e o status do processo de autofagia pelo ensaio de marcação com laranja de acridina (Thomé et al., 2016), ambos analisados por citometria de fluxo.

As análises estatísticas foram realizadas através do teste de Análise de Variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Tuckey para comparações múltiplas, utilizando o software Prism 7. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nossos resultados revelaram que o NPim foi capaz de reduzir em aproximadamente 50% a viabilidade celular ($p < 0,001$) e a proliferação ($p < 0,0001$) das células HeLa quando comparado ao grupo não tratado, conforme mostrado nas Figuras 1A e 1B, respectivamente. Nessas análises de 72h, a redução na viabilidade e proliferação causada por NPim foi semelhante à do imiquimode em sua forma livre (IM), porém superior ao tratamento com nanopartículas sem fármaco (NP). Isso demonstra que o efeito citotóxico observado é atribuído ao fármaco. Cabe ressaltar que a concentração de fármaco utilizada é a menor dose descrita na literatura, e mesmo assim produz uma significativa resposta. A fim de investigar os mecanismos de morte celular envolvidos nesta resposta, realizamos a marcação das células com anexina V/iodeto de propídeo, para avaliar os índices de apoptose e necrose, após 72h de tratamento. Os resultados dessa análise mostraram que NPim foi a única a aumentar significativamente os percentuais de células marcadas por anexina V (CTRL = 17,5%; NP = 23,7%; NPim = 31,5% *** $p < 0,001$; IM = 6,1%) e de dupla marcação (CTRL = 9,9%; NP = 8,7%; NPim = 29% *** $p < 0,001$; IM = 2,7%) quando comparado aos demais grupos, indicando que NPim é capaz de induzir apoptose e, possivelmente, necrose nas células tumorais.

Em resposta situações adversas, as células geralmente desencadeiam a autofagia, que as ajuda a contornar o estresse gerado por estímulos intra e extracelulares, incluindo o de agentes terapêuticos. Quando exacerbada, no entanto, a autofagia pode levar à morte celular (Galluzzi et al., 2015). Medimos indiretamente os níveis de autofagia através da quantificação intracelular de organelas vesiculares ácidas (AVOs), representativas de autolisossomos que se formam no final do processo autofágico. Embora IM tenha sido capaz de aumentar os níveis de AVOs nas células HeLa ($p < 0,001$), NPim teve o maior efeito no tempo testado (72h, $p < 0,0001$), sendo inclusive estatisticamente diferente de IM livre, conforme mostrado na Figura 1C.

Como na terapia do câncer, efeitos a longo prazo são importantes evitar a recidiva da doença

e prolongar a sobrevivência dos pacientes, decidimos analisar o efeito do tratamento com NPim em um intervalo de tempo maior. Para isso, após o tratamento nas condições indicadas por 72h, as células foram deixadas crescer em meio sem tratamento por mais 7 dias, totalizando 10 dias até a sua análise. Os níveis de proliferação das células tumorais foram então avaliados, e revelaram que, após esse período, apenas o NPim manteve atividade antitumoral significativa. Nos demais grupos de tratamento, as células retomaram a proliferação de maneira semelhante ao controle não tratado (Figura 1D).

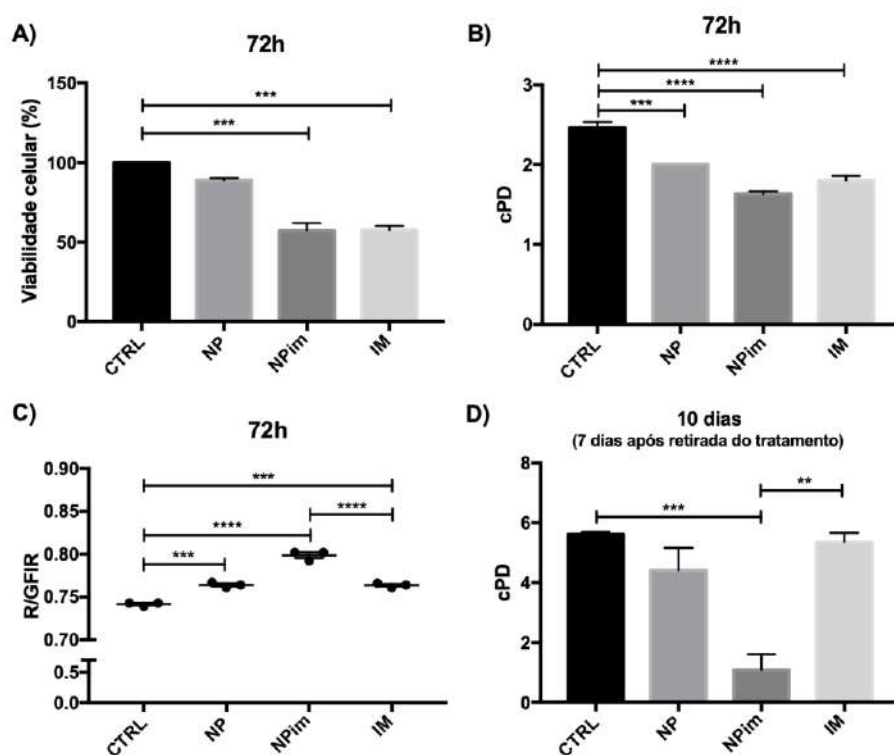


Figura 1. Avaliação dos efeitos antitumorais *in vitro* de NPim em células HeLa. **A)** Viabilidade celular e **B)** níveis de proliferação (cPD). **C)** Avaliação quantitativa de AVOS, indicativo de autofagia. R/GFIR refere-se à razão da intensidade de fluorescência vermelha por fluorescência verde, correlacionada à quantidade de organelas ácidas nas células. **D)** Avaliação de efeitos a longo prazo sobre a proliferação celular. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Resultados correspondem a média \pm SEM (n=3).

4. CONCLUSÃO

A formulação nanotecnológica contendo imiquimode (NPim) foi capaz de induzir efeitos citotóxicos em linhagens de câncer cervical humano. Essa atividade está associada a um aumento nos níveis de apoptose e autofagia nessas células, induzido pela formulação. Especialmente em tratamentos crônicos, a longo prazo, essa formulação se destaca por seus efeitos antitumorais significativamente superiores inclusive ao fármaco na sua forma livre o que demonstra a superioridade do sistema desenvolvido de base nanotecnológica. Esses resultados abrem perspectivas para o estudo da formulação *in vivo* como próxima etapa a ser realizada, e apontam NPim como uma alternativa promissora para o tratamento do câncer cervical.



5. REFERÊNCIAS

- Florea, A.-M.; and Büsselberg, D.. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers* 3, 1351–1371, 2011.
- Galluzzi, L.; Pietrocola, F.; Bravo-San Pedro, J.M.; Amaravadi, R.K.; Baehrecke, E.H.; Cecconi, F.; Codogno, P.; Debnath, J.; Gewirtz, D.A.; Karantza, V.; Kimmelman, A.; Kumar, S.; Levine, B.; Maiuri, M.C.; Martin, S.J.; Penninger, J.; Piacentini, M.; Rubinsztein, D.C.; Simon, H.; Simonsen, A.; Thorburn, A.M.; Velasco, G.; Ryan, K.M.; and Kroemer, G.. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J* 34:856–880, 2015.
- Gazzi, R.P.; Frank, L.A.; Onzi, G.; Pohlmann, A.R.; and Guterres, S.S.. New pectin-based hydrogel containing imiquimod-loaded polymeric nanocapsules for melanoma treatment. *Drug Deliv. Transl. Res.*, 2020.
- Gupta, A.K.; Browne, M.; and Bluhm, R.. Imiquimod: A Review. *J. Cutan. Med. Surg.* 6, 554–560, 2002.
- Haidopoulos, D.; Diakomanolis, E.; Rodolakis, A.; Voulgaris, Z.; Vlachos, G.; and Intsaklis, A.. Can local application of imiquimod cream be an alternative mode of therapy for patients with high-grade intraepithelial lesions of the vagina? *Int. J. Gynecol. Cancer.* 15, 898–902, 2005.
- INCA. <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>, 2018a.
- INCA. <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>, 2018b.
- Kohrt, H.. Breast cancer treatment with imiquimod: applying an old lotion to a new disease. *Clin. Cancer Res.* 18, 6571–6573, 2012.
- Silva, A.O.; Felipe, K.B.; Villodre, E.S.; Lopez, P.L.; and Lenz, G.. A guide for the analysis of long-term population growth in cancer. *Tumour Biol.* 37, 13743–13749, 2016a.
- Silva, A.O., Dalsin, E., Onzi, G.R., Filippi-Chiela, E.C., and Lenz, G.. The regrowth kinetic of the surviving population is independent of acute and chronic responses to temozolomide in glioblastoma cell lines. *Exp. Cell Res.* 348, 177–183, 2016b.
- Soong, R.-S.; Song, L.; Trieu, J.; Knoff, J.; He, L.; Tsai, Y.-C.; Huh, W.; Chang, Y.-N.; Cheng, W.-F.; Roden, R.B.S.; Wu, T.C.; Trimble, C. L.; and Hung, C.. Toll-like receptor agonist imiquimod facilitates antigen-specific CD8+ T-cell accumulation in the genital tract leading to tumor control through IFN γ . *Clin. Cancer Res.* 20, 5456–5467, 2014.
- Thomé, M.P.; Filippi-Chiela, E.C.; Villodre, E.S.; Migliavaca, C.B.; Onzi, G.R.; Felipe, K.B.; and Lenz, G.. Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. *J. Cell Sci.* 129, 4622–4632, 2016.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos às agências de fomento CAPES, FAPERGS e CNPq que possibilitaram a realização do trabalho.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

NANOSENSOR ELETROQUÍMICO A BASE DE ÁCIDO TIOFENO ACÉTICO E INDOLICIDINA PARA A IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS

J. M. OLIVEIRA¹; I. A. M. FRÍAS²; O. L. FRANCO³,
M. D. L. OLIVEIRA²; C. A. S. ANDRADE²

¹ Estudante do Curso de Biomedicina, Centro de Ciências Biológicas, UFPE;

² Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT – UFPE);

³ Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas de Brasília, Universidade Católica de Brasília, Brasília;

E-mail: jessicamariaal@hotmail.com

RESUMO – Atualmente, é essencial o desenvolvimento de dispositivos diagnósticos que reduzam as incertezas clínicas e acelerem a identificação de infecções bacterianas secundárias, de forma a contribuir para um controle efetivo no uso de antibióticos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um biossensor eletroquímico a base de nanopartículas de dióxido de titânio, ácido tiofeno acético (polímero conjugado) e indolicidina (peptídeo antimicrobiano) para identificação de bactérias de interesse clínico. Para a construção e caracterização da plataforma biossensora foram utilizadas as técnicas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica. Os resultados obtidos demonstraram a manutenção da atividade biológica do peptídeo antimicrobiano e interação com a amostra bacteriana, permitindo concluir que o sistema sensor proposto foi efetivo na identificação bacteriana.

Palavras-chave: Bactérias; Biossensor, Eletroquímica, Indolicidina, Ácido tiofeno acético.

ABSTRACT - Currently, it is essential to develop diagnostic devices that reduce clinical indecision and accelerate the identification of secondary bacterial infections to contribute to effective control in the use of antibiotics. Therefore, the objective of this work was to develop an electrochemical nanosensor based on titanium dioxide nanoparticles, thiophene acetic acid (conjugated polymer) and indolicidin (antimicrobial peptide) to identify bacteria of clinical interest. For the construction and characterization of the biological platform, the techniques of cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy were used. The results obtained demonstrated the maintenance of the biological activity of the antimicrobial peptide and the interaction with a bacterial sample, allowing to conclude that the developed system was effective in bacterial identification.



Keywords: Bacteria; Biosensor, Electrochemistry, Indolicidin, Thiophene acetic acid.

1. INTRODUÇÃO

O uso da antibioticoterapia de maneira profilática sem indícios de infecção bacteriana subjacente têm sido motivo de alerta para um provável aumento nos casos de resistência microbiana (HSU, 2020). Outro fator que pode contribuir para o aumento de espécies resistentes é o uso precoce de antibióticos em fases iniciais da doença, onde a diferenciação entre a coinfeção bacteriana e alterações inflamatórias torna-se difícil devido à ausência métodos diagnósticos mais rápidos e precisos (MOURA; SUDIN, 2020). Os métodos comumente utilizados na identificação bacteriana como culturas, contagem de colônias ou técnicas de PCR, além de serem laboriosos e demandarem muito tempo para identificação do patógeno (no caso dos primeiros), podem necessitar de pré-tratamento rigoroso da amostra onde qualquer contaminação pode ocasionar resultados falso-positivos (no caso da técnica de PCR) (SIMOSKA, 2019). Os Biossensores eletroquímicos que apresentam detecção rápida e elevado grau de sensibilidade e potencial para miniaturização se tornam uma alternativa promissora para a identificação bacteriana (VIGNESHVAR, 2016). Desta forma, este trabalho propõe o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico baseado em ácido tiofeno acético (polímero conjugado), nanopartículas funcionalizadas de dióxido de titânio e indolicidina (peptídeo antimicrobiano) para identificação de bactérias multirresistentes.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

As análises de voltametria cíclica e de espectroscopia de impedância eletroquímica foram realizadas em uma célula eletroquímica convencional utilizando três eletrodos, sendo um contra eletrodo de platina, um eletrodo de referência Ag/AgCl e um eletrodo de trabalho de disco de ouro, todos imersos em uma solução de ferro-ferri de 20 mL (1:1) que atua como sonda redox. O eletrodo de trabalho foi modificado através da polimerização do ácido tiofeno acético, onde o monômero ácido 3-tiofeno acético [1M] foi pesado 0,072g e diluído em 20 mL de ácido clorídrico [0.5 M]. Posteriormente, a solução foi colocada no sonificador para a homogeneização do 3-TAA no ácido. Em sequência, foi realizada a polimerização do monômero de 3-TAA sobre o eletrodo de ouro através da técnica de voltametria cíclica. Após formado sobre a superfície de ouro, o PTAA apresenta grupos funcionais carboxílicos, os quais podem ser ativados quimicamente para promover sua interação com os grupos aminos livres presentes na molécula funcionalizada de dióxido de titânio (nanopartícula). Os grupos funcionais foram ativados incubando o eletrodo com PTAA com 5 μ L da solução de EDC:NHS (1:1, v/v). Após a ativação do polímero, foram aplicados 3 μ L de dióxido de titânio (TiO₂) previamente funcionalizado com 3-aminopropil trietoxissilano sobre a plataforma modificada, deixando o tempo de incubação de 10 min para permitir a interação das biomoléculas. Na etapa seguinte, foram aplicados 2 μ L [100 μ M] de Indolicidina previamente ativada com 2 μ L EDC:NHS (1:1, v/v) sobre a plataforma modificada PTAA/ TiO₂ e incubada por 10min. Ao final dos processos de montagem, a composição do biossensor ficou da seguinte forma: PTAA/ TiO₂ / indolicidina. Após a montagem do sensor avaliamos seu desempenho frente as

amostras bacterianas.

A partir da **Fig. 1a** podemos observar os ciclos voltamétricos que representam a formação

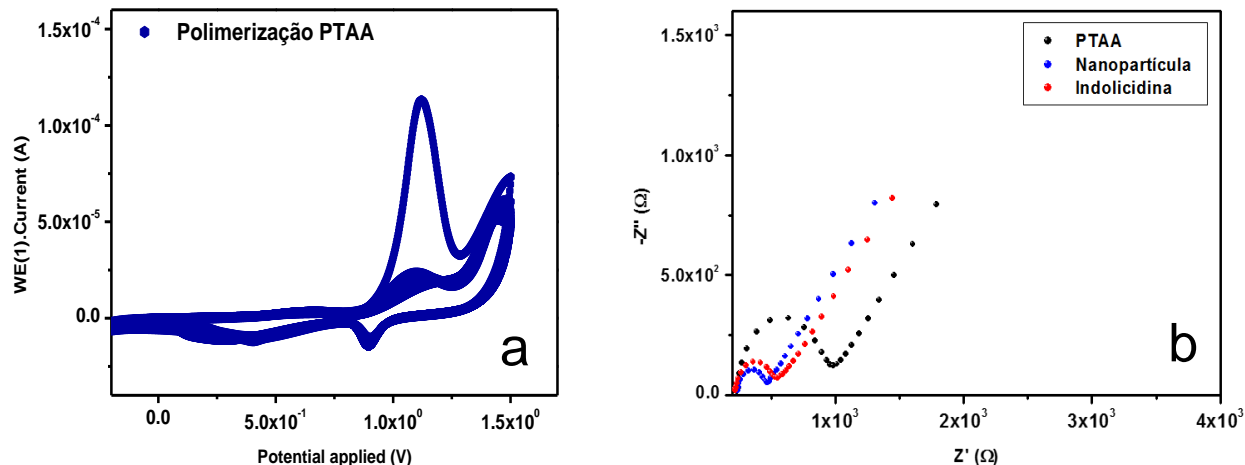


Figura 1. Voltamograma cíclico demonstrando a polimerização do 3-TAA (A) e Diagrama de Nyquist referente a construção do biossensor (B).

do ácido politiofeno acético (PTAA) em meio aquoso, observa-se acentuada variação do fluxo de corrente elétrica durante a formação do filme polimérico. As correntes iniciais acima de 1.0V proporcionam a oxidação do monômero. Os picos seguintes (em torno de 0.4 e 1.3 V) correspondem aos processos de oxidação/redução do polímero.

A **Fig. 1b** apresenta os diagramas de Nyquist das diferentes camadas constituintes da plataforma biossensora. De acordo com o semicírculo de Cole-Cole em preto, temos a caracterização do filme de PTAA após o processo de polimerização. O processo da interação PTAA/ TiO₂ é demonstrado na curva em azul (Fig. 1b). O resultado da interação TiO₂/ indolicidina dá origem à última camada do biossensor, sendo demonstrado na curva impedimétrica em vermelho. Finalmente, a plataforma biossensora foi testada com amostras de bactérias patogênicas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A indolicidina é um peptídeo curto e hidrofóbico, constituído por 13 resíduos de aminoácidos que apresentam a seguinte sequência: ILPWKWPWWPWR-NH₂. Além disso, é um peptídeo catiônico que apresenta afinidade pelas regiões aniônicas presentes na membrana bacteriana. O resultado da interação indolicidina/membrana bacteriana produz uma resposta elétrica mensurável.

Foram testadas diluições seriadas de diferentes amostras bacterianas contra a plataforma biossensora, afim de avaliar a manutenção da bioatividade da indolicidina e a sensibilidade do sistema para as espécies bacterianas testadas. Antes da realização da análise por EIE, os eletrodos contendo a plataforma biossensora foram incubados por 10 min para cada concentração testada.

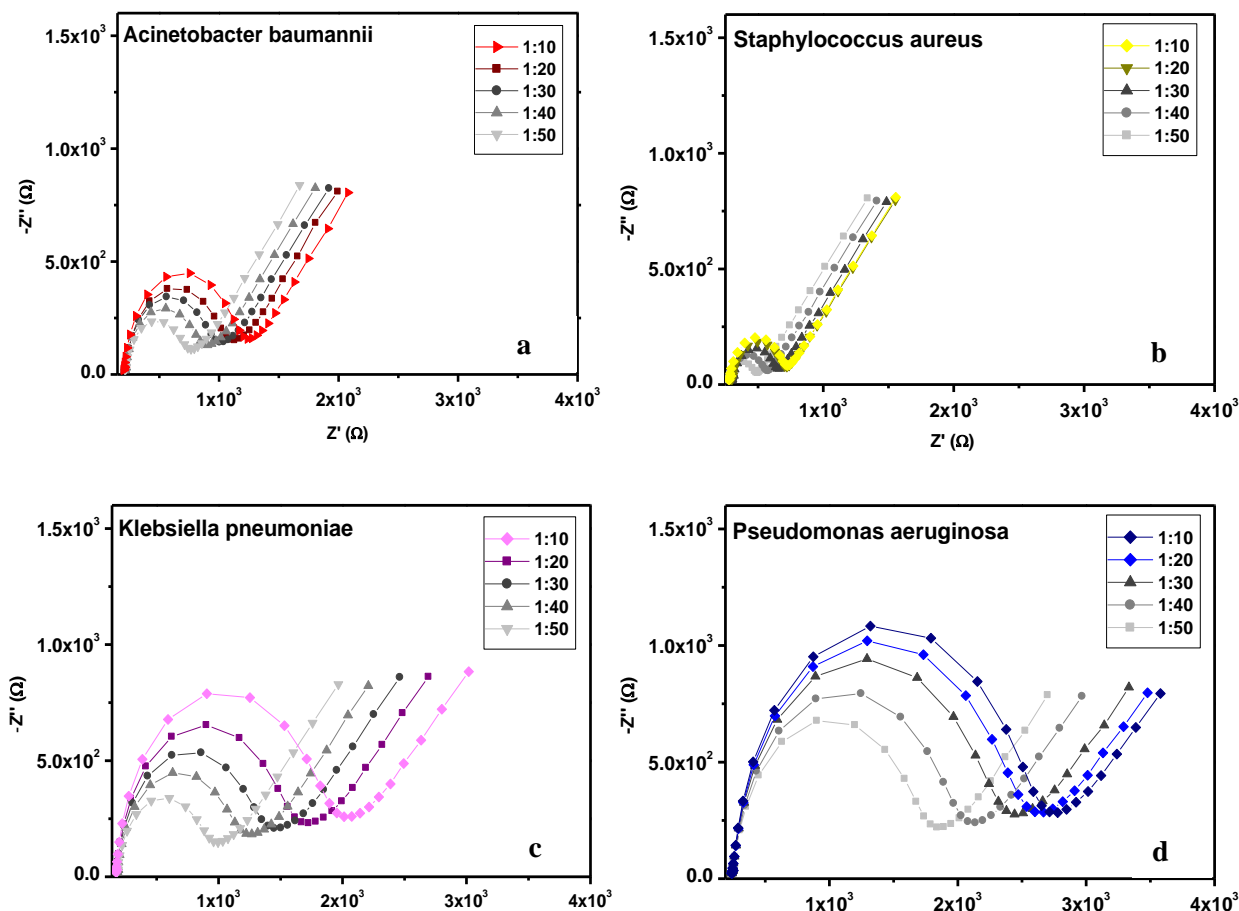


Figura 2. Diagrama de Nyquist da resposta do sensor frente a diferentes espécies bacterianas.

Na **Fig. 2a** apresentamos o diagrama de Nyquist correspondente à diluição seriada da amostra de *A. baumannii* sobre o biossensor. É possível notar um incremento no R_{ct} proporcional à concentração de bactérias, indicando que a plataforma biossensora está interagindo com a amostra bacteriana. Na **Fig. 2b** é apresentada a resposta do sensor frente a diferentes concentrações da bactéria *S. aureus*. É possível notar que a impedância aumenta à medida que se eleva a concentração de bactérias na superfície. A resposta da indolicidina frente a diferentes concentrações da bactéria *K. pneumoniae* pode ser visualizada na **Fig. 2c**. A resposta impedimétrica foi proporcional a concentração de *P. aeruginosa* **Fig. 2d**.

Com exceção da espécie *Staphylococcus aureus*, todas as bactérias testadas são Gram negativas. Os peptídeos antimicrobianos atuam junto as bactérias através de um mecanismo de dois passos associado às interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Por apresentar características hidrofóbicas possui grande afinidade pelas membranas bacterianas ricas em estruturas lipídicas, como é o caso das bactérias Gram negativas de modo geral. Percebe-se que todas as espécies Gram negativas apresentaram resposta impedimétrica de maior amplitude e apenas a amostra de *S. aureus* apresentou uma resposta elétrica significativamente reduzida.

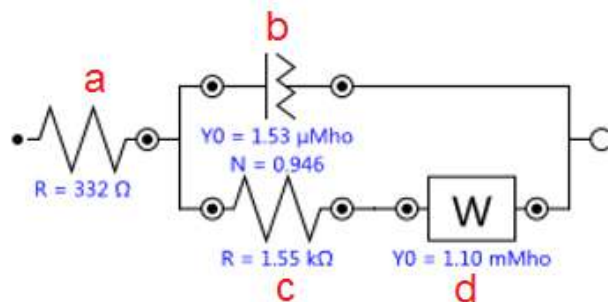


Figura 3. circuito equivalente Randles.

Na **figura 3**, temos o circuito equivalente Randles utilizado para a análise do sensor, os elementos inseridos no circuito representam o processo eletroquímico ocorrido durante a montagem do sensor e durante o teste com as amostras bacterianas. No ponto **(a)** a resistência não compensada, que é a resistência existente entre os eletrodos de trabalho e referência. O ponto **(b)** representa a capacitância associada com a dupla camada elétrica, a dupla camada é uma região de acúmulo de carga decorrente da interface entre a superfície eletricamente carregada do sensor e a solução eletrolítica na qual está inserido. No ponto **(c)** temos a resistência a transferência de carga que sofre variação de acordo com a concentração iônica dos produtos presentes na superfície do eletrodo de trabalho. O ponto **(d)** a impedância de Warburg, se refere a difusão de cargas na solução de ferro-ferri na qual os eletrodos estão imersos.

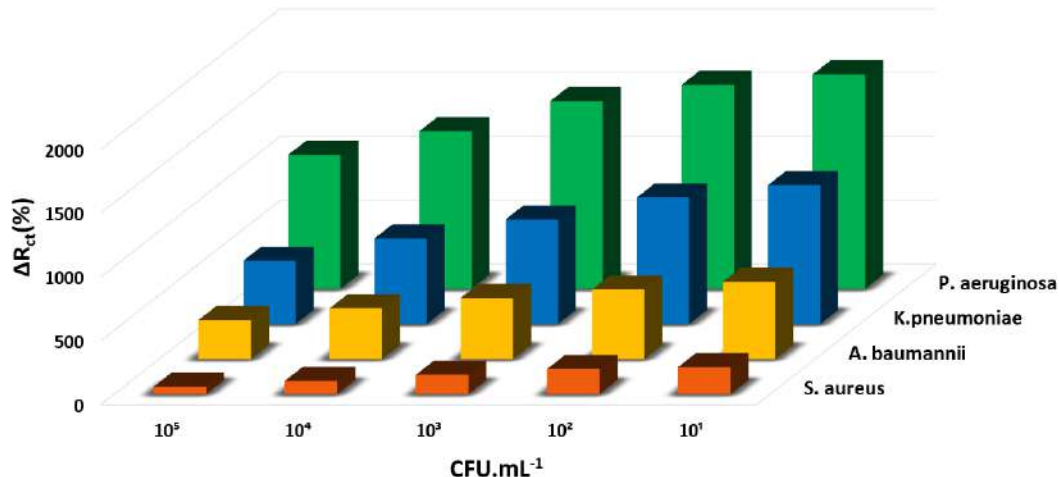
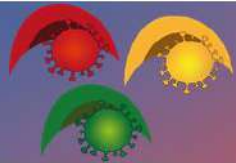


Figura 4. ΔR_{ct} (%) do biossensor após testagem frente a bactérias em diferentes concentrações.

Os resultados apresentados na **Fig 4** demonstram que ocorreu interação entre a indolicidina e as espécies bacterianas testadas, como revelado pelo aumento do Rct. É possível observar uma relação linear à medida que ocorre variação do Rct.



4. CONCLUSÃO

A associação do polímero conjugado (PTAA) com a nanopartícula funcionalizada de TiO_2 apresentou bom desempenho para imobilização da indolicidina (peptídeo antimicrobiano) como molécula de reconhecimento biológico, mantendo sua capacidade de interação com a membrana bacteriana intacta. O circuito equivalente de Randles possibilitou a compreensão dos fenômenos elétricos ocorridos na célula eletroquímica durante todo o processo de montagem e teste do biossensor. A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica foi útil para a observação e caracterização de todo sistema sensor e das bactérias testadas. Finalmente, foi possível concluir que o sistema sensor proposto obteve sucesso na identificação bacteriana, pois o mesmo apresentou boa interação e sensibilidade para todas as espécies de bactérias estudadas.

5. REFERÊNCIAS

HSU, Jeremy. How covid-19 is accelerating the threat of antimicrobial resistance. *BMJ*, v. 369, (2020).

MIRANDA, Juliana Lima de. Sensor impedimétrico baseado em nanopartículas de ouro modificadas com Clavanina A em camadas automontadas de cisteína para detecção de bactérias. (2016). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

MOURA, Maria Luiza. Comentário: Resistência bacteriana em tempos de COVID-19. *Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, (2020). Disponível em: <<https://cbccsp.org.br/comentario-resistencia-bacteriana-em-tempos-de-covid-19/>>. Acesso em: 08/07/2020

SIMOSKA, Olja; STEVENSON, Keith J. Sensores eletroquímicos para diagnóstico rápido de patógenos em tempo real. *Analista*, v. 144, n. 22, p. 6461-6478, (2019).

SUDIN, Anna. Considerations for AMR in the Covid-19 pandemic. *Jpiamr*, (2020). Disponível em: <<https://www.jpiamr.eu/considerations-for-antibiotic-resistance-in-the-covid-19-pandemic/>> Acesso em: 08/07/2020

VIGNESHVAR, S. et al. Recent advances in biosensor technology for potential applications—an overview. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, v. 4, p. 11, (2016).

6. AGRADECIMENTOS

Oliveira, J.M. agradece a PROPESQ/UFPE pela bolsa concedida. Andrade, C.A.S e Oliveira, M.D.L. agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO BASEADO EM NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO E PARTÍCULAS VIRAIS PARA O DIAGNÓSTICO DO ZIKA

E.P. SIMÃO¹, M.T. CORDEIRO², L.H.V.G. GIL², C.A.S ANDRADE³, M.D.L. OLIVIERA^{1,3}

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

² Departamento de Virologia e Terapia Experimental - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife.

³ Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

E-mail para contato: estefani_p_s@hotmail.com

RESUMO – *O estudo apresenta uma metodologia para captura de anticorpos anti-zika, por meio de um biossensor eletroquímico composto por nanopartículas de óxido de zinco e vírus zika. O trabalho tem como objetivo identificar o contato do organismo humano com o ZIKV. A plataforma nanoestruturada desenvolvida foi baseada em uma monocamada automontada de cisteína, que serviu de suporte para as NpZnOx modificadas quimicamente, onde foram imobilizados posteriormente o vírus Zika. A técnica eletroquímica de impedância eletroquímica foi utilizada durante todas as etapas de desenvolvimento do sensor, para caracterizar eletroquimicamente todos os processos de imobilização química e biológica dos materiais utilizados. Os resultados obtidos demonstraram que o sensor foi capaz de detectar anticorpos do tipo monoclonais e policlonais apresentando uma resistência a transferência de carga de 14,4 kΩ e 11,8 kΩ, respectivamente. Portanto, o sistema sensor proposto foi capaz de detectar anticorpos anti-ZIKV em paciente sensibilizados pelo ZIKV, sendo um sistema útil para identificar pacientes infectados pelo arbovírus.*

Palavras-chaves: Zika, Biossensor, Eletroquímica.

ABSTRACT- *The study presents a methodology for capturing anti-Zika antibodies, using an electrochemical biosensor composed of nanoparticles of zinc oxide and zika virus. This work aims to identify the contact of the human organism with ZIKV. The nanostructured platform developed was based on a self-assembled cysteine monolayer, which served as support for chemically modified NpZnOx, where the Zika virus was subsequently immobilized. The electrochemical impedance electrochemical technique was used during all stages of sensor development, to electrochemically characterize all the processes of chemical and biological immobilization of the materials used. The results obtained demonstrated that the sensor was able to detect monoclonal*



and polyclonal antibodies presenting a load transfer resistance of 14.4 k Ω . and 11. k Ω , respectively. The proposed sensor system was able to detect anti-ZIKV antibodies in patients sensitized by ZIKV, being a useful system to identify patients infected with arbovirus.

Keywords: Zika, Biosensor, Electrochemistry.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a população mundial vem enfrentando o combate ao arbovírus zika (ZIKV), devido as graves complicações que esse vírus é capaz de causar a saúde humana (FARIA et al., 2016). No Brasil, desde o início do ano de 2015, relatos epidemiológicos demonstraram que a infecção pelo ZIKV provocaram diversas complicações neurológicas em recém-nascidos de mães contaminadas durante a gestação, como a microcefalia conhecida como “Síndrome Congênita do Zika”(DURCE; GOMES, 2016; ZANLUCA et al., 2015).

As arboviroses são bastante frequentes após os períodos de chuva, que aliada a falta de saneamento básico, acaba por favorecer a multiplicação do mosquito *Aedes aegypti* que é o vetor transmissor do ZIKV. O vírus zika pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*, e possuem o genoma constituído basicamente por RNA de cadeia simples de sentido positivo (RNA+) e proteínas estruturais semelhantes (BASARAB et al., 2016; IOOS et al., 2014).

O diagnóstico clínico para distinguir as arboviroses é limitado devido a semelhança na sintomatologia das infecções. As técnicas utilizadas para auxiliar o diagnóstico, como os testes imunológicos rápidos (MAC-ELISA) são inespecíficos para infecção aguda, e os testes específicos (RT-PCR) são de alto custo (NICOLINI; MCCRACKEN; YOON, 2017; PARDEE et al., 2016). Diante da necessidade de um instrumento específico e eficiente na identificação infecções por ZIKV, a utilização do biossensor apresenta uma alternativa para auxiliar no diagnóstico das arboviroses.

Os biossensores eletroquímicos são dispositivos capazes de detectar rapidamente espécies químicas e/ou biológicas, tendo como objetivo a produção de um sinal eletrônico proporcional em magnitude e/ou frequência à concentração do analito, os quais interagem com o elemento biossensível (MONOŠÍK; STREĎANSKÝ; ŠTURDÍK, 2012; RONKAINEN; HALSALL; HEINEMAN, 2010).

As técnicas de voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) são técnicas muito úteis no desenvolvimento de biossensores na obtenção de informações referentes à interação entre camadas sensora e o vírus de interesse (SIMÃO et al., 2020). A VC é uma técnica que fornece informação da interface do eletrodo biologicamente modificado, essa técnica é usada para avaliar a magnitude relativa da corrente gerada por transferência de elétrons durante o processo redox com a quantidade do analito presente na interface eletrodo-solução (RANDVIIR et al., 2013). A EIE baseia-se na aplicação de um pequeno potencial AC em função do tempo para medir a corrente gerada, onde através do acompanhamento da impedância total dos sistemas pode-se avaliar a construção de uma variedade de biossensores (EISSA; SIAJ; ZOUROB, 2015).

Os nanomateriais como as nanopartículas de óxido de zinco, são bastante utilizadas no desenvolvimento de biossensores pela capacidade de amplificação da resposta elétrica de um sistema eletroquímico, otimizando a resposta dos biossensores frente ao analito alvo, oferecendo uma maior sensibilidade ao biossensor (KUMAR; CHEN, 2008; LIU et al., 2008). Desta forma, o objetivo deste estudo é desenvolvimento de biossensores eletroquímicos baseados em nanopartículas de óxido de zinco (NpZnOx) e para detecção de anticorpos anti-ZIKA



2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais utilizados

Cisteína (cys), nanopartículas de óxido de zinco (NpZnOx), 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) e N-hydroxysuccinimide (NHS) foram adquiridos da Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). O ZIKV foi obtido por meio da colaboração com o Aggeu Magalhães.

2.2 Desenvolvimento do Biossensor

Inicialmente o eletrodo de ouro foi polido em alumina, em seguida o aminoácido cisteína foi adicionado sobre a superfície do eletrodo de ouro. Posteriormente, foram adicionadas as NpZnOx, que foram ligadas quimicamente à cys por meio do agente acoplador EDC:NHS. Subsequentemente a o ZIKV foi adicionada ao sistema (Cys-EDC:NHS-NpZnOx) para se interagir eletrostaticamente com a plataforma nanoestruturada desenvolvida.

2.3 Detecção de anticorpos anti-ZIKV

O biossensor desenvolvido foi submetido a anticorpos purificados monoclonais e policlonais para o ZIKV. As amostras de anticorpos foram diluídas (1:500-1:100) em tampão fosfato de sódio (TFS) em pH 7,4. O volume utilizado para o ensaio de biointeração sobre a superfície do sensor foi 2 μ L, onde posteriormente foi incubado a temperatura ambiente por 10 minutos para favorecer a interação entre o vírus imobilizado e os anticorpos das amostras.

2.4 Medidas eletroquímicas

As medidas eletroquímicas foram realizadas no PGSTAT 128N potentiostato/galvanostatato (Autolab, The Netherlands) com três eletrodos e uma célula eletroquímica convencional. Todos os experimentos foram realizados na presença de 10mM de uma solução eletrolítica de ferro-ferricianeto de potássio. A VC foi realizada em um potencial entre -0,2 e +0,7V em uma velocidade de varredura de 50mVs⁻¹.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 demonstra o esquema de desenvolvimento do nanobiodispositivo para detecção de anti-ZIKV. O sistema sensor é formado por uma SAM de cisteína, que com adição do EDC:NHS, serve de suporte para ancorar as NpZnOx aminadas. O ZIKV é imobilizado a plataforma nanoestruturada desenvolvida e desta forma é capaz de interagir com anticorpos monoclonais e IgG anti-ZIKV. As etapas de construção do biossensor são avaliadas pela técnica de VC e EIE, como apresentado na figura 1.

Observa-se uma alteração nas correntes de picos anódicas (ipa) e catódicas (ipc) do voltamograma cíclico (VC), assim como no diâmetro do semi-círculo do Diagrama de Nyquist (EIE), após adição de cada molécula a superfície de eletrodo. Essas modificações eletroquímicas são correspondentes às características elétricas de cada molécula adicionada a superfície de ouro,

que quando submetida a uma corrente em uma solução eletrolítica, fornece informações sobre as propriedades interfaciais do sistema desenvolvido (RANDVIIR et al., 2013).

Na figura 1a é demonstrado um decaimento das correntes de pico após a formação da SAM de cisteína, refletindo em um pequeno bloqueio na condutividade elétrica (OLIVEIRA et al., 2011; SIMÃO et al., 2016). Em seguida, com a adição das NpZnOx, ocorre um aumento na área do voltamograma, devido a grande condutividade característica do nanomaterial funcionalizado (HWA; SUBRAMANI, 2014; KUMAR; CHEN, 2008). Por fim, com adição do ZIKV observa-se uma diminuição das correntes de picos demonstrando a imobilização das partículas virais na plataforma nanoestruturada. Em adição, a figura 1b complementa os resultados obtidos na VC onde é observado um comportamento eletroquímico semelhante.

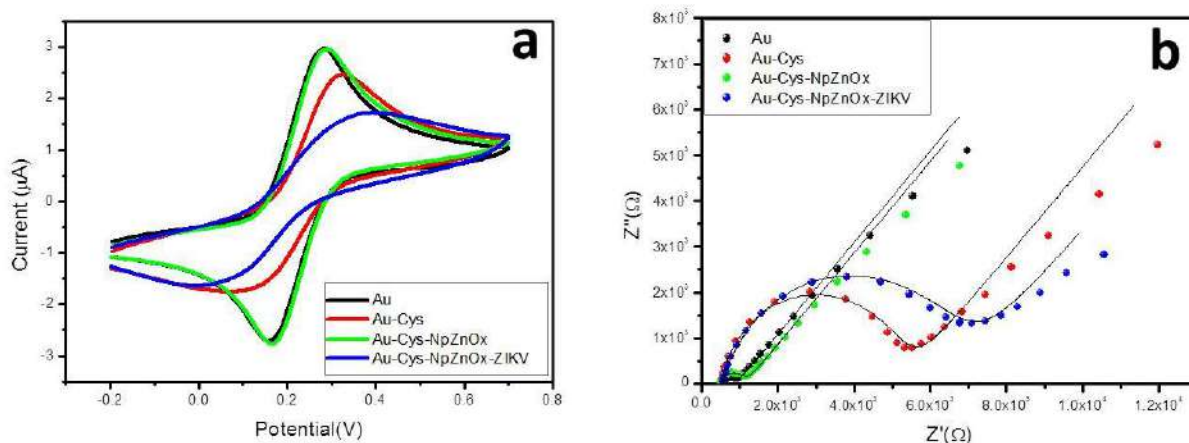


Figura 1- Voltamograma cíclico (a) e Diagrama de Nyquist(b) do desenvolvimento do sistema biossensível para detecção de anticorpos anti-ZIKV.

A figura 2 demonstra que o biossensor foi sensível aos anticorpos monoclonais (fig.2a) e IgG anti-ZIKV (fig.2b) em diversas concentrações, comprovando a eficiência do biossensor para a identificação de anticorpos reacionais à infecção pelo ZIKV. As figuras 2a e 2b demonstram um aumento expressivo do diâmetro do semi-círculo no Diagrama de Nyquist, com o aumento da concentração dos anticorpos anti-ZIKV, demonstrando a eficiência do sistema desenvolvido.

Diante do desempenho apresentado, o nanobiodispositivo eletroquímico baseado em nanopartículas de óxido de zinco e vírus zika para detecção de anticorpos reacionais para zika, é um biossensor inovador para o auxílio diagnóstico da Zika.

As magnitudes dos elementos do circuito equivalente de Randles foram extraídas após ajuste. Os valores obtidos de Rct (resistência a transferência de carga), demonstram a diferença entre as amplitudes de detecção de anticorpos monoclonais e policlonais. Obtivemos um Rct de 14,4 kΩ na diluição de 1:100 para anticorpos monoclonais e de 11,8 kΩ na detecção de anticorpos policlonais na mesma diluição, confirmando a maior afinidade dos anticorpos monoclonais às partículas de ZIKV imobilizadas na plataforma.

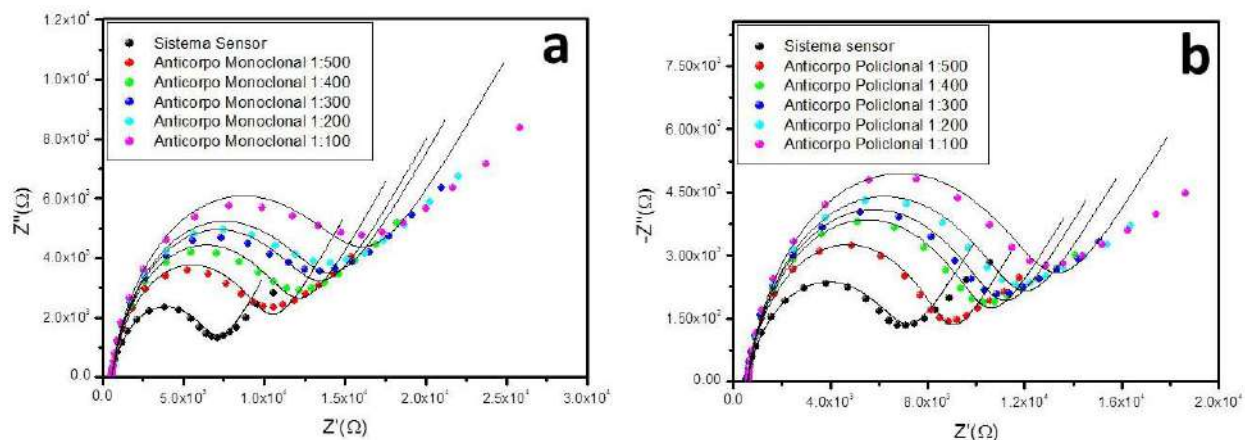


Figura 2- Diagrama de Nyquist da detecção de anticorpos monoclonais (a) e policlonais (b) nas diluições de 1:500-1:100.

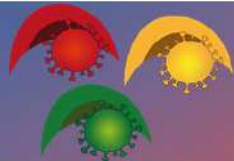
4. CONCLUSÃO

O biossensor desenvolvido baseado em nanopartículas de óxido de zinco para imobilização vírus zika, foi capaz de detectar anticorpos anti-zika em diluições que variaram de 1:500 a 1:100. Os resultados obtidos em todas as análises por meio das técnicas de voltametria e impedância eletroquímica, foram fundamentais para avaliar cada etapa do desenvolvimento do biossensor, assim como o processo de biorreconhecimento entre vírus imobilizado e anticorpos.

A nova metodologia para detecção de anticorpos anti-zika apresentado pode ser utilizada como alternativa para avaliação de pacientes infectados pelo vírus zika.

5. REFERÊNCIAS

- BASARAB, M. et al. Vírus da Zika. **The BMJ**, v. 352, p. 1–6, 2016.
- DURCE, M.; GOMES, C. Síndrome da infecção congênita pelo vírus Zika. **Cad. Saúde Pública**, v. 32, n. 7, p. 1–3, 2016.
- EISSA, S.; SIAJ, M.; ZOUROB, M. Aptamer-based competitive electrochemical biosensor for brevetoxin-2. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 69, p. 148–154, 2015.
- FARIA, N. R. et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science**, v. 352, n. 6283, 2016.
- HWA, K.; SUBRAMANI, B. Biosensors and Bioelectronics Synthesis of zinc oxide nanoparticles on graphene – carbon nanotube hybrid for glucose biosensor applications. **Biosensors and Bioelectronic**, v. 62, p. 127–133, 2014.
- IOOS, S. et al. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 44, n. 7, p. 302–307, 2014.
- KUMAR, S. A.; CHEN, S. Nanostructured Zinc Oxide Particles in Chemically Modified Electrodes for Biosensor Applications. **Analytical Letters**, v. 41, n. 2, p. 141–158, fev. 2008.



- LIU, G. et al. Nanoparticle-based biosensors and bioassays. **Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications**, p. 441–457, 2008.
- MONOŠÍK, R.; STREĎANSKÝ, M.; ŠTURDÍK, E. Biosensors - classification, characterization and new trends. **Acta Chimica Slovaca**, v. 5, n. 1, p. 109–120, 2012.
- NICOLINI, A. M.; MCCRACKEN, K. E.; YOON, J. Future developments in biosensors for field-ready Zika virus diagnostics. **Journal of Biological Engineering**, v. 11, n. 7, p. 1–9, 2017.
- OLIVEIRA, M. D. L. et al. Impedimetric biosensor based on self-assembled hybrid cystein-gold nanoparticles and CramoLL lectin for bacterial lipopolysaccharide recognition. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 362, n. 1, p. 194–201, 2011.
- PARDEE, K. et al. Rapid , Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular Components Resource Rapid , Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular Components. **Cell**, v. 165, n. 5, p. 1255–1266, 2016.
- RANDVIIR, E. P. et al. Electrochemical impedance spectroscopy versus cyclic voltammetry for the electroanalytical sensing of capsaicin utilising screen printed carbon nanotube electrodes. **The Analyst**, v. 138, n. 10, p. 2970–81, 2013.
- RONKAINEN, N. J.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W. R. Electrochemical biosensors. **Chemical Society reviews**, v. 39, n. 5, p. 1747–1763, 2010.
- SIMÃO, E. P. et al. Biosensor based on cysteine monolayer and monoclonal antibody for specific detection of aflatoxin b1 in rice. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 6, p. 1040–1047, 2016.
- SIMÃO, E. P. et al. Nanostructured impedimetric lectin-based biosensor for arboviruses detection. **Talanta**, v. 208, n. June 2019, p. 120338, 2020.
- ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 569–572, 2015.

6. AGRADECIMENTOS

Agradeço as agências de fomento FACEPE, CNPq.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

POTENCIAL DE ENZIMAS FIBRINOLÍTICAS DOS RESÍDUOS DA PESCA E AQUICULTURA: UMA BREVE REVISÃO

J.C. SILVA¹, L.H.S. LINO¹, T.P. NASCIMENTO¹, V.M. OLIVEIRA¹ e A.L.F. PORTO¹

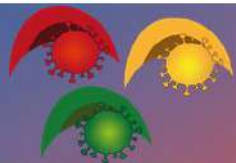
¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, DMFA, Laboratório de Tecnologia de Bioativos, LABTECBIO.

E-mail para contato: vagne_melo@hotmail.com

RESUMO – *O potencial fibrinolítico dos resíduos da exploração da pesca e aquicultura ainda é pouco conhecido. O custo dos produtos atuais e a necessidade de agentes fibrinolíticos potentes para tratamento da trombose decorrente da COVID-19 podem impulsionar novas investigações e despertar o interesse do segmento biotecnológico por essa fonte alternativa de matéria-prima fibrinolítica. Ensaio in vitro e in vivo para validar a capacidade de ação das biomoléculas recuperadas também se faz necessário. Assim, este trabalho objetivou realizar uma revisão sobre o potencial dos resíduos da pesca e aquicultura como matéria-prima de enzimas fibrinolíticas para potencial uso no tratamento da COVID-19, a partir da prática sustentável de exploração dos recursos pesqueiros. Para tanto, foram utilizados os seguintes sites científicos: ScienceDirect, Elsevier, Springer, Tandfonline, PubMed, Wiley Online Library e o Google Scholar. Para a busca de patentes foi utilizado a base da Lens.org e do INPI. São poucos os relatos da ação fibrinolítica de proteases recuperadas dos resíduos provenientes do processamento pesqueiro, o que pode ser uma nova área de investigações, visando manter a sustentabilidade no fornecimento dessa matéria-prima e propor ao mercado de enzimas fibrinolíticas uma nova fonte.*

Palavras-chave: protease, terapêutica, inovação, trombose.

ABSTRACT– *The fibrinolytic potential of residues from fisheries and aquaculture is still poorly understood. The cost of current products and the need for powerful fibrinolytic agents for the treatment of thrombosis resulting from COVID-19 may spur further research and arouse the interest of the biotechnological segment for this alternative source of fibrinolytic raw material. In vitro and in vivo tests to validate the action capacity of the recovered biomolecules is also necessary. Thus, this work aimed to carry out a review on the potential of fishery and aquaculture residues as a raw material for fibrinolytic enzymes for potential use in the treatment of COVID-19, based on the sustainable practice of exploiting fishery resources. For this, the following scientific sites were used: ScienceDirect, Elsevier, Springer, Tandfonline, PubMed, Wiley Online Library and Google Scholar. For the search for patents, Lens.org and INPI were used. There are*



few reports of the fibrinolytic action of proteases recovered from residues from fishing processing, which may be a new area of investigation, aiming at maintaining sustainability in the supply of this raw material and proposing a new source to the fibrinolytic enzyme market.

Keywords: protease, therapeutics, innovation, thrombosis.

1. INTRODUÇÃO

A nova infecção por coronavírus (COVID-19) é causada pelo novo SARS-CoV-2 (Miesbach; Makris, 2020) e pode estar associada a alterações inflamatórias induzidas, conforme já foi observado em pacientes com coagulopatia intravascular disseminada. A falta de imunidade prévia ao COVID-19 resultou em um grande número de pacientes infectados em todo o mundo e em incertezas quanto ao gerenciamento das complicações desta doença viral. Os pacientes da COD-19 desenvolvem lesão pulmonar aguda que pode progredir para insuficiência respiratória, embora também possa ocorrer insuficiência de vários outros órgãos. A coagulopatia inicial do apresenta degradação de fibrina/fibrinogênio, anormalidades no tempo de protrombina e tempo parcial de tromboplastina (Connors; Levy, 2020).

Os medicamentos mais eficazes para o tratamento da trombose são as enzimas fibrinolíticas, agentes clínicos importantes para o tratamento de doenças cardiovasculares (DCV) (Hu *et al.*, 2019; Kim; Rim; Choe, 2020), concentrando-se de acordo com seu modo de ação em dois tipos: ativadores de plasminogênio (PAs), incluindo ativador de plasminogênio tecidual (t-PA), estreptoquinase (SK, 3.4.99.22) e uroquinase (UK, EC 3.4.21.31), que pode lisar a fibrina através da formação de plasmina a partir do plasminogênio, e enzimas fibrinolíticas semelhantes à plasmina (Hu *et al.*, 2019), que podem degradar a fibrina diretamente (Franco *et al.*, 2001; Batista *et al.*, 2017). Apesar de extensa pesquisa sobre eles e seu amplo uso como agentes trombolíticos, esses PAs têm alto preço e baixa especificidade, levando os pesquisadores a explorar recursos mais seguros e baratos (Hu *et al.*, 2019).

Uma variedade de enzimas fibrinolíticas já foi produzida, purificada e aplicada em ensaios laboratoriais a partir de plantas, animais e microrganismos, além de novas fontes fibrinolíticas continuam sendo exploradas (Kim; Rim; Choe, 2020). Foi identificada atividade fibrinolítica produzida por microrganismos durante o estágio de fermentação natural de produtos alimentícios tradicionais coreanos e chineses a base de peixes e de uma variedade de camarões na elaboração de conservas (Hu *et al.*, 2019; Kim; Rim; Choe, 2020). Bioprospecções de resíduos de moluscos marinhos já foram utilizados para a produção de enzima fibrinolítica por *Bacillus cereus* IND5 através da fermentação em estado sólido (Biji *et al.*, 2016).

Abundantes na indústria da aquicultura, os resíduos pesqueiros surgem como uma alternativa viável de enzimas fibrinolíticas (Oliveira *et al.*, 2017). Durante o processamento dos produtos aquáticos, são descartados vários resíduos com possibilidades reais de obtenção de biomoléculas (Cahu *et al.*, 2012), incluindo enzimas proteolíticas de interesse biofarmacêutico, como as fibrinolíticas (Oliveira *et al.*, 2019).

Ainda, leva-se em consideração das necessidades atuais devido à pandemia do COVID-19 causada pelo coronavírus, uma vez que dentre as implicações dessa doença estão quadros de tromboembolismo (Costa *et al.*, 2020). Assim, este trabalho objetivou realizar uma mini-revisão sobre o potencial da exploração pesqueira como matéria-prima para fornecimento de enzimas fibrinolíticas para uso alternativo no tratamento da COVID-19.



2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para esta revisão, realizamos uma pesquisa bibliográfica utilizando sites científicos, tais como ScienceDirect (<https://www.sciencedirect.com/>), Elsevier (<https://www.elsevier.com/>), Springer (<https://www.springer.com/>), TandFonline (<https://www.tandfonline.com/>), PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), Wiley Online Library (<https://onlinelibrary.wiley.com/>) e o Google Scholar (<https://scholar.google.com.br/>). A pesquisa foi realizada a partir das palavras-chave: pescado fibrinolítico COVID-19, pescado trombolítico, enzimas fibrinolíticas do pescado, usando-se termos em português e sua tradução em inglês. Os materiais encontrados nos diferentes bancos de bases de dados científicos foram, posteriormente, conferidos com detalhes sobre os modelos e tipos (artigos científicos; revisões bibliográficas; livros; capítulos de livro), não havendo restrição quanto ao uso destes. Não houve qualquer restrição quanto ao período de publicação. As informações gerais foram catalogadas de acordo com interesse dos autores. Ainda, foi consultado o banco de patentes Lens.org (<https://www.lens.org/>) e do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) (<https://gru.inpi.gov.br/>), a partir da sentença: extração+enzima+fibrinolítica+peixe, presentes no título, resumo ou corpo do texto; visando a quantificação de solicitações de propriedade a respeito do tema, sem ser realizado qualquer tipo de análise qualitativa das mesmas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Implicações fisiopatológicas da COVID-19: cenário atual

O COVID-19 pode predispor ao tromboembolismo venoso e arterial devido a inflamação excessiva, hipóxia, imobilização e coagulação intravascular difusa (Klok *et al.*, 2020). Muitos pacientes que recebem terapia antitrombótica podem desenvolver COVID-19, o que pode ter implicações na escolha, dosagem e monitoramento laboratorial. A pandemia torna necessário e urgente considerar a otimização das tecnologias disponíveis para cuidar de pacientes com doença trombotica (Bikdeli *et al.*, 2020), bem como investigar fontes alternativas dessa matéria-prima.

A infecção pelo COVID-19 é caracterizada por uma resposta inflamatória exagerada que pode levar a manifestações graves, como síndrome respiratória do adulto, sepse, coagulopatia e morte em uma proporção de pacientes. Uma coagulopatia foi relatada em até 50% dos pacientes com manifestações graves de COVID-19. Dados limitados sugerem uma alta incidência de trombose venosa profunda e embolia pulmonar em até 40% dos pacientes, apesar do uso de uma dose padrão de heparina de baixo peso molecular na maioria dos casos. Além disso, a trombose microvascular pulmonar foi relatada e pode desempenhar um papel na insuficiência pulmonar progressiva (Miesbach; Makris, 2020). Investigações recentes têm chamado a atenção para novas fontes de trombolíticos, principalmente, para o uso em pacientes com maior predisposição a ocorrência de trombozes (Brüggemann *et al.*, 2020; Helms *et al.*, 2020). Assim, mais estudos são necessários para avaliar a necessidade de anticoagulação terapêutica em pacientes com COVID-19 (Kashi *et al.*, 2020). Nesse sentido, organismos aquáticos surgem como matéria-prima alternativa e promissora para fornecer enzimas com potencial fibrinolítico (Oliveira *et al.*, 2017).

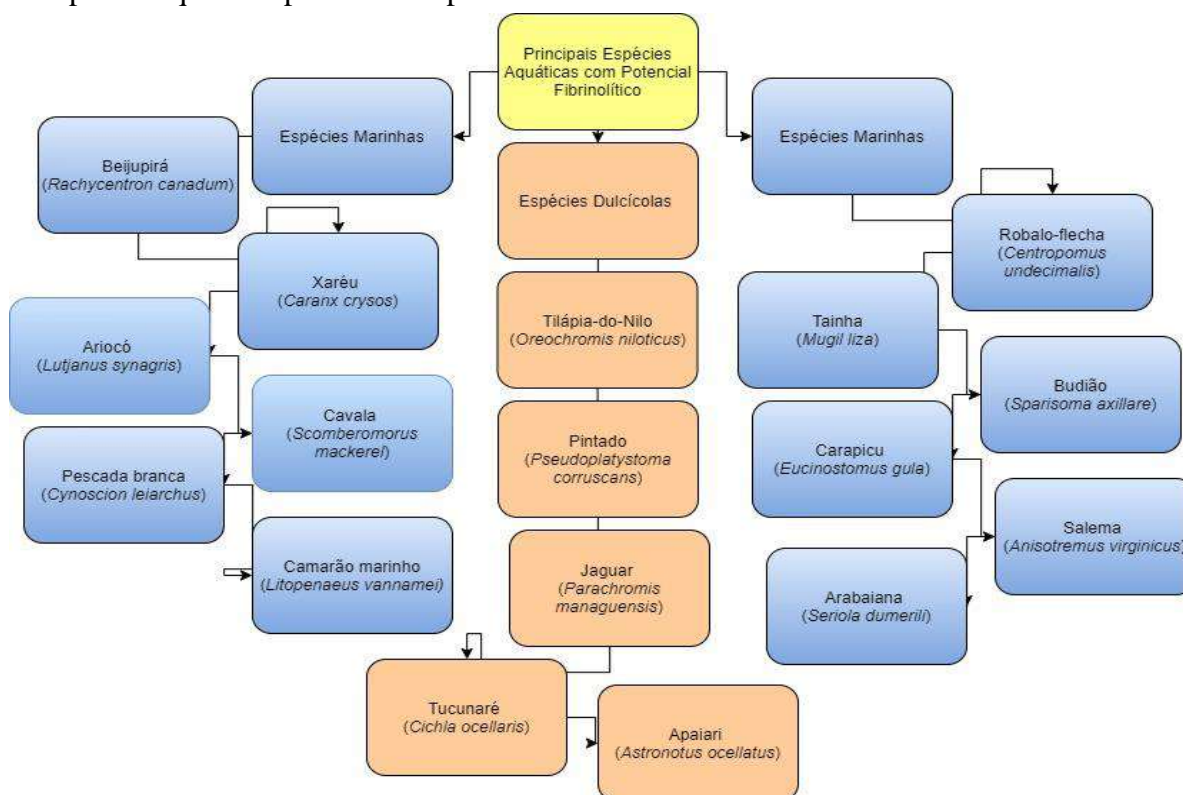
3.2 Potencial do pescado em fornecer enzimas fibrinolíticas para tratamento da COVID-19

De acordo com os portais de períodos investigados, são escassos dados na literatura a

respeito do uso dos recursos pesqueiros como matéria-prima para o fornecimento de proteases com potencial fibrinolítico. Muitos dos relatos estão relacionados com a utilização dos resíduos como substratos aproveitáveis em processos fermentativos visando à produção de proteases com ação fibrinolítica, já tendo sido empregados resíduos de peixes e camarões marinhos e/ou dulcícolas (Wang *et al.*, 2011; Biji *et al.*, 2016; Kim; Rim; Choe, 2020). Ou até mesmo o uso de agentes microbianos isolados a partir de fontes aquáticas (Biji *et al.*, 2016).

A utilização de organismos aquáticos como agentes diretos no fornecimento de proteases fibrinolíticas foi descrita por Silva *et al.* (2018) ao relatar alta produção dessas proteases pela espécie de microalga *Chlorella vulgaris* cultivada em condições autotróficas e mixotróficas. No mais, até o presente momento, apenas alguns poucos resíduos descartados do beneficiamento de produtos aquícolas foram identificados como fontes diretas de enzimas fibrinolíticas (Oliveira *et al.*, 2017), porém sem investigações mais contundentes, a partir de espécies listadas na figura 1, incluindo espécies de ambientes marinho e dulcícolas.

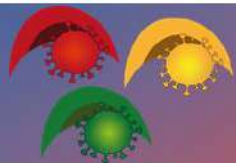
Figura 1- Espécies aquáticas promissoras para fornecimento de enzimas fibrinolíticas.



Fonte: Própria.

Foram observados apenas 16 espécies de peixes teleósteos e 1 de camarão marinho como fontes promissoras. Das espécies de peixes, 12 são oriundas da exploração pesqueira marinha, enquanto 4 são provenientes de ambientes dulcícolas. Vale ressaltar que dentre essas, está a tilápia do Nilo, a espécie de peixe mais cultivada na piscicultura nacional (Oliveira *et al.*, 2019) Sendo assim, uma opção viável e econômica que necessita de novas investigações para sua possível utilização como agente trombolítico tendo em vista a abundância da matéria-prima.

Foi investigada também a quantidade de patenteamento a respeito da extração e uso de



enzimas fibrinolíticas de peixes. A partir da base de dados Lens.org foram encontrados 6 depósitos, concentrados nos anos de 2002, 2014 e 2016. Todavia, os dados encontrados fazem referência apenas a citação das palavras investigadas, não correspondendo, necessariamente, a solicitações utilizando espécies aquáticas diretamente como fontes de enzimas fibrinolíticas. A mesma busca foi realizada no banco de patentes do INPI, porém nenhum resultado foi encontrado, o que favorece investigações que possam gerar novos produtos biotecnológicos terapêuticos com base na exploração pesqueira, principalmente voltadas ao tratamento do tromboembolismo. Também, faz-se necessário que as fontes de enzimas fibrinolíticas descritas por Oliveira et al. (2017, 2019) passem por um rigoroso processo de obtenção e tratamento para purificação, além de testes *in vivo* e *in vitro* nos âmbitos farmacológicos e toxicológicos para garantir a segurança e a viabilidade clínica (Cicha, 2015).

4. CONCLUSÃO

O potencial fibrinolítico dos resíduos da pesca e aquicultura ainda é pouco conhecido devido aos poucos relatos disponíveis na literatura científica, incluindo a quantidade escassa de depósitos de patentes a respeito do tema. Como fonte abundante e de fácil aquisição, sugere-se investigações que possam explorar as possibilidades e tornar esses subprodutos uma matéria-prima para uso biomédico e farmacêutico para tratamento de doenças cardiovasculares após processos de purificação, definição das suas propriedades físico-químicas e ensaios *in vitro* e *in vivo*, para que possa se tornar uma possibilidade viável para uso no tratamento do tromboembolismo, além de servir de fonte alternativa para o tratamento das implicações trombolíticas da COVID-19.

5. REFERÊNCIAS

BATISTA, J.M.B; PORTO, T.S.; NASCIMENTO, T.P.; PORTO, A.L.F.; PORTO, C.S. Produção e caracterização de protease fibrinolítica de *Streptomyces parvulus* DPUA 1573. *Arq. Brasil. Med. Vet. Zootec.*, v.69, p.123-129, 2017.

BIJI, G.D.; ARUN, A.; MUTHULAKSHMI, E.; VIJAYARAGHAVAN, P.; ARASU, M.V.; AL-DHABI, N. A. Bio-prospecting of cuttle fish waste and cow dung for the production of fibrinolytic enzyme from *Bacillus cereus* IND5 in solid state fermentation. *3 Biotech*, v.6, n.2, p.231, 2016.

BIKDELI, B.; MADHAVAN, M.V.; JIMENEZ, D.; CHUICH, T.; DREYFUS, I.; DRIGGIN, E.; NIGOGHOSSIAN, C.; AGENO, W.; MADJID, M.; GUO, Y.; TANG, L.V.; HU, Y.; GIRI, J.; CUSHMAN, M.; QUÉRÉ, I.; DIMAKAKOS, E.P.; GIBSON, C.M.; LIPPI, G.; FAVALORO, E.J.; FAREED, J. ET AL. Global COVID-19 Thrombosis Collaborative Group, Endorsed by the ISTH, NATF, ESVM, and the IUA, Supported by the ESC Working Group on Pulmonary Circulation and Right Ventricular Function. COVID-19 and Thrombotic or Thromboembolic Disease: Implications for Prevention, Antithrombotic Therapy, and Follow-Up: JACC State-of-the-Art Review. *Journal of the American College of Cardiology*, v.75, n.23, p.2950–2973, 2020.

BRÜGGEMANN, R.; GIETEMA, H.; JALLAH, B.; TEN CATE, H.; STEHOUWER, C.;



SPAETGENS, B. Arterial and venous thromboembolic disease in a patient with COVID-19: A case report. *Thrombosis research*, v.191, p.153–155, 2020.

CAHU, T.B.; SANTOS, S.D.; MENDES, A.; CÓRDULA, C.R.; CHAVANTE, S.F.; CARVALHO, L.B.; NADER, H.B.; BEZERRA, R.S. Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste. *Process Biochem.*, v.47, p.570-577, 2012.

CICHA, I. Thrombosis: novel nanomedical concepts of diagnosis and treatment. *World J. Cardiol.*, v.7, n.8, p.434-441, 2015.

CHOI, H.S.; SA, Y.S. Fibrinolytic and antithrombotic protease from *Ganoderma lucidum*. *Mycol.*, v.92, p.545–552, 2000.

CONNORS, J. M.; LEVY, J. H. COVID-19 and its implications for thrombosis and anticoagulation. *Blood*, v.135, n.23, p.2033–2040, 2020.

COSTA, I.B.S.S.; ROCHITTE, C.E.; CAMPOS, C.M.; BARBERATO, S.H.; OLIVEIRA, G.M.M.; LOPES, M.A.C.Q.; NOMURA, C.H.; ABIZAID, A.A.; CERRI, C.; KALIL FILHO, R.; HAJJAR, L.A. Imagem cardiovascular e procedimentos intervencionistas em pacientes com infecção pelo novo coronavírus. *Imag. Card. Proced. Interv.*, v.115, n.1, p.111-126, 2020.

FRANCO, R.F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. *Medicina*, v.34, p. 229-237, 2001.

HELMS, J.; TACQUARD, C.; SEVERAC, F.; LEONARD-LORANT, I.; OHANA, M.; DELABRANCHE, X.; MERDJI, H.; CLERE-JEHL, R.; SCHENCK, M.; FAGOT GANDET, F.; FAFI-KREMER, S.; CASTELAIN, V.; SCHNEIDER, F.; GRUNEBaum, L.; ANGLÉS-CANO, E.; SATTLER, L.; MERTES, P.M.; MEZIANI, F. High risk of thrombosis in patients with severe SARS-CoV-2 infection: a multicenter prospective cohort study. *Intensive care medicine*, v.46, n.6, p.1089–1098, 2020.

HU, Y.; YU, D.; WANG, Z.; HOU, J.; TYAGI, R.; LIANG, Y.; HU, Y. Purification and characterization of a novel, highly potent fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* DC27 screened from Douchi, a traditional Chinese fermented soybean food. *Sci. Rep.*, v.9, n.1, p.9235, 2019.

KASHI, M.; JACQUIN, A.; DAKHIL, B.; ZAIMI, R.; MAHÉ, E.; TELLA, E.; BAGAN, P. Severe arterial thrombosis associated with Covid-19 infection. *Thrombosis research*, v.192, p.75–77, 2020.

KIM, C.; RI, K.; CHOE, S. A novel fibrinolytic enzymes from the Korean traditional fermented food—Jotgal: Purification and characterization. *J. Food Biochem.*, v.44, p.e13255, 2020.



KLOK, F.A.; KRUIP, M.; VAN DER MEER, N.; ARBOUS, M.S.; GOMMERS, D.; KANT, K.M.; KAPTEIN, F.; VAN PAASSEN, J.; STALS, M.; HUISMAN, M.V.; ENDEMAN, H. Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. *Thrombosis research*, v.191, p.145–147, 2020.

MIESBACH, W.; MAKRIS, M. COVID-19: Coagulopathy, Risk of Thrombosis, and the Rationale for Anticoagulation. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.*, v.26, Artigo 1076029620938149, 2020.

OLIVEIRA, V.M.; NASCIMENTO, T. P.; ASSIS, C.R.D.; BEZERRA, R.S.; PORTO, A.L.F. Study on enzymes of industrial interest in digestive viscera: Greater amberjack (*Seriola dumerili*). *J. Coast. Life Med.*, v.5, p.233-238, 2017.

OLIVEIRA, V.M.; ASSIS, C.R.D.; SILVA, J.C.; SILVA, Q.J.; BEZERRA, R.S.; PORTO, A. L.F. Recovery of fibrinolytic and collagenolytic enzymes from fish and shrimp byproducts: potential source for biomedical applications. *Bol. Inst. Pesca*, v.45, p. 1-10, 2019.

SILVA, P.E.C.; BARROS, R.C.; ALBUQUERQUE, W.W.C.; BRANDÃO, R.M.P.; BEZERRA, R.P.; PORTO, A.L. F. *In vitro* thrombolytic activity of a purified fibrinolytic enzyme from *Chlorella vulgaris*. *J. Chrom. B*, v.1092, p.524–529, 2018.

WANG, S.; WU, Y.; LIANG, T. Purification and biochemical characterization of a nattokinase by conversion of shrimp shell with *Bacillus subtilis* TKU007. *N. Biotechnol.*, v.28, n.2, p.196–202, 2011.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

PLATAFORMA BIOSSENSORA NANOESTRUTURADA PARA A DETECÇÃO DO ANTICORPO DA ONCOSTATINA M (OSM-R)

A. G. SILVA JUNIOR^{1,2}, K. Y. P. S. AVELINO^{1,2}, M. D. L. OLIVEIRA^{1,2}, I. A. M. FRIAS^{1,2},
A. E. EL-SALHI³, M. G. R. PITTA¹, C. A. S. ANDRADE^{1,2}

¹ Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, UFPE, Recife/PE, Brasil;

² Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, UFPE, Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica, Recife/PE, Brasil;

³ Université Claude Bernard Lyon 1 (UCBL), Villeurbanne/França, França;

E-mail para contato: albertogaldino16@gmail.com

RESUMO – A esclerose sistêmica (ES) é uma das principais doenças autoimunes em estudo, uma vez que alcança um elevado número de pessoas, principalmente mulheres. Diante dos métodos tradicionais de diagnóstico da ES (como a identificação do fenômeno de Raynaud e a presença de autoanticorpos), novos alvos terapêuticos têm surgido como alternativa tanto para diagnóstico quanto para o acompanhamento do tratamento. A oncostatina M, pertencente à família da interleucina 6 (IL-6) é um biomarcador de inflamação muito presente na ES, cuja identificação se torna uma inovadora alternativa de diagnóstico. Biossensores eletroquímicos são dispositivos analíticos em ascensão, uma vez que integram rápida detecção, elevada sensibilidade e especificidade, além de baixo custo e miniaturização. O sistema sensor eletroquímico desenvolvido, composto por monocamadas automontadas de ácido 4-mercaptobenzóico (MBA), nanopartículas de ouro revestidas por quitosana (AuNPs-Quit) e do OSM recombinante (OSM-R) foi capaz de detectar diferentes diluições de anticorpos específicos para OSM por meio da técnica espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), apresentando o limite de detecção de no fator de diluição de $2,7 \times 10^7$ vezes. Os resultados apresentados destacam o biossensor desenvolvido como alternativa promissora para a detecção de biomarcadores para ES.

Palavras-chave: Biossensor; anticorpos; AuNPs; quitosana; esclerose sistêmica.

ABSTRACT - Systemic sclerosis (SSc) is one of the main autoimmune diseases studied, since it affects a large number of people, mainly women. In view of the traditional methods of diagnosis of SSc (such as the identification of Raynaud's phenomenon and the presence of autoantibodies), new therapeutic targets have emerged as an alternative for both diagnosis and monitoring of treatment. Oncostatin M, belonging to the family of interleukin 6 (IL-6) is a biomarker of inflammation very present in SSc, whose identification becomes an innovative diagnostic alternative. Electrochemical biosensors are promising analytical devices, since they integrate



rapid detection, high sensitivity and specificity, in addition to low cost and miniaturization. The electrochemical sensor system developed, composed of self-assembled monolayers of 4-mercaptobenzoic acid (MBA), gold nanoparticles coated with chitosan (AuNPs-Quit) and recombinant OSM (OSM-R) was able to detect different dilutions of antibodies specific to OSM by using the electrochemical impedance spectroscopy (EIS) technique, with a detection limit of 2.7×10^7 as dilution factor. The results presented highlight the developed biosensor as a promising alternative for the detection of biomarkers for ES.

Keywords: Biosensor; antibodies; AuNPs; chitosan; systemic sclerosis.

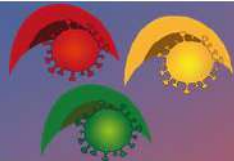
1. INTRODUÇÃO

Apesar de serem destacadas como raras, doenças autoimunes apresentam dados alarmantes de morbidade e mortalidade, onde mulheres jovens e de meia idade são os principais indivíduos acometidos (MOUTSOPOULOS; ZAMPELI; VLACHOYIANNOPOULOS, 2018). Sua cronicidade desencadeia não apenas elevado impacto econômico relacionado aos diversos tratamentos de custo elevado, mas com a qualidade de vida em geral. Artrite reumatoide, diabetes mellitus tipo 1 e esclerose sistêmica (ES) se destacam dentre os outros tipos de doenças autoimunes levando-se em conta o número crescente de casos, e com o passar dos anos, se tornaram um problema de saúde alcançando atenção mundial (PANOPOULOS et al., 2018).

A ES é uma doença do tecido conectivo, de caráter autoimune, com aspectos clínicos envolvendo dano microvascular, desregulação da imunidade inata e adaptativa e fibrose generalizada em múltiplos órgãos, onde as mudanças histopatológicas nos pulmões, rins e coração é que irão determinar o resultado clínico. Uma característica marcante da ES é relacionada à variação dos sintomas e sinais dentre os pacientes, cuja heterogeneidade encobre manifestações clínicas, perfil de anticorpos e resposta com o tratamento existente. Em adição, dados de prevalência e incidência que variam de acordo com cada país, indicando um elevado número de casos no mundo (ALLANORE et al., 2015).

A nível celular, a ES caracteriza-se pela reatividade autoimune de linfócitos B e T, que leva a ativação de fibroblastos e células endoteliais, bem como a produção exacerbada de colágeno, resultando em patologias vasculares e acúmulo de colágeno em diversos órgãos e tecidos (SIERRA-SEPÚLVEDA et al., 2019). Atualmente, são reconhecidas pelo menos 3 apresentações clínicas: cutânea limitada (LcES), caracterizada pelo espessamento da pele, fenômeno de Raynaud e hipertensão arterial pulmonar; cutânea difusa (DcES), marcada pela progressão do espessamento da pele, agravamento de artrite e risco acentuado de doença pulmonar intersticial; e sine escleroderma (EsES), a mais rara entre as três classificações, cujas manifestações clínicas acometem apenas órgãos internos (DESBOIS; CACOUB, 2016; PATTANAIK et al., 2015).

O diagnóstico da ES tem como principal expoente a identificação do fenômeno de Raynaud, além das alterações e espessamento da pele em conjunto com alterações extracutâneas, anormalidades capilaroscópicas e presença de autoanticorpos (CUTOLO; SOLDANO; SMITH, 2019). A fim de reduzir custos e obter efetiva identificação da ES, alternativas aos métodos tradicionais têm sido desenvolvidas, buscando diferentes técnicas e alvos terapêuticos. A busca por biomarcadores na ES tem crescido nos últimos anos, almejando a identificação de acometidos pela doença e de subgrupos potenciais para tratamento, além de avaliar a resposta à terapia. Dessa forma, tais marcadores podem ser mediadores patogênicos e alvos para terapia (DENTON; ONG,



2017).

Quando comparado aos métodos considerados padrão, biossensores eletroquímicos se destacam como ferramentas inovadoras na detecção dos principais biomarcadores da ES, uma vez que a abordagem eletroquímica permite o monitoramento em tempo real da formação do complexo imune, bem como o acompanhamento do paciente em determinado tratamento, prescrevendo sua efetividade ou não (CAMPUZANO et al., 2019). Em adição, biossensores dispõem de rápida obtenção e análise de resultados, simplicidade na montagem, baixo-custo e elevada sensibilidade e especificidade, principalmente por conta da integração de nanopartículas metálicas que auxiliam na condução da corrente de elétrons e processos de oxirredução ocorrendo na interface eletrodosolução (LEVA-BUENO; PEYMAN; MILLNER, 2020).

Estudos em ES destacam níveis séricos elevados de determinadas citocinas, correlacionando-as como parâmetros clínicos da doença. Dentre eles, há destaque para a interleucina 6 (IL-6) e a oncostatina M (OSM), constituinte da família da IL-6, cuja produção está diretamente ligada ao estímulo inflamatório relativo à doença (STAWSKI; TROJANOWSKA, 2019). O receptor do fator inibidor da leucemia (LIFR) e receptor da oncostatina M (OSM-R) são os mais estudados na sinalização da OSM, onde a sinalização favorecida pela OSM-R induz maior processo patológico. Portanto, a identificação da OSM-R poderá ser usada como marcador da ES, principalmente no prognóstico da doença, visando o biorreconhecimento de anticorpos específicos (DE ALMEIDA et al., 2020). Dessa forma, a presente proposta teve como objetivo a imobilização do OSM-R, compostos tiolados como o ácido 4-mercaptobenzóico (MBA) e nanopartículas de ouro revestidas por quitosana (AuNPs-Quit) sobre um eletrodo com superfície de ouro como plataforma biossensora nanoestruturada para a detecção de anticorpos de OSM-R. A interação entre OSM-R e o analito-alvo (anticorpos OSM-R) foi avaliada via espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

MBA, 1-etil-3-(3dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), quitosana de baixo peso molecular e ácido tetracloroaurico III trihidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) foram obtidos pela Sigma-Aldrich. O ferrocianeto de potássio ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), ferricianeto de potássio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico foram fornecidos da VETEC (Brasil). Todos reagentes foram de grau analítico e utilizados como recebidos. Em todos os experimentos foi utilizada água deionizada ultrapura obtida pelo sistema Milli-Q (Billerica, EUA).

Síntese de nanopartículas de ouro revestidas por quitosana (AuNPs-Quit)

O preparo das AuNPs-Quit seguiu o protocolo de MAJDI et al., 2019, com algumas modificações. Inicialmente, a quitosana foi diluída em 50 mL de ácido acético glacial (1%) para a concentração de 1% (p/v), ficando em agitação magnética a 65°C. Em seguida, 50 mL de HAuCl_4 (1 mM) foi adicionada à reação. A quitosana agiu como agente redutor e estabilizador, onde a suspensão adquiriu uma coloração roxa gradualmente, seguindo homogeneização por 2h, 65°C, e em seguida, permaneceu em temperatura ambiente. As nanopartículas foram estocadas a 4°C até sua utilização.



Montagem da plataforma biossensora

Um eletrodo de trabalho com superfície de ouro ($\phi = 2 \text{ mm}$) foi utilizado como substrato para montagem do sistema sensor. Inicialmente, o mesmo passou por um processo de limpeza utilizando HClO, alumina (Al_2O_3) e água deionizada em banho ultrassônico, passando por ciclagem via voltametria cíclica (VC) e até que um voltamograma padrão para eletrodo limpo fosse obtido. A modificação do eletrodo teve início com a formação de monocamadas automontadas pela imersão do mesmo a uma solução etanólica de MBA (50 mM) durante 10 min. Posteriormente, os agentes acopladores EDC:NHS foram utilizados (5 min) a fim de promoverem uma ligação estável e prolongada entre os grupos carboxílicos livres do MBA e grupamentos amina das AuNPs-Quit (10 min de adsorção). Em seguida, o antígeno OSM-R recombinante (40 ng mL) foi adsorvido à plataforma durante 30 min. Por fim, objetivando obstruir os sítios livres, BSA 0,1% foi adicionado à plataforma e em seguida o eletrodo foi lavado com água deionizada ultrapura.

Caracterização eletroquímica

Os experimentos foram avaliados por meio de um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 128N (Ecochemie, Holanda), software NOVA 1.11 e o programa OriginPro8. Uma célula eletroquímica de sistema com 3 eletrodos (eletrodo de trabalho, Ag/AgCl saturado com KCl 3M como eletrodo de referência (ER) e fio de platina como eletrodo auxiliar (EA) foi utilizado. Os eletrodos foram imersos uma solução de 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (1:1, v/v) em tampão fosfato (PBS, pH 7.4) como sonda redox.

A VC foi realizada com um potencial entre +0,7 e -0,4 V com uma taxa de varredura variando de $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, enquanto que os espectros de impedância da EIS foram registrados em uma faixa de frequência variando de 100 mHz a 100 kHz e amplitude de potencial de onda senoidal entre 10 mV.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

VC e EIS se destacam entre as diversas técnicas para avaliação da construção de biossensores, bem como a caracterização da interação biossensor-analito por fornecer informações de reações que ocorrem na interface eletrodo-solução redox.

Uma representação esquemática do processo de montagem pode ser observado na Fig. 1. Inicialmente, estudos de adsorção do MBA foram realizados em diferentes períodos de tempo, onde 10 min demonstrou a saturação da superfície do eletrodo.

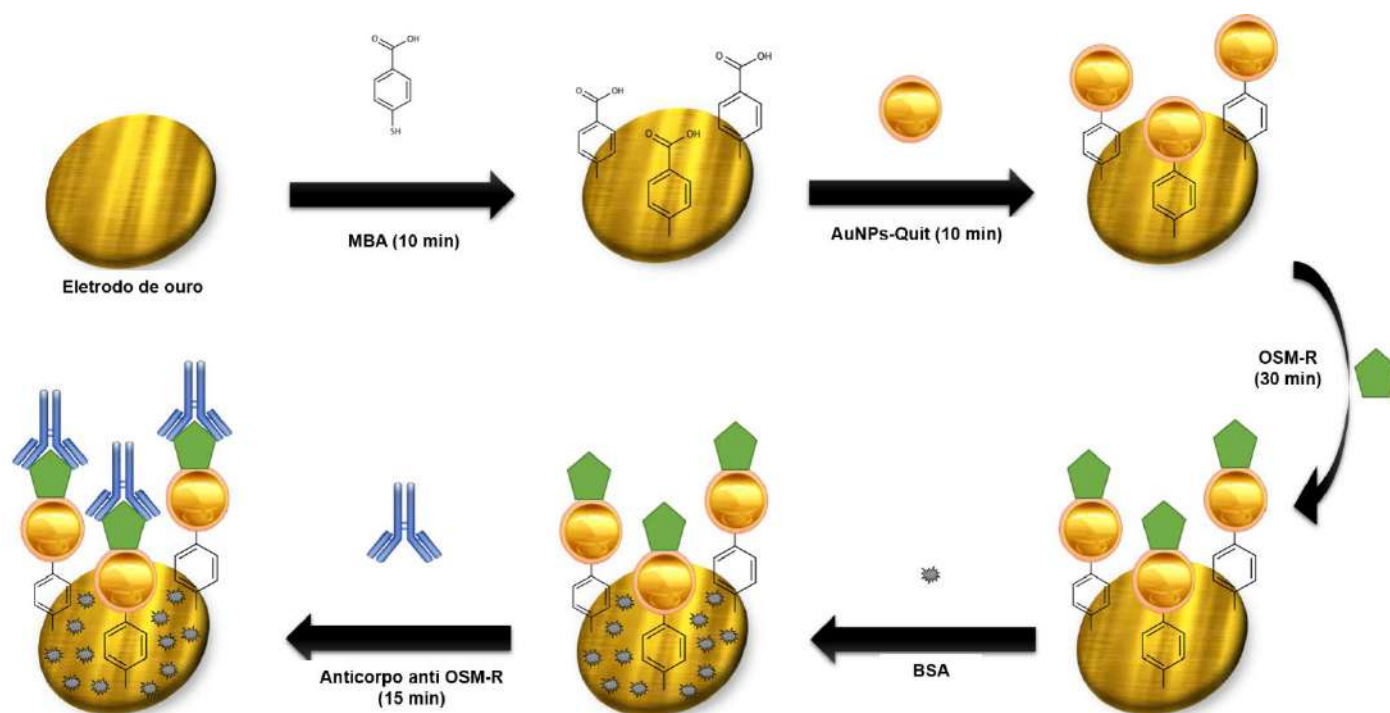


Figura 1. Representação esquemática da montagem do sistema sensor MBA_AuNPS-Quit-OSMR.

As análises impedimétricas da montagem do sensor está descrita na Fig. 2. A adsorção do MBA (50 mM) por 10 min resultou no aumento no semicírculo de Cole-Cole associado à resistência à transferência de carga (R_{ct}) (curva vermelha, indicando a formação de monocamadas automontadas de MBA). A utilização dessa estratégia deve-se ao recobrimento estável e reproduzível de compostos contendo o grupo tiol (-SH) em superfícies de ouro, resultando na ligação S-Au, com a perda do hidrogênio em um processo de quimiossorção (HASAN; PANDEY, 2018; SINGH; KAUR; COMINI, 2020). Posteriormente, a aplicação dos agentes acopladores EDC NHS com as AuNPs-Quit resultou na diminuição da resposta impedimétrica (curva azul) devido à condutividade das nanopartículas e das cargas neutras do éster NHS (KELEŞTEMUR; ALTUNBEK; CULHA, 2017). A adição do OSM-R como elemento de biorreconhecimento resultou no aumento da resposta impedimétrica (curva verde), indicando adsorção à monocamada de MBA e AuNPs-Quit. O BSA (curva rosa) deu origem a um novo aumento do R_{ct} , resultado do recobrimento dos sítios livres presentes no eletrodo (AVELINO et al., 2016).

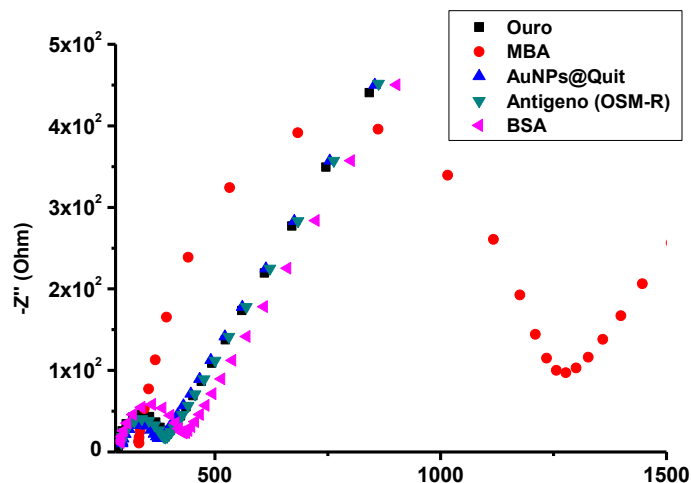


Figura 2. Análise impedimétrica do processo de montagem do sistema MBA_AuNPs-Quit_OSMR.

Após a obtenção da plataforma sensora, os testes de detecção do anticorpo para OSM-R foi iniciado, onde inicialmente foi diluído em diferentes fatores de diluição (entre $2,5 \times 10^7$ a $2,5 \times 10^3$). Em seguida, cada diluição foi testada adsorvendo $2\mu\text{L}$ do mesmo ao biossensor durante 15 min. Em seguida, para remoção dos alvos livres, o eletrodo foi lavado com água deionizada ultrapura. Como observado na Fig. 3, os espectros de impedância indicam um aumento sequencial do semicírculo de Cole-Cole referentes às diferentes concentrações dos anticorpos, indicando um limite de detecção no fator de diluição de $2,5 \times 10^7$ vezes.

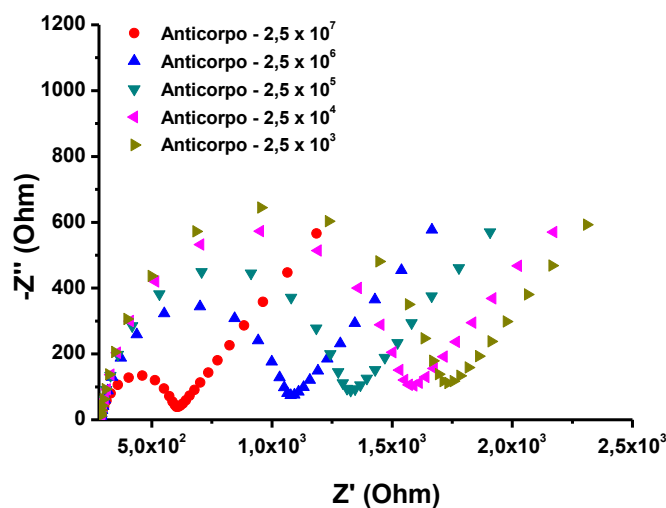


Figura 3. Diagrama de Nyquist da detecção de anticorpos específicos para OSM-R.

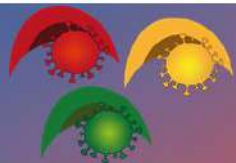


4. CONCLUSÃO

A plataforma biossensora nanoestruturada formada por monocamadas automontadas de MBA, nanopartículas do tipo AuNPs-Quit e OSM-R recombinante mostrou-se sensível à detecção de diferentes concentrações de anticorpos específicos para OSM-R, cuja avaliação se deu através da técnica eletroquímica EIE. O biossensor exibiu excelente sensibilidade, com limite de detecção no fator de diluição de $2,7 \times 10^7$ vezes. Os resultados preliminares apresentados destacam o biossensor desenvolvido como alternativa promissora para a detecção de biomarcadores para ES.

5. REFERÊNCIAS

- ALLANORE, Y. et al. Systemic sclerosis. **Nature**, v. 1, p. 15002, 2015.
- AVELINO, K. Y. P. S. et al. Attomolar electrochemical detection of the BCR/ABL fusion gene based on an amplifying self-signal metal nanoparticle-conducting polymer hybrid composite. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 148, p. 576–584, 2016.
- CAMPUZANO, S. et al. Electrochemical biosensors for autoantibodies in autoimmune and cancer diseases. **Analytical Methods**, 2019.
- CUTOLO, M.; SOLDANO, S.; SMITH, V. Pathophysiology of systemic sclerosis: current understanding and new insights. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 15, n. 7, p. 753–764, 2019.
- DE ALMEIDA, A. R. et al. Increased levels of the soluble oncostatin M receptor (sOSMR) and glycoprotein 130 (sgp130) in systemic sclerosis patients and associations with clinical parameters. **Immunobiology**, v. 225, n. 3, p. 151964, 2020.
- DENTON, C. P.; ONG, V. H. Interleukin-6 and related proteins as biomarkers in systemic sclerosis. **Journal of Scleroderma and Related Disorders**, v. 2, n. Suppl 2, p. S13–S19, 2017.
- DESBOIS, A. C.; CACOUB, P. Systemic sclerosis: An update in 2016. **Autoimmunity Reviews**, v. 15, n. 5, p. 417–426, 2016.
- HASAN, A.; PANDEY, L. M. Self-assembled monolayers in biomaterials. In: **Nanobiomaterials: Nanostructured Materials for Biomedical Applications**. [s.l.] Elsevier Ltd., 2018. p. 137–178.
- KELEŞTEMUR, S.; ALTUNBEK, M.; CULHA, M. Influence of EDC/NHS coupling chemistry on stability and cytotoxicity of ZnO nanoparticles modified with proteins. **Applied Surface Science**, v. 403, p. 455–463, 2017.
- LEVA-BUENO, J.; PEYMAN, S. A.; MILLNER, P. A. A review on impedimetric immunosensors for pathogen and biomarker detection. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 209, n. 3, p. 343–362, 2020.
- MAJDI, H. et al. Antibody conjugated green synthesized chitosan-gold nanoparticles for optical biosensing. **Colloids and Interface Science Communications**, v. 33, n. May, p. 100207, 2019.
- MOUSOPOULOS, H. M.; ZAMPELI, E.; VLACHOYIANNOPOULOS, P. G. **Rheumatology in Questions**. 1. ed. Cham, Switzerland: Springer, 2018.
- PANOPOULOS, S. et al. Prevalence of comorbidities in systemic sclerosis versus rheumatoid arthritis : a study. **Arthritis Research & Therapy**, v. 20, n. 1, p. 267, 2018.
- PATTANAIK, D. et al. Pathogenesis of systemic sclerosis. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. 272, p. 755–759, 2015.



SIERRA-SEPÚLVEDA, A. et al. Systemic sclerosis pathogenesis and emerging therapies, beyond the fibroblast. **BioMed Research International**, v. 2019, 2019.

SINGH, M.; KAUR, N.; COMINI, E. Role of Self-Assembled Monolayers in Electronic Devices. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 8, n. 12, p. 3938–3955, 2020.

STAWSKI, L.; TROJANOWSKA, M. Oncostatin M and its role in fibrosis. **Connective Tissue Research**, v. 60, n. 1, p. 40–49, 2019.

6. AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. César Andrade e Profa. Maria Danielly pelo suporte e à CAPES pela bolsa em pesquisa.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

NANOSISTEMAS QUANTUM DOTS-LECTINAS COMO ALTERNATIVA NA INVESTIGAÇÃO DE GLICANOS EM ESTRUTURAS DE *CANDIDA*

A. R. SILVA¹, R. R. V. ALVES², S.J.S.C. BRANCO³, A.O. MARINHO⁴, e T. H. NAPOLEÃO⁵

^{1,2,3,4,5}Laboratório de Bioquímica de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco.

E-mail para contato: rodriguesabdenego@gmail.com

RESUMO – *Pontos Quânticos (QDs) são nanocristais semicondutores fluorescentes que possuem características únicas devido ao confinamento quântico. As lectinas são proteínas que possuem domínio de reconhecimento de carboidratos. São capazes de detectarem diferenças, mesmo que sutis, em estruturas de carboidratos presentes na superfície de células e em tecidos, podendo assim ser ferramentas na Glicobiologia. O objetivo desse trabalho foi compilar informações sobre técnicas de conjugações QDs-Lectinas e como esses nanosistemas podem auxiliar na investigação de carboidratos presentes em estruturas fúngicas. A coleta de dados foi realizada nas bases de dados SciElo, ScienceDirect e PubMed. Foi possível observar a marcação de estruturas como parede fungica e biofilme devido a interação QDs-Lectinas em glicanos específico além da distribuição desses carboidratos. Os complexos de nanosistemas mostram-se com bastante seletividade possibilitando a ampliação das investigação glicanas em fungos.*

Palavras-Chave: pontos quânticos, lectinas, glicobiologia, fungos.

ABSTRACT - *Quantum dots (QDs) are fluorescent semiconductors nanocrystals that have unique characteristics due to quantum confinement. Lectins are proteins that have a carbohydrate recognition domain. They are able to detect differences, even if subtle, in carbohydrate structures present on the surface of cells and tissues, thus being able to be tools in Glycobiology. The objective of this work was to compile information about QDs-Lectin conjugation techniques and how these nanosystems can assist in the investigation of carbohydrates present in fungal structures. Data collection was performed in the SciElo, ScienceDirect and PubMed databases. It is possible to observe a strong interaction of the conjugates with the respective affinity carbohydrates showing their distribution in addition to composition in structures such as biofilm cell wall. It was possible to observe the marking of structures such as fungal wall and biofilm due to QDs-Lectins interaction in specific glycans in addition to the distribution of these carbohydrates. The nanosystems complexes show a high degree of selectivity, enabling the expansion of glycans in fungi.*



Keywords: quantum dots, lectins, glycobiology, fungi.

1. INTRODUÇÃO

Os nanomateriais possuem características únicas devido ao confinamento quântico, tais como efeito de superfície, efeito de tamanho pequeno, efeito de tamanho quântico e macroscópico e efeito de tunelamento quântico, favorecendo excelentes características ópticas, elétricas e compatibilidade biológica (YAO; ZHU, 2015; MARIA-HORMIGOS et al., 2016; YAO et al., 2018). Pontos quânticos (*quantum dots*, QDs) são nanocristais semicondutores, com diâmetro médio de 2 nm. São encontrados principalmente como composições binárias de materiais semicondutores. Comparados a alguns corantes e pigmentos convencionalmente utilizados na marcação de estruturas, os QDs apresentam largo aspecto de absorção e estreito espectro de emissão, são fotoestáveis, e possuem uma superfície passível de conjugação com diversas estruturas como fármacos, outras nanopartículas, proteínas, lipídeos e carboidratos (FONTES et al., 2012; BILAN et al., 2015; CUNHA et al., 2018b).

Carboidratos são moléculas nas mais diversas estruturas biológicas, desde células eucarióticas quanto procarióticas, desempenhando funções distintas. Os açúcares podem ser encontrados na forma de polissacarídeos ou glicoconjugados presentes na superfície de células, e assim, participam de processos desde estrutura, modulação, armazenamento, comunicação, diferenciação, proliferação e adesão celular, entre outros (VARKI, 2017; PURCELL; GODULA, 2019; OLIVEIRA et al., 2020b). Alguns processos fisiopatológicos estão diretamente envolvidos com expressões e modificações de glicanos, como é o caso de glicosilações proteicas aberrantes ou desreguladas, eventos bem estabelecidos, por exemplo, no processo de oncogênese e progressão do câncer (ADAMCZYK; THARMALINGAM; RUDD, 2012; TUCCILLO et al., 2014).

Lectinas são proteínas que se ligam a carboidratos, sendo amplamente encontradas na natureza, incluindo microrganismos, plantas e animais. Nas plantas, essas proteínas têm sido descritas em folhas, entrecascas, raízes, rizomas, bulbos, vagens, sementes, frutos e flores. A ligação dessas proteínas a glicoconjugados presentes em superfícies celulares resulta em uma gama de propriedades biológicas (DIAS et al., 2015; PROCÓPIO et al., 2017; SANTOS et al., 2020). As lectinas são capazes de detectarem diferenças, mesmo que sutis, em estruturas de carboidratos presentes na superfície de células e em tecidos. Entre as diversas atividades realizadas e mediadas por lectinas, está a atividades antifúngica. Essas proteínas são capazes de alterações no crescimento, sobrevivência e formação de biofilme por fungos patogênicos, através de ligações a glicanos específicos presentes na parede fúngicas (SILVA et al., 2016; SILVA et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2020a).

A maioria dos fatores de virulência fúngica estão localizados na periferia celular ou no espaço extracelular (YONEDA; DOERING, 2006; PANEPINTO et al., 2009). O conhecimento dos componentes da parede celular bem como de outros fatores de resistência são fundamentais para a compreensão da patogênese (XIMENES et al., 2015), sendo esta composta de polissacarídeos e proteínas, além de lipídios e pigmentos (GOW et al., 2017). Além disso, a produção de biofilme aumenta a resistência aos mecanismos imunológicos do hospedeiro e à terapia antifúngica (RATHORE et al., 2020).

O objetivo desse trabalho é conhecer técnicas de conjugações QDs-Lectinas e como esses nanosistemas podem auxiliar na investigação de carboidratos presentes em estruturas de células fúngicas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

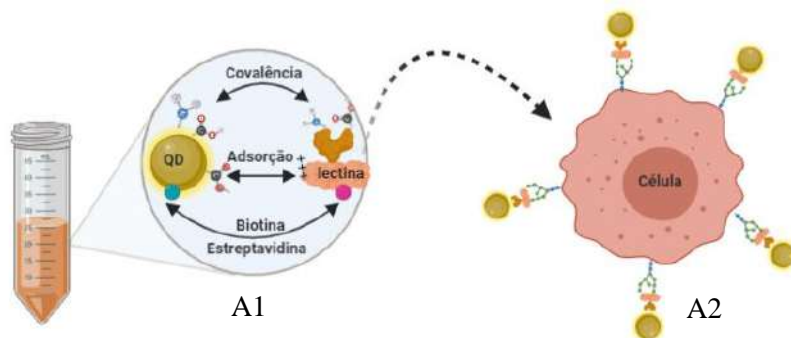
O trabalho utilizou abordagem qualitativa, com enfoque bibliográfico e descritivo, com o objetivo de reunir os dados publicados sobre o assunto abordado. A busca da literatura disponível eletronicamente foi realizada nas bases de dados PubMed, SciElo e ScienceDirect. Os descritores usados para a pesquisa foram: Quantum dots, fungal virulence factors, wall cell. Como critério de seleção, foram coletados trabalhos originais de revisões pertinentes ao tema (QDs-Lectin na investigação glicobiológica de fungos) e, como exclusão, trabalhos que não se encaixavam a temática QDs-Lectin. Utilizamos artigos publicados nos últimos 8 anos. Um total de 26 referências foram analisadas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A síntese desses coloides (QDs) para fins biológicos é geralmente realizada pela formação controlada de nanopartículas em meios hidrofóbicos ou hidrofílicos. A estratégia comum é a mistura rápida de soluções precursoras (fontes de calcogeneto, cátions metálicos e agentes estabilizadores), seguida de agitação a temperatura controlada (acima de 200 °C para meios não polares e cerca de 80 °C para procedimentos hidrofílicos) em atmosfera inerte. A síntese em meio aquoso apresenta uma menor toxicidade à partícula (FONTES et al., 2012; KARAKOTI et al., 2015).

A incorporação de uma biomolécula em QDs vai depender dos grupos reativos presentes na superfície da partícula além das características da biomolécula. As estratégias mais usadas para conjugação QDs-lectinas são por adsorção (forças eletrostáticas), covalência (interações por grupos funcionais), t à biotina (ligação biotina-estreptavidina) (CUNHA et al., 2018b).

Figura 1: Estratégias de conjugação de pontos quânticos com lectinas. A1, ligação por covalência (interação por compartilhamento eletrônico (elétrons) entre grupos funcionais, ex: NH₂-COOH); ligação por adsorção (interações eletrostáticas, ex: por carga); ligação entre grupos biotina-estreptavidina. A2, Complexo QDs-Lectina ligando em glicanos específicos na célula.



Fonte: Autor

Cunha et al. (2018a) demonstraram que o conjugado CdTe-Cramoll é uma ferramenta útil para investigações glicobiológicas. A Cramoll é uma lectina isolada de sementes da *Cratylia mollis* (planta encontrada no semiárido nordestino brasileiro), com especificidade para manose/glicose (CORREIA; COELHO, 1995). Na tentativa de verificação das melhores condições, a conjugação foi testada em diferentes valores de pH e quanto à forma de conjugação (adsorção e covalência), sendo selecionada a conjugação por adsorção em pH 7. Os QDs-Cramoll apresentaram cor vermelha com pico de emissão em 660nm e diâmetro médio de 3,6 nm. O nanossistema foi aplicado



em *Candida albicans* com o intuito de avaliação de sua parede celular, onde foi possível observar a presença fortemente desses carboidratos. Recentemente, Oliveira et al. (2020a) avaliaram o perfil de manose/glicose em outras espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis sensu stricto*) utilizando um sonda CdTe-Cramoll, na cor verde com pico de emissão em 526 nm e diâmetro médio de 2,8 nm. Os dados obtidos mostraram que a *C. glabrata* tinha o menor tamanho entre as espécies analisadas, *C. parapsilosis* possuía uma população com morfologia distinta apresentando blastoconídios em forma de bastonete e a quantidade de glicose/manose exposta é maior em *C. parapsilosis*.

A lectina extraída de *Canavalia ensiformis* (ConA), também foi empregada para verificação do perfil de α -D-manose/ α -D-glicose em *Candida albicans*. Os conjugados CdTe-ConA possuíram um pico de emissão em 600nm, com diâmetro de partícula médio de 3 nm, e cor vermelha. A conjugação foi através de adsorção em pH 8,0. Os resultados mostraram que mais de 96% das células foram marcadas pelo conjugado. Picos diferentes apresentados na citometria de fluxo indicam níveis de populações diferentes o que foi confirmado na microscopia de fluorescência, mostram uma heterogeneidade na população: leveduras, formação de tubos germinativos e hifas. Por meio de uma forte fluorescência distribuída na parede fúngica, foi possível observar a distribuição dos carboidratos manose e glicose (TENÓRIO et al., 2015).

A produção de biofilme aumenta a resistência aos mecanismos imunológicos do hospedeiro e na terapia antifúngica sendo um dos maiores fatores de virulência fúngica (RATHORE et al. 2020). Ainda com relação ao trabalho anterior, distribuição de manose/glicose também foi avaliada pelo conjugado QDs-ConA no biofilme produzido pela *Candida albicans* e, como resultado, foi detectada uma rica composição desses carboidratos. As células de levedura e as hifas exibiram uma forte emissão demonstrando uma forte interação, além disso, foi possível observar menor intensidade de fluorescência em estruturas amorfas em torno de populações celulares densas, sugerindo a presença de também ligado aos carboidratos presentes na matriz extracelular.

4. CONCLUSÃO

Nanosistemas baseados em QDs-Lectinas apresentam uma alta sensibilidade de detecção de carboidratos em estruturas fúngicas, permitindo avaliar a distribuição dessas moléculas.

5. REFERÊNCIAS

- ADAMCZYK, B.; THARMALINGAM, T.; RUDD, P. M. Glycans as cancer biomarkers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1820, n. 9, p. 1347–1353, set. 2012.
- BILAN, R. et al. Quantum Dot Surface Chemistry and Functionalization for Cell Targeting and Imaging. **Bioconjugate Chemistry**, v. 26, n. 4, p. 609–624, 15 abr. 2015.
- CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* mart. (Camaratu Bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 55, n. 3, p. 261–273, dez. 1995.
- CUNHA, C. R. A. et al. Quantum dot–Cramoll lectin as novel conjugates to glycobiology. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 178, p. 85–91, jan. 2018a.
- CUNHA, C. R. A. et al. Biomedical applications of glyconanoparticles based on quantum dots. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1862, n. 3, p. 427–439, mar. 2018b.
- SILVA, P. M. et al. PgTeL, the lectin found in *Punica granatum* juice, is an antifungal agent against *Candida albicans* and *Candida krusei*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 391–400, mar. 2018.



- BRITO XIMENES, P. et al. Targeting the *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* cell wall using lectins: study of the carbohydrate-binding domain. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 20, n. 3, p. 3776–82, 25 fev. 2015.
- DIAS, R. DE O. et al. Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 20, n. 1, p. 519–41, 5 jan. 2015.
- DOS SANTOS, A. J. C. A. et al. *Schinus terebinthifolia* leaf lectin (SteLL) is an immunomodulatory agent by altering cytokine release by mice splenocytes. **3 Biotech**, v. 10, n. 4, p. 144, 2 abr. 2020.
- FONTES, A. et al. Quantum Dots in Biomedical Research. In: **Biomedical Engineering - Technical Applications in Medicine**. [s.l.] InTech, 2012.
- GOW, N. A. R., Latge, J. P., and Munro, C. A. The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. **Microbiol. Spectr.** 5:FUNK-0035-2016. doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016
- KARAKOTI, A. S. et al. Surface functionalization of quantum dots for biological applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 215, p. 28–45, jan. 2015.
- MARIA-HORMIGOS, R. et al. Carbon Allotrope Nanomaterials Based Catalytic Micromotors. **Chemistry of Materials**, v. 28, n. 24, p. 8962–8970, 27 dez. 2016.
- OLIVEIRA, W. F. et al. Evaluating glucose and mannose profiles in *Candida* species using quantum dots conjugated with Cramoll lectin as fluorescent nanoprobe. **Microbiological Research**, v. 230, p. 126330, jan. 2020a.
- OLIVEIRA, W. F. et al. *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) conjugated with quantum dots as fluorescent nanoprobe for biological studies: application to red blood cells. **Methods and Applications in Fluorescence**, v. 8, n. 3, p. 035009, 7 jul. 2020b.
- PANEPINTO, J. et al. Sec6-dependent sorting of fungal extracellular exosomes and laccase of *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 1165–1176, mar. 2009.
- PROCÓPIO, T. F. et al. CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 419–429, maio 2017.
- PURCELL, S. C.; GODULA, K. Synthetic glycoscapes: addressing the structural and functional complexity of the glycocalyx. **Interface Focus**, v. 9, n. 2, p. 20180080, 6 abr. 2019.
- RATHORE, S. S. et al. Anti-Cryptococcal activity of a furanone derivative–antibiofilm and opsonophagocytic potential. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 30, n. 2, p. 100924, jun. 2020.
- SILVA, P. M. et al. The juicy sarcotesta of *Punica granatum* contains a lectin that affects growth, survival as well as adherence and invasive capacities of human pathogenic bacteria. **Journal of Functional Foods**, v. 27, p. 695–702, dez. 2016.
- TENÓRIO, D. P. L. A. et al. CdTe quantum dots conjugated to concanavalin A as potential fluorescent molecular probes for saccharides detection in *Candida albicans*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 142, p. 237–243, jan. 2015.
- TUCCILLO, F. M. et al. Aberrant Glycosylation as Biomarker for Cancer: Focus on CD43. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–13, 2014.
- VARKI, A. Biological roles of glycans. **Glycobiology**, v. 27, n. 1, p. 3–49, jan. 2017.
- YAO, J. et al. Biochemistry and biomedicine of quantum dots: from biodetection to bioimaging, drug discovery, diagnostics, and therapy. **Acta Biomaterialia**, v. 74, p. 36–55, jul. 2018.
- YAO, S.; ZHU, Y. Nanomaterial-Enabled Stretchable Conductors: Strategies, Materials and Devices. **Advanced Materials**, v. 27, n. 9, p. 1480–1511, mar. 2015.
- YONEDA, A.; DOERING, T. L. A Eukaryotic Capsular Polysaccharide Is Synthesized Intracellularly and Secreted via Exocytosis. **Molecular Biology of the Cell**, v. 17, n. 12, p. 5131–5140, dez. 2006.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

NANOFIBRAS POLIMÉRICAS ELETROFIADAS CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA APLICAÇÃO COMO ELETRODOS PARA BIOCENSORES

D. M. BISPO¹, A. G. SILVA JUNIOR^{1,2},
M.D.L. OLIVEIRA^{1,2}, C. A. S. ANDRADE^{1,2}

¹ Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE, Brasil.

E-mail para contato: monteirodanielb@gmail.com

RESUMO – A doença do coronavírus 2019 (COVID-19) é uma doença altamente contagiosa, cujo início da propagação ocorreu na China e em poucos meses alcançou todos os continentes. O crescente e alarmante número de casos fez com que métodos de diagnóstico rápido fossem procurados, visando a detecção e imediato tratamento do paciente infectado. Alternativas inovadoras são requisitadas visando a rápida detecção do COVID-19 por abordagens que sejam sensíveis, rápida análise e baixo-custo. Biossensores eletroquímicos são uma opção viável com crescente interesse global por serem dispositivos simples, efetivos, de elevada sensibilidade e de custo reduzido. Filmes de nanofibras eletrofiadas são caracterizados pela sua escala manométrica e atribuições físico-químicas úteis que os classificam como promissores substratos de montagem de plataformas biossensoras eletroquímicas para futura detecção de doenças como o COVID-19. O presente trabalho desenvolveu nanofibras com álcool polivinílico (PVA), alginato de sódio e nanopartículas de ouro (AuNPs), onde foram submetidas a um processo de reticulação e mantiveram a estabilidade após contato com soluções. As análises eletroquímicas demonstraram uma resposta voltamétrica e impedimétrica similar às observadas em eletrodos de trabalho convencionais utilizados como superfícies de montagem de biossensores. As nanofibras de PVA+alginato+AuNPs se destacam como uma alternativa promissora de eletrodos para biossensores eletroquímicos.

Palavras-chave: Nanofibras; eletrofição; nanopartículas de ouro; eletroquímica.

ABSTRACT - Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is a highly contagious disease whose spread started in China and in just a few months reached all continents. The growing and alarming number of cases required rapid diagnostic methods, aiming at the detection and immediate treatment of the infected. Innovative alternatives are requested for the quick detection of COVID-19 by sensitive approaches with quick analysis and low cost. Electrochemical biosensors are a



viable tool with growing global interest as they are simple, effective, highly sensitive and inexpensive devices. Electrospun nanofiber films are characterized by their nanometric scale and useful physicochemical features that classify them as promising substrates for the assembling of electrochemical biosensor platforms for future detection of diseases such as COVID-19. The present work developed nanofibers with polyvinyl alcohol (PVA), sodium alginate and gold nanoparticles (AuNPs), where they were subjected to a crosslinking process and maintained stability after contact with solutions. Electrochemical analyzes showed a voltammetric and impedimetric response similar to those observed in conventional working electrodes used as surfaces for the assembly of biosensors. PVA+alginate+AuNPs nanofibers stand out as a promising alternative of electrodes for electrochemical biosensors.

Keywords: Nanofibers; electrospinning; gold nanoparticles; electrochemistry.

1. INTRODUÇÃO

No último ano o mundo recebeu a notícia de uma nova doença infecciosa associada à complicações no sistema respiratório. Com os primeiros casos reportados em Wuhan, na província de Hubei, China, o novo coronavírus foi identificado no fluido broncoalveolar de um paciente, onde subsequentemente recebeu o nome de coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2). Como vírus respiratório, a transmissão rapidamente alcançou níveis globais, resultando em sua classificação como pandemia pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (SEO et al., 2020). Um dos principais desafios para conter a rápida disseminação do vírus, bem como seguir com os cuidados clínicos de maneira imediata é a identificação dos casos assintomáticos, onde um estudo indica que cerca de 18% dos casos, o paciente não apresenta sintomas clínicos, frequentemente similares ao da gripe sazonal (Influenza) (MIZUMOTO et al., 2020).

Uma vez que a doença do coronavírus 2019 (COVID-19) apresenta essas características de gripe, além dos casos assintomáticos, a identificação rápida e efetiva de pacientes infectados no estágio inicial da doença se torna um fator determinante na redução do número de casos para evitar quarentenas de indivíduos negativos e liberação de indivíduos que testariam positivo para o COVID-19. Tal iniciativa também auxilia na intervenção adequada de pacientes no grupo de risco (imunossuprimidos, crianças, neonatos, idosos, etc.), a fim de evitar complicações médicas (CARTER et al., 2020).

O método considerado padrão ouro na identificação do SARS-CoV-2 é a reação em cadeia de polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR), onde, em sua maioria, as amostras clínicas utilizadas são de material da oro ou nasofaringe. Basicamente, a técnica consiste na aplicação de *primers* de DNA designados especificamente para reconhecer sequências complementares do RNA viral para gerar sequências de DNA complementar (cDNA) que serão amplificadas e posteriormente identificado via sinal elétrico ou fluorescente (PARK et al., 2020). Apesar da notável sensibilidade, para a realização de técnicas moleculares como o RT-PCR são necessárias várias horas, principalmente na etapa de preparação do RNA viral, etapa que frequentemente afeta a acurácia do diagnóstico. Em adição, análises moleculares são dispendiosas, principalmente no que diz respeito a equipamentos e reagentes utilizados, resultando em alto custo para o consumidor (SEO et al., 2020). Diante do exposto, abordagens inovadoras são consideradas uma nova fronteira a ser vencida para o diagnóstico não apenas da COVID-19, mas também de já conhecidas ameaças microbiológicas, com foco em sensibilidade, especificidade, baixo custo e facilidade de uso.



Biossensores são uma classe de biodispositivos analíticos em constante crescimento na área biomédica/diagnóstica por unirem características como simples preparo de plataformas sensoras, elevada sensibilidade, integração de múltiplos elementos de biorreconhecimento para uma infinidade de analitos-alvo e possibilidade de miniaturização, favorecendo portabilidade. Em adição, a nanotecnologia associada aos biossensores expandem a sua aplicação para a área médica, biotecnológica, diagnóstico clínico, farmacêutica, dentre outras (PARMIN et al., 2019).

Um típico biossensor compreende um elemento sensor biológico (enzimas, fragmentos de DNA e RNA, peptídeos, anticorpos, peptídeos, etc.), utilizado para a interação direta ao analito-alvo, um transdutor, cujo papel reside em converter o evento da detecção do analito em um sinal elétrico proporcional à concentração do mesmo e um sistema de processamento de sinal. Dentre os principais transdutores, se destacam a abordagem eletroquímica, óptica, piezoelétrica e calorimétrica (PERUMAL; HASHIM, 2014).

O método eletroquímico é um dos mais requisitados pela simplicidade e efetividade. Frequentemente utilizando um sistema compreendendo três eletrodos (eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e contra-eletrodo), biossensores eletroquímicos se destacam diante dos demais por apresentar uma variedade de eletrodos de trabalho, local onde a superfície será modificada para montagem da plataforma biossensora direcionada à detecção de determinado analito. Ouro, prata, carbono, carbono vítreo, platina, dentre outros exemplos são os mais utilizados, mas novas opções vêm sendo criadas, objetivando a facilidade de integrar a sistemas eletrônicos portáteis de uso simples como o celular (HAMMOND et al., 2016), onde uma dessas alternativas é relacionada ao uso de nanofibras eletrofiadas.

A eletrofição (do inglês *electrospinning*) é uma técnica utilizada para a produção de nanofibras poliméricas, cuja aplicação varia da área médica (curativos, cultura de células, etc.), farmacêutica (liberação de fármacos) e biotecnológica, onde a área diagnóstica está em ascensão. Com diâmetro variando entre 50-500 nm, sua estrutura apresenta elevada porosidade e ampla média superfície/volume, características essenciais para a impregnação de nanopartículas metálicas e biomoléculas, permitindo sua utilização como substratos de eletrodos em biossensores (LIU et al., 2020).

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de nanofibras eletrofiadas utilizando polímeros naturais e sintéticos e nanopartículas metálicas como futuros eletrodos para montagens de sistemas biossensores eletroquímicos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Álcool polivinílico (PVA) foi obtido pela Dinâmica (Brasil). Cloreto de ouro III trihidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) e alginato de sódio foram adquiridos pela Sigma-Aldrich (EUA). O ferri ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) e ferrocianeto de potássio ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) foram obtidos pela VETEC (Brasil). Água ultrapura foi utilizada em todas etapas experimentais, obtida pelo sistema de purificação Milli-Q (Billerica, EUA).

Parâmetros de eletrofição

Inicialmente, para total dissolução, o PVA foi diluído em água deionizada e permaneceu em agitação magnética por 2h ($\sim 70^\circ\text{C}$). O alginato de sódio foi preparado em temperatura

ambiente. *Blends* poliméricos de PVA e alginato foram preparados em determinadas concentrações, seguido de banho ultrassônico para remoção de bolhas. O $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ é adicionado à solução PVA+alginato, permanecendo em agitação magnética constante e temperatura de 70°C . Após cerca de 1h, a solução antes apresentando coloração amarelada obterá coloração azul-roxeada, indicando a obtenção de nanopartículas de ouro (AuNPs) no *blend* polimérico a ser eletrofiado.

Um sistema de eletrofição é constituído basicamente por uma fonte de alta-tensão, placa coletora aterrada, bomba de infusão e uma seringa com agulha de aço inoxidável. O *blend* PVA+alginato+AuNPs foi adicionado a uma seringa com capacidade de 25 mL, onde na saída foi inserida uma agulha com diâmetro interno de 0,5 mm. A voltagem aplicada foi de 24 kV e taxa de infusão de $0,75 \mu\text{L}/\text{min}$. A placa coletora foi revestida por folha de alumínio e uma distância de 16cm foi colocada entre a ponta da agulha e a placa coletora foi estabelecida. A eletrofição foi realizada em temperatura ambiente. A duração do processo de eletrofição foi de 8h. Os filmes nanofibrosos passaram por um processo de reticulação (do inglês *crosslinking*), visando a estabilização dos mesmos utilizando o método de solução em acetona.

Análises eletroquímicas

Os dados eletroquímicos foram realizados por meio de um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 128N (Ecochemie, Holanda) interfaceado pelo software NOVA 1.11. As medidas de voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foram conduzidas em uma célula eletroquímica com sistema de 3 eletrodos imersos em 10 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1:1) preparado em tampão fosfato (PBS, pH 7.4). Eletrodos de platina foi usado como contra-eletródo e Ag/AgCl (saturado com KCl 3M) foi usado como eletródo de referência. O filme de nanofibras eletrofiadas foi utilizado como eletródo de trabalho.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Fig. 1a mostra a filme de nanofibras eletrofiadas na placa coletora, enquanto que a Fig. 1b mostra o filme removido da placa. A integração de AuNPs ao sistema nanofibroso teve a finalidade de aprimorar a cinética de transferência de elétrons entre a nanofibras (sendo utilizada como eletródo de trabalho) e a solução eletrolítica usada como par redox, resultando em maior sensibilidade (SAPOUNTZI et al., 2017).

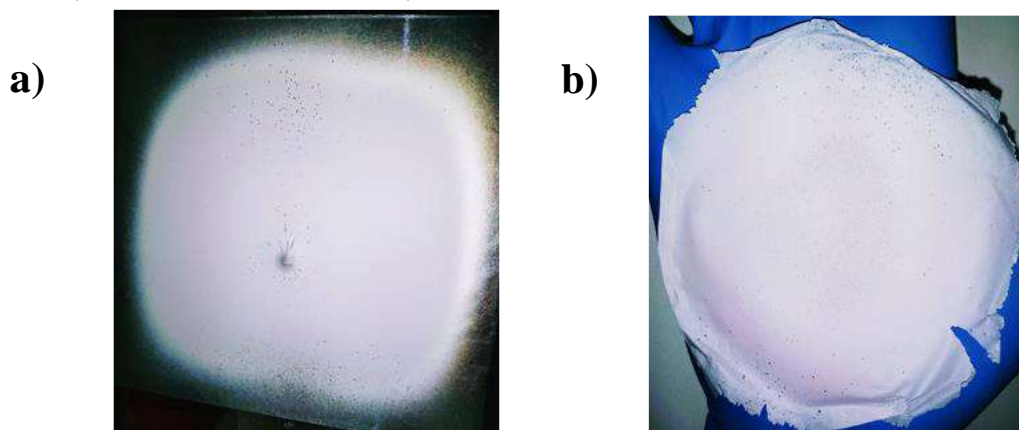


Figura 1 – Filme de nanofibras eletrofiadas na placa coletora (a) e após remoção (b).

A Fig. 2 mostra as nanofibras PVA+alginato+AuNPs antes e após o processo de reticulação, visando a estabilização dos filmes eletrofiados após entrar em contato com água, tampão, fluidos biológicos, etc. O PVA é um polímero altamente hidrofílico devido à presença abundante de grupamentos hidroxila em sua estrutura, o que faz com que materiais sintetizados utilizando o mesmo como componente principal, se desmanchem em solventes, cujo tempo de dissolução pode variar dependendo da espessura do filme nanofibroso e de polímeros extras adicionados à composição (SUSANTO et al., 2016).

Como observado na Fig. 2 na placa à direita, as nanofibras preparadas mantiveram a integridade estrutural mesmo imersas em água deionizada, destacando-as como substratos úteis para a funcionalização do mesmo para montagem de plataformas biossensoras eletroquímicas. Após a reticulação, anéis acetal são formados entre os grupos hidroxila do PVA, resultando em nanofibras flexíveis e densamente porosas, onde após absorverem solventes, podem ser secas que obterão o mesmo aspecto de antes da reticulação (CAO et al., 2010).



Figura 2 – Nanofibras eletrofiadas antes (esquerda) e após (direita) o processo de reticulação.

Na Fig.3a-b podemos observar a análise eletroquímicas dos filmes nanofibrosos por meio da VC e EIE, respectivamente. Na Fig.3a o voltamograma cíclico mostra picos catódicos e anódicos bem definidos. Na Fig. 3b o diagrama de Nyquist mostra um espectro impedimétrico com semicírculo seguido por elevada área de difusão, indicando a resistência à transferência de carga (R_{CT}) das nanofibras e processo difusional relativo à resistência da solução eletrolítica (R_s) utilizada como par redox (PAIMARD et al., 2020).

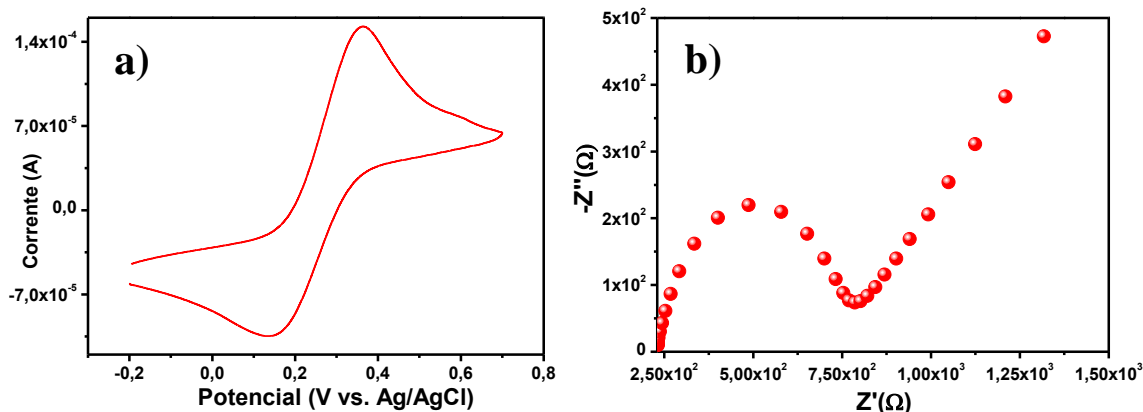


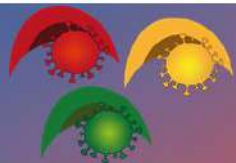
Figura 3 – Voltamograma cíclico (a) e diagrama de Nyquist (b) de filme de nanofibras eletrofiadas.

4. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados indicam a aplicabilidade dos filmes de nanofibras sintetizados como superfícies adequadas para a montagem de plataformas biossensoras eletroquímicas, demonstrando estabilidade em solventes e resposta eletroquímica similar aos de eletrodos de trabalho convencionais como os com superfície de ouro e carbono, destacando a estratégia proposta como uma alternativa promissora e de baixo custo para o mercado biodiagnóstico.

5. REFERÊNCIAS

- CAO, S. G. et al. Stabilization of electrospun poly(Vinyl Alcohol) nanofibrous mats in aqueous solutions. **Chinese Journal of Polymer Science (English Edition)**, v. 28, n. 5, p. 781–788, 2010.
- CARTER, L. J. et al. Assay Techniques and Test Development for COVID-19 Diagnosis. **ACS central science**, v. 6, p. 591–605, 2020.
- HAMMOND, J. L. et al. Electrochemical biosensors and nanobiosensors. **Essays In Biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 69–80, 2016.
- LIU, Y. et al. A Review on Recent Advances in Application of Electrospun Nanofiber Materials as Biosensors. **Current Opinion in Biomedical Engineering**, v. 13, p. 174–189, 2020.
- MIZUMOTO, K. et al. Estimating the asymptomatic proportion of coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases on board the Diamond Princess cruise ship, Yokohama, Japan, 2020. **Eurosurveillance**, v. 25, n. 10, p. 1–5, 2020.
- PAIMARD, G. et al. An Impedimetric Immunosensor modified with electrospun core-shell nanofibers for determination of the carcinoma embryonic antigen. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 311, n. February, p. 127928, 2020.
- PARK, M. et al. Optimization of primer sets and detection protocols for SARS-CoV-2 of coronavirus disease 2019 (COVID-19) using PCR and real-time PCR. **Experimental & Molecular Medicine**, p. 963–977, 2020.
- PARMIN, N. A. et al. Biosensor Recognizes the Receptor Molecules. In: **Nanobiosensors for Biomolecular Targeting**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. p. 195–210.
- PERUMAL, V.; HASHIM, U. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications.



Journal of Applied Biomedicine, v. 12, n. 1, p. 1–15, 2014.

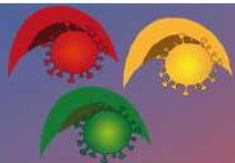
SAPOUNTZI, E. et al. Gold nanoparticles assembly on electrospun poly(vinyl alcohol)/poly(ethyleneimine)/glucose oxidase nanofibers for ultrasensitive electrochemical glucose biosensing. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 238, p. 392–401, 2017.

SEO, G. et al. Rapid Detection of COVID-19 Causative Virus (SARS-CoV-2) in Human Nasopharyngeal Swab Specimens Using Field-Effect Transistor-Based Biosensor. **ACS nano**, 2020.

SUSANTO, H. et al. Impact of post-treatment on the characteristics of electrospun poly (vinyl alcohol)/chitosan nanofibers. **AIP Conference Proceedings**, v. 1725, 2016.

6. AGRADECIMENTOS

Agradeço ao prof. César Andrade do Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados pela oportunidade e pela bolsa de estudos no Mestrado.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

ABORDAGENS NA APLICAÇÃO DA VITAMINA C INTRODUZIDA EM PLATAFORMAS DE ENTREGA PARA FORTIFICAÇÃO DE ANDAIMES UTILIZADOS NA REPARAÇÃO TECIDUAL

E. O. SILVA¹, M. E. SILVA², A. L. M. D. SOUSA¹, P.J. ROLIM NETO¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos

² Faculdade Santíssima Trindade (FAST)

E-mail para contato: meduardapbf@gmail.com

RESUMO – *Andaimos sintéticos funcionam como enxertos destinados para a substituição e remodelamento de vários tipos de tecidos humanos. Esses enxertos sintéticos funcionam como portadores de células e de várias moléculas que atuam como adjuvante na reparação tecidual. A natureza química do material escolhido para a produção do andaime depende de sua compatibilidade do tecido alvo da reposição e reparação pelo enxerto. A vitamina C (Vit C) é um ótimo bioativo candidato a ser incorporada nesses andaimos devido a seu amplo espectro de atividades, como a sua participação na estimulação da síntese do colágeno. Contudo, o uso de andaimos como uma abordagem para a entrega de moléculas bioativas é limitado pela sua dificuldade em promover uma liberação sustentada do composto a partir de sua estrutura. Diante disso, algumas pesquisas demonstram que a inserção prévia da Vit C em plataformas de entrega, como nanopartículas, antes da sua incorporação nos andaimos sintéticos biomiméticos, podem solucionar a limitação em termos de cinética de liberação da vitamina bioativa a partir do enxerto sintético, atuando para manter prolongados níveis terapêuticos da Vit C e para a otimização funcional da reparação de vários tecidos.*

Palavras-chave: *Engenharia de tecidos, andaimos biomiméticos, abordagens de entrega, vitamina C.*

ABSTRACT - *Synthetic scaffolding works as grafts intended for the replacement and remodeling of various types of tissues. These synthetic grafts function as carriers of cells and various molecules that act as an adjuvant in tissue repair. The chemical nature of the chosen material for the production of the scaffold depends on its compatibility with the tissue targeted for replacement and repair by the graft. Vitamin C (Vit C) is an excellent bioactive candidate to be incorporated in these scaffolds due to its broad spectrum of activities, such as its participation in stimulating collagen synthesis. However, the use of scaffolding as an approach to the delivery of bioactive*



molecules is limited by its difficulty in promoting sustained release of the compound from its structure. Therefore, some research shows that the previous insertion of Vit C in delivery platforms, such as nanoparticles, before its incorporation in synthetic biomimetic scaffolds. It can solve the limitation in terms of kinetics of release of the bioactive vitamin from the synthetic graft, acting to maintain prolonged therapeutic levels of Vit C and for the functional optimization of the repair of various tissues.

Keywords: *Tissue engineering, biomimetic scaffolding, delivery approaches, vitamin C.*

1. INTRODUÇÃO

Na grande área de engenharia de tecidos, andaimos que funcionam como enxertos sintéticos tem ocupado espaços importantes na área biomédica para a substituição temporária e remodelagem de tecidos humanos danificados. Progressivamente, o uso de enxertos sintéticos que funcionam mimetizando matrizes extracelulares teciduais, conforme seus objetivos, se mostraram alternativas mais viáveis que o uso de transplantes de tecidos, devido a limitações de disponibilidade dos enxertos in natura, risco de transmissão de infecção e de rejeição imunológica (O'Brien, 2011; Moaddab et al., 2018).

Vários materiais de natureza orgânica ou inorgânica são usados para a produção de andaimos que funcionam como enxertos na reparação tecidual. As características ideais dos materiais usados na formação dos andaimos são: adequada arquitetura com propriedades mecânicas excelentes com local destinado à sua inserção na forma de enxerto; biocompatibilidade; e biodegradabilidade (Bose et al., 2019; O'Brien, 2011). Frequentemente, para a otimização de seus objetivos na reparação tecidual, os andaimos funcionam como portadores de células, fatores de crescimento celular e diversas moléculas bioativas que atuam como adjuvantes. Os tipos de células e demais adjuvantes a serem inseridos nos enxertos sintéticos variam com o alvo anatômico a ser tratado (Bose et al., 2019; Wu et al., 2014).

A vitamina C (Vit C) é um ótimo bioativo candidata a ser incorporada nesses andaimos devido a seu amplo espectro de atividades interessantes em termos de reparação de tecidos, como a sua participação na estimulação da biossíntese do colágeno para a formação da matriz extracelular e por comprovadamente atuar na proliferação e diferenciação de vários tipos de células do organismo humano. Sendo assim, é legítimo introduzir a Vit C nos andaimos sintéticos para que o seu efeito na reparação tecidual seja otimizado (DePhillipo et al., 2018; Manguir et al., 2016).

Contudo, o uso de andaimos teciduais como uma plataforma de entrega de fármacos, possuem limitações principalmente porque na maioria das vezes esses enxertos não conseguem controlar a cinética de liberação do composto ativo de sua estrutura, ou seja, possuem sérias dificuldades em manter uma concentração controlada e sustentada do ativo em níveis terapêuticos eficazes e seguros (Bose et al., 2019). Diante disso, algumas pesquisas mostram o impacto positivo da inserção da Vit C em algumas plataformas de entrega antes da sua inserção nos andaimos sintéticos, visando um maior controle de sua liberação a partir do enxerto, além da justificativa de seu efeito adjuvante na reparação tecidual.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A construção do referido trabalho, foi embasada, a partir de um levantamento de dados, realizado em sites periódicos, incluindo como base o Science Direct, PubMed e Scielo, no período



de 2010 a 2020. A pesquisa por palavras em títulos e resumos foi realizada utilizando as seguintes entradas: engenharia de tecidos, andaimes, reparação tecidual, vitamina C e enxertos sintéticos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um mínimo de semelhança e compatibilidade físico-química deve ser garantida entre o material do andaime e o local anatômico alvo do enxerto, principalmente porque a função do andaime é substituir e induzir a reparação do tecido danificado (Manguir et al., 2016; O'Brien, 2011).

Por exemplo, visando a reparação óssea, um estudo mostrou a produção de andaimes usando o biomaterial fosfato β -tricálcio com posterior revestimento com o polímero policaprolactona (PCL) como uma abordagem para a liberação controlada da Vit C. O andaime produzido com a cerâmica de fosfato de cálcio é completamente compatível com a estrutura óssea e possui propriedades osteoindutivas, justificando seu uso como como enxerto biomimético ósseo. Mas, para servir como sistema de liberação e entrega da Vit C, o andaime de fosfato de cálcio precisou ser revestido com PCL, que também tem potencial na reparação óssea, para que a cinética de liberação da ViT fosse controlada. De fato, após o revestimento, os andaimes conseguiram liberar gradualmente a Vit C por até 60 dias. Na viabilidade celular *in vitro*, o andaime revestido fortificado com a vitamina C mostrou um sinergismo de ação osteoindutiva entre seus componentes, aumento a proliferação celular e sua diferenciação em osteoblastos, além de reduzir o aparecimento de tumor ósseo (Bose et al., 2019).

A inserção da vitamina C em plataformas de entrega como as nanopartículas, também podem trazer vantagens em termos de controle da cinética de liberação da vitamina a partir dos andaimes. Antes da incorporação em andaimes biomiméticos feitos de fibra de seda, Moaddab *et al.* (2018) introduziu a vitamina C em nanopartículas de carboximetilquitosana para alcançar uma regeneração óssea mais eficiente. O derivado da quitosana serviu tanto para a formação de nanopartículas como uma plataforma de liberação mais controlada da vitamina C, como adjuvante ativo na indução da remodelagem, proliferação celular, formação de matriz extracelular e cicatrização óssea, devido ao fato que a carboximetilquitosana apresente semelhanças com a composição óssea. Sendo assim, tanto a vitamina C quanto o derivado da quitosana contribuíram para a eficácia de osteoindução desempenhado pelo andaime na regeneração óssea.

Vários métodos físicos podem ser usados para a produção de andaimes biomiméticos, entre eles, o método da eletrofiação produz micro ou nanofibras poliméricas que podem ser aplicadas na formação de enxertos sintéticos teciduais para a cicatrização de feridas e a produção de plataformas para a liberação e entrega de moléculas bioativas (Ghafoor et al., 2018).

Na ilustração dessas aplicações para as fibras eletrofiadas, andaimes produzidos pela eletrofiação de uma emulsão contendo o polímero PLA (ácido polilático) foram produzidos para a liberação da Vit C e seu derivado (ascorbato-2-fosfato) visando a estimulação da produção de colágeno na reparação do assoalho pélvico de condições pós-cirúrgicas. A eletrofiação por emulsão foi utilizada por se tratar de um avanço na técnica original para a incorporação de substâncias hidrofílicas como a Vit C e seu sal derivado. A incorporação da Vit C e do ascorbato-2-fosfato resultou em malhas de microfibras mais resistentes quando comparadas às malhas do veículo de PLA sem as substâncias bioativas. As fibras conseguiram mostrar uma eficiência de encapsulação de quase 50% do conteúdo das duas moléculas ativas, contudo, promoveram taxas diferentes de liberação ao longo do tempo dessas mesmas moléculas. Houve a liberação de 77% do conteúdo de Vit C em duas horas chegando a 90 % no prazo de dez horas, ao passo que a



liberação do ascorbato foi de forma mais lenta, com 34% do seu conteúdo liberado em duas horas e 60% de maneira gradual em 14 dias. Tanto os andaimes fibrosos com Vit C quanto os andaimes com o ascorbato-2-fosfato estimularam a produção de fibroblastos e, conseqüentemente, de colágeno atingindo a um aumento de produção de colágeno de 60% em 7 dias e atingindo 100% de incremento de bioprodução em 14 dias quando comparados com andaimes fibrosos sem as biomoléculas ativas. Com isso, a própria malha polimérica fibrosa serviu como um biomaterial biodegradável de suporte mecânico enquanto libera o nutriente que estimula a reparação tecidual original (Manguir et al., 2016).

4. CONCLUSÃO

As pesquisas confirmam que a inteligente inserção da Vit C em plataformas de entrega antes da sua incorporação em andaimes biomiméticos, soluciona a limitação do enxerto sintético em promover uma liberação mais controlada e sustentada da vitamina bioativo de sua estrutura, mantendo níveis terapêuticos prolongados do adjuvante de reparação tecidual. Além disso, o andaime, o material usado para a formação da plataforma de entrega e a própria Vit C podem somar suas ações para um sinergismo, visando alcançar uma otimização funcional na remodelação de vários tecidos.

5. REFERÊNCIAS

- BOSE, S.; SARKAR, N.; VAHABZADEH, S. Sustained release of vitamin C from PCL coated TCP induces proliferation and differentiation of osteoblast cells and suppresses osteosarcoma cell growth. *Materials Science & Engineering C*, v. 105, p. 096-110, 2019.
- DEPHILLIPO, N. N.; AMAN, Z. S.; KENNEDY, M. I.; BEGLEY, J.P.; MOATSHE, G.; LAPRADE, R. F. Efficacy of Vitamin C Supplementation on Collagen Synthesis and Oxidative Stress After Musculoskeletal Injuries: A Systematic Review. *Orthop J Sports Med.*, v. 6(10), p. 1-9, 2018.
- GHAFOOR, B., ALEEM, A., NAJABAT ALI, M., MIR, M. Review of the fabrication techniques and applications of polymeric electrospun nanofibers for drug delivery systems. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 48, p. 82-87, 2018.
- MANGUIR, N., BULLOCK, A. J., ROMAN, S., OSMAN, N., CHAPPLE, C., MACNEIL, S. Production of ascorbic acid releasing biomaterials for pelvic floor repair Nas. *Acta Biomaterialia Journal*, v. 29, p. 188-197, 2016.
- MOADDAB, M.; NOURMOHAMMADI, J.; REZAYAN, A. H. Bioactive composite scaffolds of carboxymethyl chitosan-silk fibroin containing chitosan nanoparticles for sustained release of ascorbic acid. *European Polymer Journal*, v. 103, p. 40-50, 2018.
- O'BRIEN, F.J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, v. 14(3), p. 88-95, 2011.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO ÓLEO DE COPAÍBA NO NÚCLEO: ESTRATÉGIA PARA ENCAPSULAMENTO DE FÁRMACOS LIPOFÍLICOS

L.A FRANK¹, GAZZI R.P¹, ONZI G¹, P. DE ANDRADE MELLO¹, A. BUFFON¹
POHLMANN¹ A.R, S.S.GUTERRES¹

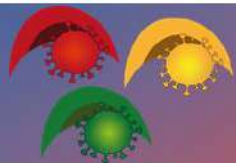
¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas;

E-mail para contato: luiza.frank@ufrgs.br

RESUMO – *O óleo de copaíba é amplamente conhecido na medicina popular por sua ação anti-inflamatória. Além disso, vários estudos têm indicado seu uso no tratamento de câncer de pele devido à sua atividade antitumoral direta. Portanto, o desenvolvimento de novas formulações que explorem o efeito antitumoral do óleo de copaíba associado a outros fármacos citotóxicos pode ser uma estratégia bem-sucedida no combate ao câncer. Produzimos nanocápsulas poliméricas contendo óleo de copaíba como um sistema alternativo para solubilizar outros agentes citotóxicos lipofílicos e, portanto, potencializar os tratamentos anticâncer. Como esperado, as nanocápsulas poliméricas carregadas com óleo de copaíba foram capazes de diminuir levemente a viabilidade das células cancerígenas do colo do útero, desencadeando a morte celular por apoptose. Assim, as nanocápsulas poliméricas carregadas com óleo de copaíba demonstram ser um sistema nanoestruturado versátil para melhorar o tratamento do câncer, não apenas por seu efeito antitumoral direto, mas também por sua capacidade de incorporar outros agentes citotóxicos lipofílicos. Propomos a aplicação desta formulação em associação com diferentes fármacos como uma possível abordagem moderna para aumentar a ação de outros agentes anticâncer especialmente contra o câncer do colo do útero.*

Palavras-chave: nanotecnologia; entrega de fármacos; câncer; terapias anti-tumorais.

ABSTRACT- *Copaiba oil is broadly known in popular medicine by its anti- inflammatory action. Moreover, several studies have indicated its use in the treatment of skin cancer due to its direct anti-tumoral activity. Therefore, developing new formulations that explore copaiba oil anti-tumoral effect associated to other cytotoxic drugs can be a successful strategy to fight cancer. We produced a polymeric nanocapsules containing copaiba oil as an alternative system to solubilize other lipophilic cytotoxic agents and therefore boost the anti-cancer treatments. As expected, copaiba oil-loaded polymeric nanocapsules were able to slightly decrease cervical cancer cell viability per se, triggering cell death through apoptosis. Thus, copaiba oil-loaded polymeric nanocapsules appears to be a versatile nanostructured system to improve cancer treatment not only for their direct anti-tumoral effect but also for their ability to incorporate other lipophilic*



cytotoxic agents. We propose the application of this formulation in association with different active drugs as a possible modern approach to boost other anti-cancer agents against cervical cancer.

Keywords: nanotechnology; drug delivery; cancer; anti-tumor therapies

1. INTRODUÇÃO

Os sistemas de liberação de fármacos vêm recebendo grande atenção devido à necessidade de aperfeiçoar a ação de fármacos no organismo. Dentre esses sistemas destacam-se as nanocápsulas poliméricas que apresentam um núcleo oleoso o qual é envolvido por uma parede polimérica. Dependendo do óleo utilizado na sua produção diferentes quantidades de fármacos podem ser encapsulados por essas estruturas. No campo da nanotecnologia farmacêutica, uma abordagem moderna é a possibilidade da co-encapsulação de fármacos nessas estruturas, buscando efeitos terapêuticos associados. Entretanto, para viabilizar esta possibilidade é necessário considerar os materiais essenciais para a formulação das nanocápsulas, um polímero biodegradável, um óleo para a constituição do núcleo das cápsulas, o(s) fármaco(s) e o(s) tensoativo(s) estabilizante(s) da suspensão. Nesse sentido, uma estratégia para aumentar a quantidade de encapsulamento de fármacos lipofílicos e visar um efeito associado sobretudo com fármacos antitumorais, é a utilização de óleos de origem vegetal para compor o núcleo da partícula com conhecidas propriedades farmacológicas como é o caso do óleo de copaíba.

O óleo de copaíba é um composto natural (Cascon e Gilbert, 2000) constituído de uma fração sólida não volátil, formada por ácidos diterpênicos, e uma fração de óleo essencial formada por sesquiterpenos (Rigamonte Azevedo et al., 2004). Esse composto possui diferentes funções, como por exemplo, na indústria de perfume como fixador de odores, na indústria de vernizes como secativo e na indústria alimentícia como aditivo aprovado pelo FDA (Food and Drugs Administration). Por apresentar propriedade emoliente, este óleo é utilizado na área cosmética no desenvolvimento de cremes, sabonetes e xampus. Além disso, o mesmo possui ação anti-inflamatória (Veiga et al., 2007; Humberto et al., 2016) e atividade antifúngica (Dias et al., 2014), e por esse motivo, possui uma grande aplicação em farmacologia como, por exemplo, no tratamento de melanoma neoplásico, carcinoma invasivo micropapilar. Além disso, o óleo de copaíba pode ser um substituto de corticoesteróides no tratamento de dermatites, diminuindo coceira, dor, edema e calor (Hadji-Minoglou e Bolcato, 2005). Como pode ser observado, esse óleo possui diferentes aplicações farmacológicas, o que o torna interessante para ser utilizado como estratégia de veiculação de insumos farmacêuticos ativos como possível estratégia para aumentar sua ação.

Recentemente a associação de fármacos antitumorais e óleo de copaíba em nanocápsulas poliméricas foi proposta para o tratamento de carcinoma basocelular (Venturini et al., 2015), e câncer de colo de útero (Frank et al., 2019). Porém esse sistema apresenta potencialidade para encapsular outros tipos de fármacos lipofílicos. Nesse trabalho, foram produzidas nanocápsulas de óleo de copaíba sem fármaco, a fim de avaliar suas propriedades físico-químicas e determinar seu efeito citotóxico em linhagem de células tumorais.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para esse trabalho a Poly (ϵ -caprolactona) foi selecionada como polímero para ser utilizado na composição das nanocápsulas (NC), bem como o óleo de copaíba (33.4 μ L/mL) e o monoestearato de sorbitano como constituinte de núcleo, e o polissorbato 80 como estabilizante da



suspensão. A suspensão de nanocápsulas poliméricas contendo o óleo de copaíba (NC) foi avaliada com relação as suas propriedades físico-químicas mediante determinação do diâmetro da partícula e polidispersão utilizando a técnica de difratometria de laser (Mastersizer 2000, Malvem), e espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer® nano-ZS modelo ZEN 3600, Malvem). Para a determinação do potencial zeta das suspensões, utilizou-se eletroforese e a análise de pH foi realizada diretamente nas formulações, em potenciômetro (B474 Micronal) previamente calibrado. Todas as medidas de tamanho foram realizadas em duplicata de lote. A suspensão foi obtida em ambiente asséptico para posterior realização de sua avaliação citotóxica em cultura de células.

Para os experimentos envolvendo análise da citotoxicidade da NC, foi utilizada a linhagem celular de carcinoma cervical SiHa (American Type Culture Collection, Rockville, MD). As células foram mantidas em DMEM com baixa glicose suplementado com 10% de SFB e antibióticos penicilina/estreptomicina (0,5 U·mL / 95% de ar a 37°C). A linhagem celular (40.000 células/poço) foi semeada em placas de 24 poços e tratadas com 3,0 µM de NC em meio de cultura por 24 horas. Em seguida, o número de células viáveis foi determinado por citometria de fluxo utilizando o citômetro de fluxo inverso FACSVM (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Testes foram realizados para verificar o tipo de mecanismo de morte celular envolvido após as células serem tratadas com NC. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram comparados com o grupo controle (CTRL), ou seja, células sem o tratamento. Os experimentos foram: a) marcação com anexina V e coloração com iodeto de propídio para verificação de possível morte por apoptose e necrose; b) marcação do núcleo das células com corante Hoechst para detecção dos núcleos fragmentados. Para todos os experimentos, a metodologia seguida foi a descrita por Frank e colaboradores (2017).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nanocápsulas poliméricas contendo óleo de copaíba no seu núcleo foram produzidas por nanoprecipitação e apresentaram tamanho de partícula em torno de 200 nm, conforme pode ser observado na Tabela 1. É possível observar que tanto pela técnica de difração de laser quanto pela técnica de espalhamento de luz dinâmico ambas apresentaram tamanho semelhantes e sistema homogêneo, que pode ser verificado pelo baixo valor de SPAN e PDI. Além disso, as suspensões apresentaram potencial zeta negativo, o que já era esperado uma vez que a parede polimérica das partículas é composta de Poly (ε-caprolactona) e pela presença de polissobarto 80 (FRANK et al., 2017). O valor de pH foi levemente ácido também característico para esse tipo de sistema.

Tabela 1- Caracterização físico-química de nanocápsulas poliméricas contendo copaíba no núcleo

SUSPENSÃO	D4.3	SPAN	DLS	PDI	Potencial zeta	pH
NC	230±7.2	1.7±0.2	202±8.2	0.18±0.1	-8.23±0.4	6.02±0.1

Adicionalmente, observou-se a manutenção das características físico-químicas da NC por 60 dias. Isso significa dizer que a suspensão pode ser uma boa estratégia para o encapsulamento de fármacos lipofílicos, uma vez que não foi verificado fenômenos de instabilidade nas suspensões.

A NC foi avaliada diretamente em cultura de células de câncer cervical a fim de avaliar seu efeito citotóxico. Os resultados demonstraram uma diminuição da viabilidade celular (cerca de 20%) quando comparadas com células controle (que não receberam o tratamento com NC) (Figura



1). Isso significa dizer que NC apresenta um leve efeito citotóxico nessa linhagem celular. A encapsulação de fármacos antitumorais é uma das aplicações mais consolidadas na área da nanotecnologia farmacêutica e a cada ano diferentes estruturas são propostas para encapsular fármacos para os mais diferentes tipos de câncer, como por exemplo o imiquimode para carcinoma basocelular (Venturini et al., 2015), 5-Fluouracil para câncer metastático (Zatta et al., 2018), dentre outros. A estratégia de desenvolver uma partícula que tenha como componente um núcleo com óleo com ação antitumoral poderá servir como plataforma para o encapsulamento de diferentes agentes antitumorais.

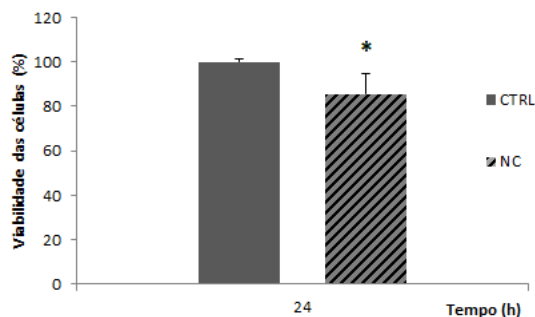


Figura 1 – Viabilidade de células SiHa após tratamento com NC por 24 horas. * $p < 0.05$. Resultados correspondem a média \pm SEM (n=3).

A fim de avaliar o mecanismo de morte celular envolvido, nós realizamos a investigação de apoptose e necrose, e também avaliação do núcleo celular. Na Figura 2A é possível observar que parte do mecanismo envolvido na diminuição da viabilidade celular é por apoptose e apoptose tardia. Além disso, é possível observar fragmentos nucleares (Figura 2B) quando as células são tratadas com NC. Esses fragmentos podem ser indicativos de células em processo de morte por apoptose, o que corrobora com os achados anteriores (Figura 2A). Já é demonstrado na literatura que muitos fármacos antitumorais apresentam mecanismo de apoptose combinado a outros processos como autofagia e parada de ciclo celular. Aqui nós demonstramos que um dos mecanismos envolvidos na diminuição de morte celular em linhagem tumoral de câncer cervical (SiHa) é por apoptose. A partir disso, outros estudos serão realizados a fim de verificar outros processos de morte que também podem estar envolvidos.

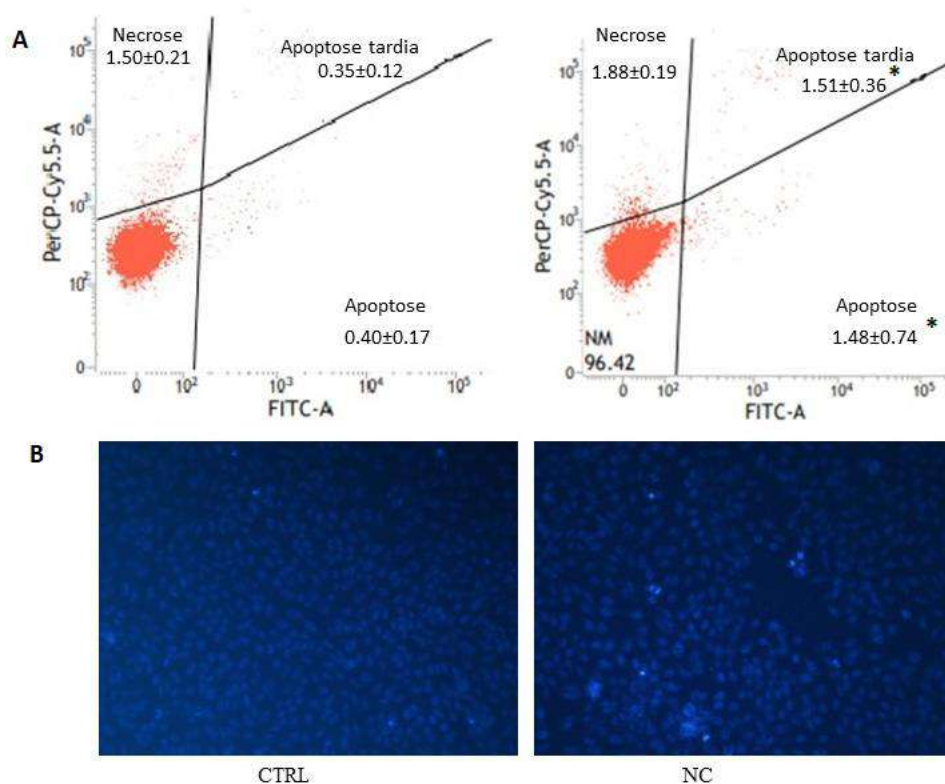


Figura 2 – Avaliação do mecanismo de morte celular. A) Avaliação de morte por apoptose/necrose. B) Avaliação de morte por análise do núcleo com corante Hoescht. * $p < 0.05$. Resultados correspondem a média \pm SEM (n=3).

4. CONCLUSÃO

Nanocápsulas poliméricas com óleo de copaíba no núcleo foram produzidas com tamanho nanométrico adequado e as características físico-químicas foram mantidas durante 60 dias, indicando a estabilidade do sistema. Considerando sua leve capacidade de induzir morte em linhagem de câncer do colo do útero por apoptose, NC poderia ser utilizada como um sistema versátil projetado para solubilizar outros agentes citotóxicos lipofílicos, a fim de melhorar sua atividade frente a células tumorais. Portanto, propomos a aplicação desta formulação em associação com diferentes fármacos como uma possível abordagem moderna para aumentar a ação de outros agentes anticâncer, sobretudo contra o câncer do colo do útero.

5. REFERÊNCIAS

Cascon, V.; Gilbert, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *guyanensis* Desf. *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochemistry**, v.55, p.773-8, 2000.

Dias OD., Colombo M., Kelmann R., Kaiser S., Lucca LG., Teixeira HF., Limberger RP., Veiga., VJ. Koester LS. Optimization of Copaiba oil-based nanoemulsions obtained by different preparation methods. **Industrial Crops and Products**. v. 59, p. 154-162, 2014.



Frank, L.A.; Gazzi, R.P.; de Andrade Mello, P.; Buffon, A.; Pohlmann, A.R.; and Guterres, S.S.. Imiquimod- loaded nanocapsules improve cytotoxicity in cervical cancer cell line. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 136, 9–17, 2019.

Humberto F., Gueutin C., Morais AVR, Alencar EN., Egito EST., Vauthier C. HPLC Method for the Dosage of Paclitaxel in Copaiba Oil: Development, Validation, Application to the Determination of the Solubility and Partition Coefficients. **Chromatographia** v.79 p.405-412, 2016.

Veiga VF., Rosas EC., Carvalho MV., Henriques MGMO., Pinto AC. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne—A comparative study. **Journal of Ethnopharmacology.** v.112 p.248–254, 2007.

Venturini CG., Bruinsmann FA., Contri RV., Fonseca FN., Frank LA., D’Amore CM., Raffin RP., Buffon A., Pohlmann AR., Guterres SS. Co-encapsulation of imiquimod and copaiba oil in novel nanostructured systems: promising formulations against skin carcinoma. **Pharmaceutical Sciences** v.79, p. 36-43, 2015.

Rigamonte Azevedo, O.C. et al. Copaíba: ecologia e produção de óleo-resina. Rio Branco: **EMBRAPA. MAPA**, p.28, 2004.

Veiga VF., Pinto AC. THE *Copaifera* L. GENUS. **Quim. Nova**, v. 25, p.273-286, 2002.

Zatta KC, Frank LA, Reolon LA, Amaral-Machado L, Egito ES, Gremião MP, Pohlmann AR, Guterres SS. An inhalable powder formulation based on micro-and nanoparticles containing 5-fluorouracil for the treatment of metastatic melanoma. **Nanomaterials.** 8(2):75, 2018.

6. AGRADECIMENTOS

FAPERGS, CAPES e CNPq.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

SENSOR BIOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE OURO PARA DIAGNÓSTICO DE HPV58

SOARES, G.S.¹, LUCENA-SILVA, N.², OLIVEIRA, M.D.L.¹, ANDRADE, C.A.S.¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica.

²Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

E-mail para contato: giselless84@yahoo.com.br

RESUMO – A Infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV) é uma infecção sexualmente transmissível (IST) bastante frequente no mundo. Um dos principais problemas relacionados a essa infecção é a falta de marcadores capazes de distinguir uma infecção transitória de uma infecção latente pelo papiloma vírus humano. Em decorrência das limitações apresentadas pelos métodos atuais existe uma busca incessante por novas alternativas de identificação precoce de infecções pelo HPV. Neste trabalho, foi desenvolvido um novo método de identificação de biomarcadores de evolução de malignidade em amostras de pacientes infectados com HPV através de diagnóstico rápido por técnica impedimétrica. A plataforma foi montada através da polimerização do tiofeno, sua interação com as nanopartículas de ouro e posterior adição da camada de bioreconhecimento. Os processos de montagem e o sinal de hibridação foram monitorados pela voltametria cíclica (VC) e pela espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). O biosensor de DNA mostrou significativos desempenhos com alta sensibilidade

Palavras Chave: HPV, Genossensor, Eletroquímica.

ABSTRACT - Human Papilloma Virus Infection (HPV) is a sexually transmitted infection (STI) quite common in the world. One of the main problems related to this infection is the lack of markers capable of distinguishing a transient infection from a latent infection by the human papilloma virus. Due to the limitations presented by current methods, there is an incessant search for new alternatives for the early identification of HPV infections. In this work, a new method of identifying biomarkers of malignancy evolution in samples from patients infected with HPV was developed through rapid diagnosis by impedimetric technique. The platform was assembled through the polymerization of the thiophene, its interaction with the gold nanoparticles and the subsequent addition of the bio-recognition layer. The assembly processes and the hybridization signal were monitored by cyclic voltammetry (CV) and by electrochemical impedance spectroscopy (EIS). The DNA biosensor showed significant performances with high sensitivity.



Keywords: HPV, Genosensor, Electrochemical

1. INTRODUÇÃO

A Infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV) é uma infecção sexualmente transmissível (IST) bastante frequente no mundo. Avalia-se que cerca de 80% da população mundial será acometida por pelo menos um dos tipos do HPV ao longo da vida. No Brasil, estima-se que haja 9 a 10 milhões de infectados por esse vírus e que, a cada ano, 700 mil novos casos ocorram (Abreu, Soares et al. 2018). Existem mais de 100 tipos de HPV que podem ser classificados em oncogênicos (ou de alto risco), que são aqueles que podem causar câncer; e não oncogênicos (ou de baixo risco) (Jongen, van Santen et al. 2019). A maioria das infecções por HPV e lesões pré-cancerígenas são assintomáticas e são erradicadas espontaneamente, no entanto, infecção persistente pode levar à displasia cervical e ao desenvolvimento de câncer. Embora o DNA do HPV seja encontrado em quase todos os casos de câncer do colo do útero, apenas a genotipagem não consegue distinguir entre infecções latentes e transitórias. Os cânceres induzidos pelo HPV geralmente ocorrem após vários anos de infecção, daí a importância de sua detecção precoce, o que teria implicações diretas na sua prevenção, controle e tratamento.

Existem vários métodos que permitem a identificação da infecção pelo HPV, no entanto, mais utilizados são reação da cadeia de polimerase (PCR) e captura híbrida (CH), por serem mais baratos e simples. A CH permite a detecção dos tipos de HPV oncogênicos mais frequentes e a avaliação da carga viral. Detecta a presença dos tipos de HPV, porém sem individualizá-los, é um dos métodos mais utilizados na prática clínica, apresentando alta sensibilidade (95 a 97%) (Pino, Alonso et al. 2011). Na PCR é possível identificar o vírus, tipá-lo e quantificá-lo determinando sua carga viral, porém, são utilizados em pequena escala, mais restritos à pesquisa que na prática clínica, portanto ainda não são considerados métodos complementares para o diagnóstico (Silva, Macêdo et al. 2015). Devido a isso existe uma busca incessante por novas alternativas de identificação precoce de infecções pelo HPV.

Por este motivo, neste trabalho nos propomos a desenvolver um novo método diagnóstico visando à superação das limitações encontradas nos métodos comumente utilizados na detecção do HPV. Para isto, foi desenvolvido de um biossensor impedimétrico de DNA nanoestruturado para detectar de forma eficiente o HPV em amostras clínicas. Esta ferramenta pode ser capaz de aumentar significativamente a eficiência do diagnóstico de infecções pelo papiloma vírus humano

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta etapa inicial foi utilizado plasmídeo contendo sequenciamento do genoma de HPV58. Os espectros de impedância foram registrados na faixa de frequência de 100mHz a 100kHz. A voltametria cíclica foi realizada com potencial de varredura de +0,7 a -0,2V com uma taxa de varredura de 50mV. s⁻¹. Para o processo de polimerização, inicialmente, o eletrodo de ouro foi imerso em uma solução 0,1 M de ácido tiofeno-3- acético (3TAA) em HCl (0,1 M), onde foi realizada a polimerização do monômero 3TAA em poli (ácido tiofeno-3-acético) (PTAA) através da técnica de voltametria cíclica (VC).

Após o processo de polimerização, foi adicionado EDC:NHS (1:1) na superfície do eletrodo a fim de ativar os grupamentos carboxílicos livres do filme de PTAA e liga-los aos grupamentos amino da camada seguinte. Em seguida foi adicionado ao eletrodo nanopartículas modificadas com cisteamina (NPs@Cys) pelo tempo de incubação de 40 min. Posteriormente, a

sonda de DNA (My11) foi imobilizada formando o sistema PTAA_NPs@Cys_SONDA_{MY11}. BSA foi usado em todos os experimentos para bloquear as interações não específicas. A hibridação foi realizada por técnica de revestimento usando 2 μ L do DNA alvo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1a mostra a espectroscopia de impedância eletroquímica das etapas de montagem do genossensor onde podemos observar que antes da modificação o diagrama de Nyquist revelou uma resposta impedimétrica característica de um eletrodo típico limitado por difusão. Depois da modificação pela polimerização do PTAA houve um aumento significativo do diâmetro do semicírculo de cole-cole comprovando a formação do filme polimérico na superfície do eletrodo dificultando assim a transferência de elétrons entre a superfície do ouro e a solução redox. Os grupamentos carboxílicos expostos pelo PTAA são importantes para a posterior ligação com os grupos aminas das nanopartículas de ouro modificadas com cisteamina (NPs@Cys) mediada pelo EDC:NHS. Seguida da imobilização das NPs@Cys houve um decréscimo nas respostas impedimétricas, este comportamento indica que as AuNPs foram eficientemente ancoradas levando a um aumento da área de superfície eletroativa do eletrodo. Com a imobilização da sonda de DNA, observa-se o aumento da impedância, em decorrência à repulsão eletrostática entre o par redox e a sonda de DNA na superfície do eletrodo. Por fim, após adição de BSA, novo incremento da resposta eletroquímica foi observado indicando o bloqueio dos sítios inespecíficos. Todas as etapas de construção do genossensor foram também caracterizadas por Voltametria cíclica e os resultados podem ser observados na figura 1b.

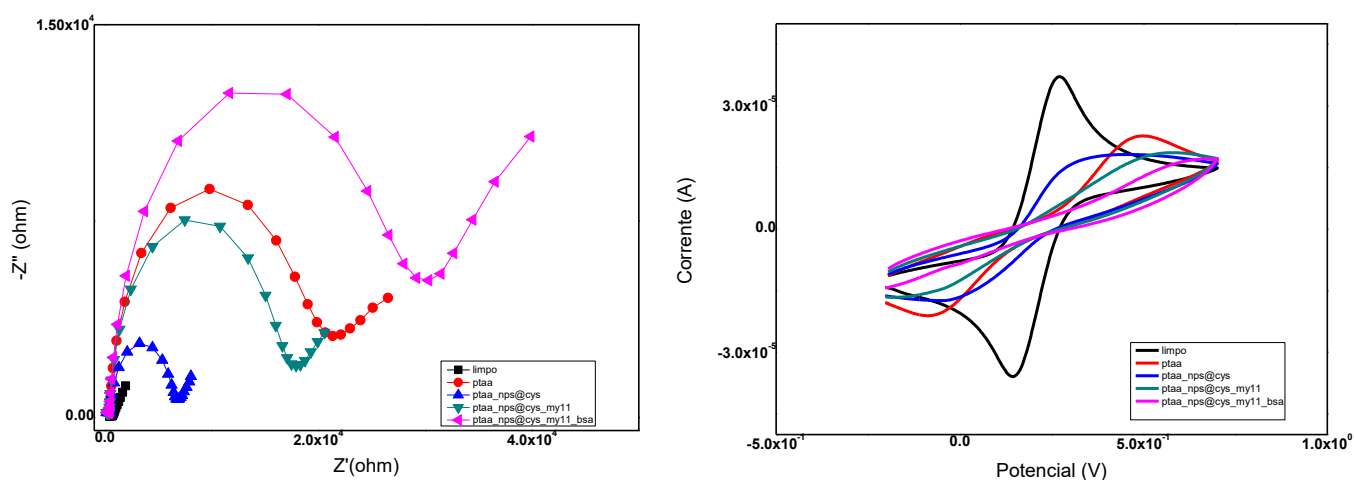
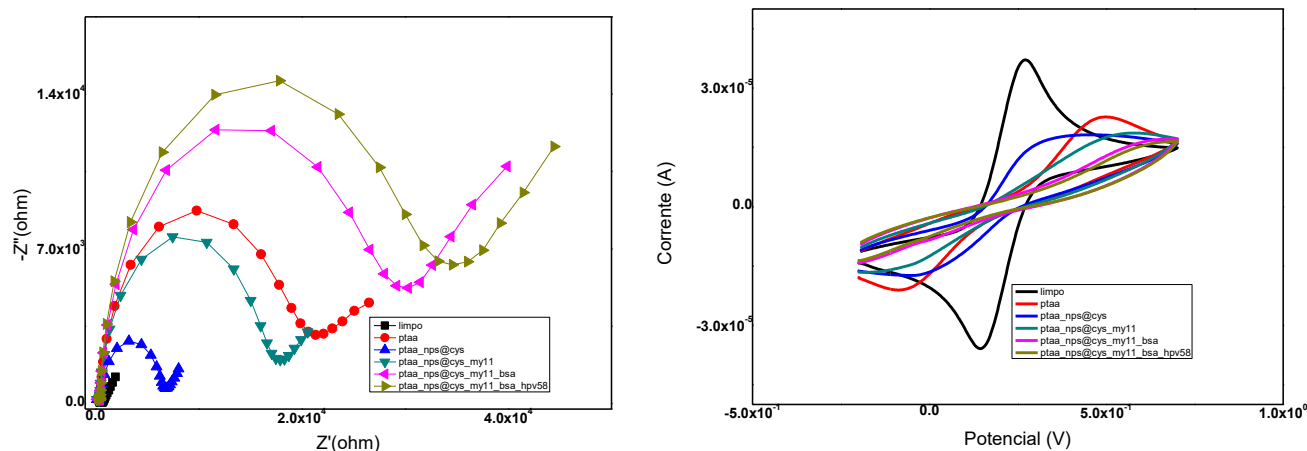


Figura 1: Caracterização eletroquímica do eletrodo modificado realizada pelos métodos de espectroscopia de impedância eletroquímica (a) e voltametria cíclica e (b).

Após a padronização do sistema sensor, a plataforma foi exposta a amostras contendo DNA genômico de HPV. O sensor foi capaz de reconhecer o DNA de HPV58 presente na amostra,

processo este observado a partir das análises de espectroscopia de impedância eletroquímica e voltametria cíclica demonstrados nas figuras 2a e 2b respectivamente.

Figura 2 – Resposta impedimétrica e voltamétrica do genossensor frente ao DNA de HPV58.



4. CONCLUSÃO

A plataforma sensora obtida mostrou-se eficiente na detecção do genoma do HPV58 na amostra testada. O genossensor desenvolvido mostra-se ser uma ferramenta importante para a construção de um método diagnóstico sensível para infecções por HPV.

5. REFERÊNCIAS

- ABREU, M. N. S., A. D. SOARES, D. A. O. RAMOS, F. V. SOARES, G. NUNES FILHO, A. F. VALADAO AND P. G. D. MOTTA. Knowledge and perception of HPV in the population over 18 years of age in the city of Ipatinga - State of Minas Gerais, Brazil. *Cien Saude Colet.* 23(2018) 849-860.
- JONGEN, V. W., D. K. VAN SANTEN, C. J. ALBERTS AND M. F. SCHIM VAN DER LOEFF. Estimating incidence rates of grouped HPV types: A systematic review and comparison of the impact of different epidemiological assumptions." *Papillomavirus Res.* (2019) **8**: 100187.
- PINO, M., I. ALONSO, V. FUSTE, P. CASTILLO, A. TORNÉ, P. FUSTÉ. Does human papillomavirus infection imply a different prognosis in vulvar squamous cell carcinoma?. *Gynecol Oncol.* (2011) 509-514.
- SILVA, E. R., F. L. S. MACÊDO, L. R. C. SOARES, V. M. S. ROSAL, N. A. L. CARVALHO AND M. G. L. ROCHA Diagnóstico molecular do papilomavírus humano por captura híbrida e reação em cadeia da polimerase. *Femina* (2015) 181-184.

6. AGRADECIMENTOS

CAPES, FACEPE, CNPq e Rede Nanobiotecnologia-CAPES.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE COLAGENASES DE PEIXES POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

N.F.B. SILVA^{1,2}, B.A.M. COSTA², F.T.B. ROCHA², A.L.F. PORTO² e V.M. OLIVEIRA²

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Curso de Graduação em Engenharia de Pesca, Departamento de Pesca e Aquicultura. PIBIC CNPq/UFRPE.

²Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, DMFA, Laboratório de Tecnologia de Bioativos, LABTECBIO.

E-mail para contato: vagne_melo@hotmail.com

RESUMO – *Colagenases são proteínas que catalisam processos químicos e quebram as ligações peptídicas, sendo capaz de clivar a tripla hélice do colágeno, outro tipo de proteína encontrada abundantemente no organismo de modo natural ou a partir de uma situação patológica. Por suas propriedades terapêuticas, têm sido requeridas em procedimentos cicatrizantes e no tratamento de glaucoma, desbridamento, quelóide, celulite, fibroma uterino, entre outros. A colagenase é obtida de fontes vegetais, animais e microbianas, sendo esta última a comercialmente mais empregada. No entanto, o alto custo na preparação das soluções e o risco biológico existente tornam necessária a investigação de fontes alternativas. Nesse sentido, resíduos de peixes são ricos em biomoléculas. Como são descartes, podem servir de matéria-prima biotecnológica. Assim, este trabalho objetivou purificar colagenase de resíduos de saramunete (*Pseudupeneus maculatus*) usando método cromatográfico. Os resíduos foram macerados, homogeneizados, centrifugados e aquecidos, observando-se atividade colagenolítica volumétrica (217,2 U/mL) e específica (229,37 U/mg). Em seguida, a amostra foi submetida à coluna DEAE-SEPHADEX A50, obtendo-se 8,27 (FP) e 9,89% (y). Os dados sugerem a viabilidade das vísceras de peixes como fonte de colagenase e matéria-prima alternativa para o segmento biofarmacêutico, agregando valor ao produto pesqueiro e contribuindo para um fornecimento sustentável de colagenases.*

Palavras-chave: cicatrização, pomadas, vísceras, recursos pesqueiros.

ABSTRACT– *Collagenases are proteins that catalyze chemical processes and break peptide bonds, being able to cleave the triple helix of collagen, another type of protein found abundantly in the body naturally or from a pathological situation. For its therapeutic properties, it has been required in healing procedures and in the treatment of glaucoma, debridement, keloid, cellulite, uterine fibroma, among others. Collagenase is obtained from plant, animal and microbial sources, the latter being the most commercially used. However, the high cost of preparing the solutions and the existing biological risk make it necessary to investigate alternative sources. In this sense, fish*



*residues are rich in biomolecules. As they are discards, they can serve as a biotechnological raw material. Thus, this work aimed to purify collagenase from residues of Spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*) using chromatographic method. The residues were macerated, homogenized, centrifuged and heated, observing volumetric (217.2 U/mL) and specific (229.37 U/mg) collagenolytic activity. Then, the sample was submitted to the DEAE-SEPHADEX A50 column, obtaining 8.27 (FP) and 9.89% (y). The data suggest the viability of fish viscera as a source of collagenase, an alternative raw material for the biopharmaceutical segment, adding value to the fishery product and contributing to a sustainable supply of collagenases.*

Keywords: healing, ointments, viscera, fishing resources.

1. INTRODUÇÃO

Métodos terapêuticos não invasivos foram usados recentemente nas ciências biomédicas. As enzimas têm demonstrado alta atividade em concentrações muito baixas em laboratórios e produtos farmacêuticos, permitindo-lhes desempenhar papéis cruciais em diferentes fenômenos biológicos relacionados ao organismo vivo, principalmente à medicina humana. Recentemente, o uso de métodos terapêuticos baseados em abordagens não invasivas tem sido enfatizado. Os pesquisadores se concentraram na produção de medicamentos e ferramentas para reduzir procedimentos invasivos (Alipour *et al.*, 2016).

Colagenases são proteínas que catalisam processos químicos e quebram as ligações peptídicas (Oliveira *et al.*, 2017a), sendo capaz de clivar a tripla hélice do colágeno (Haq *et al.*, 2020), uma proteína encontrada abundantemente no organismo de modo natural (Bi *et al.*, 2019) ou a partir de uma situação patológica. Em testes *in vitro* e *in vivo*, foi comprovado que colagenases têm várias propriedades terapêuticas, sendo requerida em procedimentos cicatrizantes de feridas e queimaduras, no tratamento da Doença de Dupuytren (WEI *et al.*, 2020), um espessamento anormal do tecido causado pelo depósito imoderado de tecido de colágeno, principalmente os tipos I e III, e na Doença de Peyronie (Natale *et al.*, 2020), um distúrbio do tecido conjuntivo que envolve o crescimento de placas fibrosas nos tecidos moles do pênis (Alipour *et al.*, 2016).

A colagenase tem sido utilizada na preparação de soluções tópicas (pomadas) (Roy; Almudallal; Iorio, 2013) e/ou injetáveis (Natale *et al.*, 2020), como nas aplicações no espaço supracoroidal (SCS) direcionando a colagenase à esclera, coróide e retina, quebrando as fibrilas de colágeno que ligam a esclera e a coróide no SCS (Jung *et al.*, 2019). Ainda, são aplicadas com sucesso no tratamento de glaucoma, desbridamento, hérnia de disco intervertebral, degradação da placenta humana retida, no reparo de cartilagem, dor no mamilo, vitrectomia, oclusões totais crônicas (CTO), queloide, celulite, fibroma uterino (Alipour *et al.*, 2016), em associação com materiais biomédicos para terapia pulpar vital (Chang *et al.*, 2020), entre outras possibilidades de uso clínico e não clínico, como nas indústrias de alimentos, curtumes, carnes e cosméticos (Harazono; Atsumi; Shirasaka, 2020).

As colagenases podem ser obtidas de inúmeras fontes: vegetais, animais (Oliveira *et al.*, 2017b) e microbianas (Harazono; Atsumi; Shirasaka, 2020; WEI *et al.*, 2020). A fonte que tem sido mais empregada é a microbiana, porém questões de custo e sanitárias têm motivado novas investigações por fontes alternativas para substituir as atuais (Oliveira *et al.*, 2017a). Neste cenário, o ambiente marinho surge como uma possibilidade viável por fornecer proteínas de alta qualidade e com funções biotecnológicas já definidas, principalmente para espécies em escala de produção na indústria da aquicultura, principalmente de camarões, frutos do mar e peixes, sendo os últimos



os maiores geradores de resíduos com real possibilidade de extração de biomoléculas (Oliveira *et al.*, 2019), como de proteases com propriedades colagenolíticas (Bhagwat; Dandge, 2018).

Dentre os resíduos descartados do processamento de peixes, estão inclusos cabeça, cauda, pele, escamas, barbatanas, nadadeiras e vísceras internas, como bexiga natatória, estômago, intestino, e suas porções (quando presentes), fígado, entre outros (Oliveira *et al.*, 2017a). Os intestinos de espécies de peixes têm sido reportados como ambientes ricos em colagenases (Oliveira *et al.*, 2020). O reaproveitamento biotecnológico dos resíduos da indústria aquícola contribui para manter a sustentabilidade do setor (Ideia *et al.*, 2019) e para agregar valor ao produto da pesca, além de proporcionar ao mercado de enzimas uma fonte alternativa de colagenase frente às de origem microbiana atualmente empregadas.

Para sua utilização confiável, a colagenase proveniente das diferentes fontes precisa passar por processos rigorosos de extração e purificação. Nesse sentido, várias técnicas têm sido habitualmente utilizadas, dentre as quais os métodos de precipitação (sulfato de amônia, álcool, acetona, por exemplo), sistema de fases (duas fases aquosas, sistema trifásico) (Oliveira *et al.*, 2020) e métodos cromatográficos, como a cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex A-50, a cromatografia de gel filtração, de troca iônica (Park *et al.*, 2002), entre outras.

Em tempos de pandemia pelo coronavírus (COVID-19) e levando em consideração que sua fisiopatologia ainda não está totalmente esclarecida, as colagenases como enzimas atuantes em processos de cicatrização podem ser um aliado valioso no enfrentamento dessa enfermidade, auxiliando na regeneração de tecidos lesionados. Assim, este trabalho objetivou purificar colagenase de resíduos de saramunete (*Pseudupeneus maculatus*) usando método cromatográfico de troca iônica visando propor uma alternativa para métodos terapêuticos e contribuir com a sustentabilidade da produção.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Aquisição das Vísceras e local de desenvolvimento do projeto

Os resíduos sólidos orgânicos utilizados foram provenientes de exemplares saramunete (*Pseudupeneus maculatus*). Vísceras intestinais (50 g) foram adquiridas junto aos comerciantes de pescado em boxes do Mercado Público de Casa Amarela, Recife, Pernambuco, Brasil. As vísceras foram higienizadas e conduzidas acondicionadas em isopor com gelo ao Laboratório de Tecnologia de Produtos Bioativos, LABTECBIO, UFRPE, para serem processadas a posterior. A espécie utilizada está registrada no Patrimônio Genético Brasileiro nºA25441A.

2.2 Produção do extrato bruto e dosagem proteica

A extração de proteases colagenolíticas a partir dos resíduos de saramunete (*Pseudupeneus maculatus*) foi realizada de acordo com Oliveira *et al.* (2020). A razão de vísceras para tampão de extração (0,05 M de Tris-HCl, pH 7,5, contendo 5 mM de CaCl₂) foi de 1:5 (p/v). Todas as vísceras intestinais recolhidas foram homogeneizadas separadamente durante 5 minutos, em um homogeneizador ajustado a velocidade de 10,000-12,000 rpm (4°C) (IKA RW 20D S32, China). O homogeneizado foi então centrifugado (centrífuga Sorvall Superspeed RC-6, Carolina do Norte, EUA) a 12.000 x g durante 30 minutos (4°C). O sobrenadante foi aquecido a 45°C durante 30 minutos e, em seguida, colocado em gelo para arrefecimento rápido. Sua atividade enzimática foi mensurada antes e após o aquecimento. Este procedimento teve por objetivo desnaturar proteases de baixa resistência térmica e ativar zimogênios trípticos. A concentração de proteína total foi determinada de acordo com Smith *et al.* (1985).



2.3 Ensaio proteolítico inespecífico

A atividade proteolítica total foi determinada usando azocaseína (substrato), em microplacas e em leitor ELISA. Em duplicata, utilizando tubos de microcentrífuga, 50 µl de azocaseína a 1% (p/v) (Sigma), preparado em 0,2 M Tris-HCl pH 7,5, foi incubado com 30µL de extrato por 60 minutos a 25 °C. Adicionalmente, 240µL de 10% (p/v) de ácido tricloroacético (TCA) foram adicionados para parar a reação. Após 15 minutos em repouso, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 8,000 x g. Em seguida, 70 µl do sobrenadante foram adicionados a 130 µL de NaOH 1 M em uma placa de ELISA e a absorbância da mistura foi mensurada a 450 nm. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima para hidrolisar a azocaseína, dando um aumento de 0,001 unidades de absorbância por minuto (Alencar *et al.*, 2003).

2.4 Ensaio colagenolítico

As propriedades colagenolíticas foram determinadas de acordo com Oliveira *et al.* (2019), usando azocoll como substrato. Uma mistura de reação, que contém 5 mg de azocoll, 500µl de 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) que continha CaCl₂ 5 mM e 500 µl de extrato enzimático, foram incubados a 55°C durante 30 minutos, sob agitação constante e em triplicata. Posteriormente, foram adicionados 200µl de ácido tricloroacético (TCA) e incubadas para parar a reação. Após 10 minutos, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g durante 10 minutos a 4°C. A leitura da amostra foi realizada com espectrofotômetro em um comprimento de onda de 520 nm.

2.5 Cromatografia de troca iônica

O extrato bruto de saramunete foi submetido à precipitação com solvente orgânico (acetona a 70%) e agitado por 10 minutos. Após, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 20 minutos. As amostras foram aplicadas na coluna Sephadex-DEAE (G50 10x80mm) para a purificação de proteínas. A coluna foi equilibrada com tampão Tri-HCl 0,1 M, pH 7,5 e eluída com NaCl a 22°C em concentrações de tampão 0,1 M, 0,2 M e 0,3 M em que a coluna foi equilibrada. O fluxo de 0,5 ml/minuto, a absorbância monitorada a 280 nm e o eluído com gradiente foi coletado em frações de 1 ml. As frações foram coletadas, reunidas e concentradas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Enzimas colagenolíticas foram extraídas com sucesso de vísceras de saramunete (*P. maculatus*), corroborando com os descritos na literatura, em que vísceras de peixes são fontes ricas dessa biomolécula, como os descritos para arabaiana (*Serioladu merili*) (Oliveira *et al.*, 2017b) e tucunaré (*Cichla ocellaris*) (Oliveira *et al.*, 2020), sinalizando o grande potencial desse tipo de resíduo em servir de matéria-prima biotecnológica. Aqui, foram desenvolvidas atividades de extração enzimática, observando atividade colagenolítica volumétrica (217,2 U/mL) e atividade colagenolítica específica de (229,37 U/mg) do extrato bruto intestinal, sendo esse material encaminhado para a cromatografia de troca iônica.

Foi realizada a cromatografia em coluna de DEAE-SEPHADEX (troca iônica) (Figura 1). Todos os picos foram utilizados para atividade proteásica inespecífica (Figura 2) e colagenolítica específica (Figura 3). A amostra contendo a protease colagenolítica foi localizada no primeiro pico (1 a 15), indicando que a enzima fracionada não apresentou afinidade com a coluna de DEAE-SEPHADEX, com isso podemos concluir que a amostra enzimática possui carga positiva.



A recuperação (y) da protease colagenolítica de saramunete (*Pseudupeneus maculatus*) através do método cromatográfico foi de 9,89%, purificando (FP) cerca de 8,27 (vezes). Park *et al.* (2002) purificaram collagenase do intestino de *Scomber japonicus* usando DEAE Sephadex A-50 (FP: 11,5; y: 17,9%), Sephadex G-100 (FP: 23,3; y: 0,7%), DEAE Sephacel (FP: 26,4; y: 0,3%) e Sephadex G-75 (FP: 39,5; y: 0,1%), enquanto que Kim *et al.* (2002) purificaram a partir de órgãos internos de *Novoden modestrus*, usando 1st DEAE-Sephadex A-50 (FP: 8,60; y: 38,16%), 2st DEAE-Sephadex A-50 (FP: 89,39; y: 28,77%) e Sephadex G-150 (FP: 92,40; y: 10,90%). A grande quantidade de colunas utilizadas por ambos os autores para obtenção da amostra com alto grau de pureza é um fator negativo do ponto de vista financeiro, inviabilizando muitas vezes sua realização. Colagenases de peixes extraídas por métodos não-cromatográficos também foram reportados, como através do particionamento em sistema de duas fases aquosas e do sistema trifásico (TPP) (Oliveira *et al.*, 2020), ambos os métodos com valores de pureza inferior aos registrados neste trabalho.

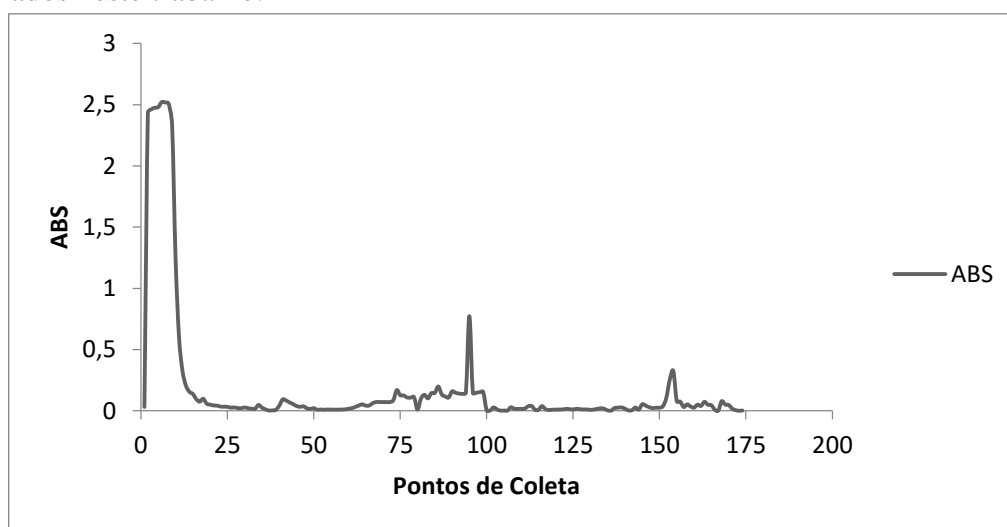


Figura 1 – Cromatografia do extrato enzimático bruto de saramunete (*Pseudupeneus maculatus*) utilizando DEAE-SEPHADEX A50.

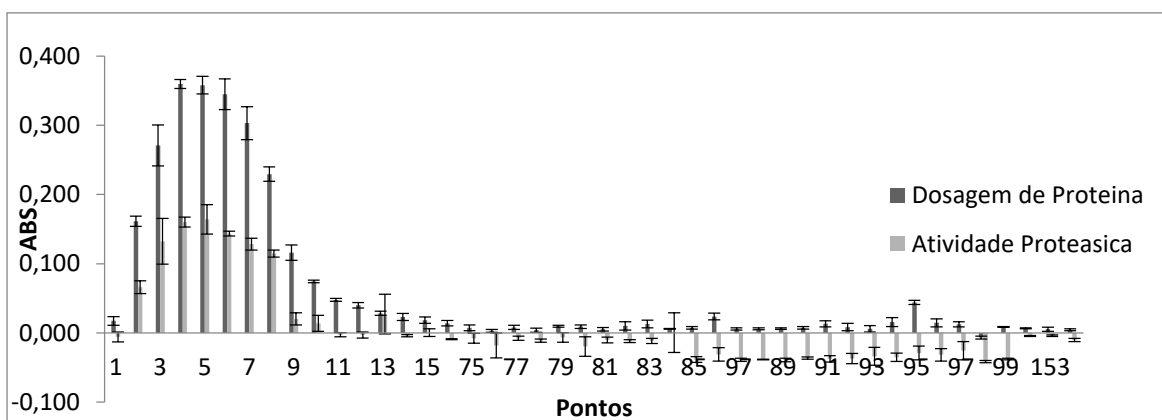


Figura 2 – Determinação de atividade proteásica de frações cromatográficas de saramunete

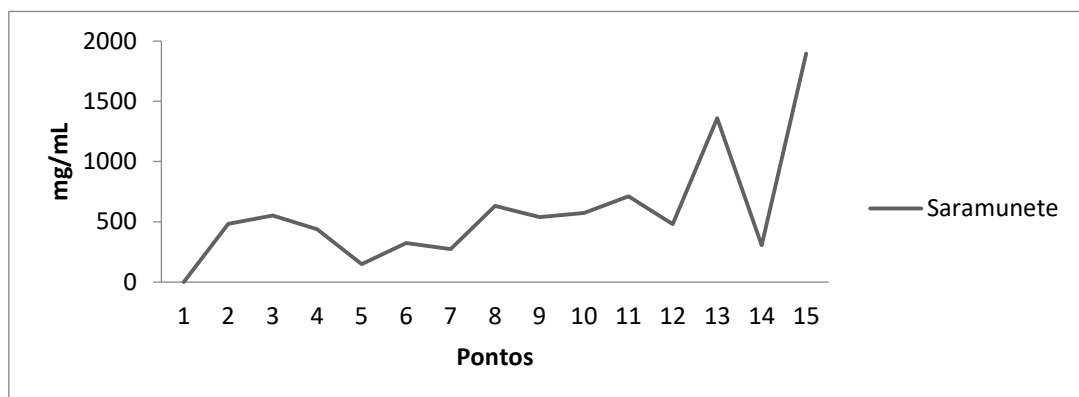


Figura 3 – Determinação de atividade colagenolítica de frações cromatográficas de saramunete

4. CONCLUSÃO

Uma nova collagenase foi extraída com sucesso a partir de subprodutos do processamento de saramunete, uma espécie de peixe abundante e de fácil aquisição comercial. A enzima extraída foi submetida a processos de purificação usando a cromatografia de troca iônica, resultando num elevado fator de purificação (8,27), mostrando-se eficiente para recuperação e isolamento desse tipo de biomolécula. Por suas aplicações biomédicas e farmacêuticas, a collagenase é altamente almejada comercialmente e a utilização de fontes residuais se torna uma alternativa viável, econômica e rápida para reduzir custos e tempo operacionais, favorecendo a geração de produto final menos oneroso para o consumidor. Também, o tratamento biotecnológico da matéria-prima contribuiu com a diminuição do impacto ambiental desses resíduos no ambiente aquático, podendo ser inserido em planos de gestão. Por fim, levando em consideração o cenário global pandêmico e o papel fisiológico da collagenase, a obtenção de enzimas alternativas como esta tende a favorecer futuros protocolos clínicos uma vez que a fisiopatologia da COVID-19 ainda não está totalmente elucidada.

5. REFERÊNCIAS

ALENCAR, R.B.; BIONDI, M.M.; PAIVA, P.M.G.; VIEIRA, V.L.A.; CARVALHO, L.B. JR.; BEZERRA, R.S. Alkaline proteases from digestive tract of four tropical fishes. *Braz. J. Food Technol.*, v.6, n.2, p. 279–284,2003.

ALIPOUR, H.; RAZ, A.; ZAKERI, S.; DINPARAST DJADID, N. Therapeutic applications of collagenase (metalloproteases): A review. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, v.6, n.11, p.975–981, 2016.

BHAGWAT, P.; DANDGE, P. Collagen and collagenolytic proteases: A review. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, v.15, p. 43-55, 2018.



BI, C.; LI, X.; XIN, Q.; HAN, W.; SHI, C.; GUO, R.; SHI, W.; QIAO, R.; WANG, X.; ZHONG, J. Effect of extraction methods on the preparation of electrospun/electrosprayed microstructures of tilapia skin collagen. *J. Biosci. Bioeng.*, v.128, p.234–240, 2019.

CHANG, H.-H.; CHANG, Y.-J.; YEH, C.-L.; LIN, T.-A.; LIN, C.-P. Development of calcium phosphate/calcium sulfate biphasic biomedical material with hyaluronic acid containing collagenase and simvastatin for vital pulp therapy. *Dental Mat.*, v.36, p.755-764, 2020.

HAQ, M.; HO, T.C.; AHMED, R.; GETACHEW, A.T.; CHO, Y.-J.; PARK, J.-S.; CHUN, B.-S. Biofunctional properties of bacterial collagenolytic protease-extracted collagen hydrolysates obtained using catalysts-assisted subcritical water hydrolysis. *J. Ind. Eng. Chem.*, v.81, p.332-339, 2020.

HARAZONO, K.; ATSUMI, Y.; SHIRASAKA, N. Safety evaluation of collagenase from *Streptomyces violaceoruber*. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, v.113, p.104645, 2020.

IDEIA, P.; PINTO, J.; FERREIRA, R.; FIGUEIREDO, L.; SPÍNOLA, V.; CASTILHO, P. C. Fish processing industry residues: A review of valuable products extraction and characterization methods. *Waste and Biomass Valori.*, p. 1-24, 2019.

JUNG, J.H.; PARK, S.; CHAE, J.J.; PRAUSNITZ, M.R. Collagenase injection into the suprachoroidal space of the eye to expand drug delivery coverage and increase posterior drug targeting. *Exp. Eye. Res.*, p.107824, 2019.

KIM, S.K.; PARK, P.J.; KIM, J.B.; SHAHIDI, F. Purification and characterization of a collagenolytic protease from filefish, *Novoden modestrus*. *J. Biochem. Mol. Biol.*, v.35, p.165-171, 2002.

NATALE, C.; MCLELLAN, D.M.; YOUSIF, A.; HELLSTROM, W. J. G. Review of Intralesional Collagenase Clostridium Histolyticum Injection Therapy and Related Combination Therapies in the Treatment of Peyronie's Disease (an Update). *Sex. Med. Rev.*, p.1-10, 2020.

OLIVEIRA, V. M.; CARNEIRO CUNHA, M. N.; ASSIS, C. R. D.; NASCIMENTO, T. P.; HERCULANO, P. N.; CAVALCANTI, M. T. H.; PORTO, A. L. Colagenases de pescado e suas aplicações industriais. *Pubvet*, v.11, n.3, p. 243-255, 2017a.

OLIVEIRA, V.M.; NASCIMENTO, T.P.; ASSIS, C.R.D.; BEZERRA, R.S.; PORTO, A.L.F. Study on enzymes of industrial interest in digestive viscera: Greater amberjack (*Seriola dumerili*). *J. Coast. Life Med.*, v.5, n.6, p. 233-238, 2017b.

OLIVEIRA, V.M.; ASSIS, C.R.D.; SILVA, J.C.; SILVA, Q.J.; BEZERRA, R.S.; PORTO, A. L.F. Recovery of fibrinolytic and collagenolytic enzymes from fish and shrimp byproducts: potential



source for biomedical applications. *Bol. Inst. Pesca*, v.45, p. 1-10, 2019.

OLIVEIRA, V.M.; CUNHA, M.N.C.; ASSIS, C.R.D.; SILVA, J.M.; NASCIMENTO, T.P.; SANTOS, J.F.; DUARTE, C.A.L.; MARQUES, D.A.V.; BEZERRA, R.S.; PORTO, A.L.F. Separation and partial purification of collagenolytic protease from peacock bass (*Cichla ocellaris*) using different protocol: Precipitation and partitioning approaches. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, p.101509, 2020.

PARK, P.-J.; LEE, S.-H.; BYUN, H.-G.; KIM, S.-H.; KIM, S.K. Purification and Characterization of a Collagenase from the Mackerel, *Scomber japonicus*. *J. Biochem. Mol. Biol.*, v.35, n.6, p.576-582, 2002.

ROY, J.; ALMUDALLAL, H.; IORIO, A. Application of collagenase ointment as a preliminary treatment of chronic diabetic foot ulcers. *The Foot*, v.23, p.112–113, 2013.

SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, v.150, n.1, p. 76–85, 1985.

WEI, D. H.; CANTLON, M.B.; WAKEFIELD, D.B.; VITALE, M.A. Risk Factors for Skin Tears Following Collagenase *Clostridium histolyticum* to Treat Dupuytren Contractures. *J. Hand. Surg. Am.*, p.1-10, 2020.

6. AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – código 88887.175810/2018-00. Os autores agradecem também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Universidade Federal Rural de Pernambuco pela bolsa de PIBIC de Nilson Silva.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO NANOESTRUTURADO BASEADO EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS E PEPTÍDEO SYNOECA-MP PARA DETECÇÃO DE BACTÉRIAS

A. G. SILVA JUNIOR^{1,2}, I. A. M. FRIAS^{1,2}, S. R. SÁ², R. G. LIMA-NETO³, O.L. FRANCO⁴,
M.D.L. OLIVEIRA^{1,2}, C. A. S. ANDRADE^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco; Recife/PE, Brasil;

²Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE, Brasil;

³Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE, Brasil;

⁴Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas de Brasília, Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília; Brasília/DF, Brasil.

E-mail para contato: albertogaldino16@gmail.com

RESUMO – *Infecções causadas por microrganismos ainda permanecem sendo um problema de saúde pública apesar de avanços na área médica e diagnóstica. Os principais atingidos são pessoas hospitalizadas por tempo prolongado e fazendo uso de dispositivos invasivos. Técnicas tradicionais de detecção de microrganismos permanecem sendo meios de cultura enriquecidos, imunoenaios e testes moleculares, mas em sua maioria são técnicas demoradas e dispendiosas. Biossensores eletroquímicos se destacam dentre outras alternativas devido a sua sensibilidade, rapidez na análise, baixo-custo e miniaturização, integrando nanopartículas em sua composição. Peptídeos antimicrobianos se mostraram como inovadores elementos de biorreconhecimento para biossensores. O presente trabalho integrou monocamadas automontadas de ácido 4-mercaptopbenzóico, nanopartículas magnéticas e o peptídeo antimicrobiano Synoeca-MP como sistema sensor para detectar bactérias. Ambos microrganismos avaliados, *Klebsiella pneumoniae* e *E. faecalis*, interagiram com o sensor por meio de interações eletrostáticas com o peptídeo, seguida da inserção do mesmo, promovendo variação da resistência à transferência de carga avaliada via espectroscopia de impedância eletroquímica. O limite de detecção de 10 unidades formadoras de colônia por mL ressaltam a sensibilidade do biossensor desenvolvido, destacando-o como alternativa promissora na detecção de microrganismos.*

Palavras-chave: Sensor; eletroquímica; microrganismos; Synoeca-MP; impedância.

ABSTRACT – *Infections caused by microorganisms remain a public health problem despite advances in the medical and diagnostic fields. The main victims are long-term hospitalized*



patients and those using invasive devices. Traditional microorganism detection techniques remain focusing in enriched culture media, immunoassays and molecular tests, but most of them are time-consuming and expensive techniques. Electrochemical biosensors stand out among other options due to their sensitivity, fast analysis, low cost and miniaturization, integrating nanoparticles in their composition. Antimicrobial peptides proved to be innovative elements of biorecognition for biosensors. The present work integrated self-assembled monolayers of 4-mercaptobenzoic acid, magnetic nanoparticles and antimicrobial peptide Synoeca-MP as a sensor system to detect bacteria. Both evaluated microorganisms, *Klebsiella pneumoniae* and *E. faecalis*, interacted with the sensor through electrostatic interactions with the peptide, followed by its insertion, promoting variation in the resistance to charge transfer evaluated via electrochemical impedance spectroscopy. The detection limit of 10 colony-forming units per mL highlights the sensitivity of the developed biosensor, highlighting it as a promising alternative in the detection of microorganisms.

Keywords: Sensor; electrochemistry; microorganisms; Synoeca-MP; impedance.

1. INTRODUÇÃO

Infecções ocasionadas por microorganismos ainda são consideradas um problema de saúde pública, principalmente em regiões sem saneamento básico, países em desenvolvimento e no ambiente hospitalar de maneira geral. Associado a isso, a crescente resistência a antimicrobianos constitui-se como fator determinante na infecção de pacientes hospitalizados, principalmente daqueles com ferimentos abertos, profundos, ou fazendo uso de dispositivos invasivos como cateteres, respiração mecânica, sondas, etc (AGARWAL; SHIAU; LARSON, 2018; KHAN; BAIG; MEHBOOB, 2017). Tais exemplos facilitam a entrada de microorganismos como as bactérias que constituem o grupo ESKAPE: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies no gênero *Enterobacter*) (MULANI et al., 2019). Este acrônimo reflete a habilidade desses microorganismos de “escaparem” da atividade dos antibióticos e terapias convencionais, resultando em elevada morbidade e mortalidade, além de prolongada permanência no hospital, resultando em aumento nos gastos públicos e maior risco de co-infecções (MA et al., 2020).

Diferentes metodologias são utilizadas para a identificação desses patógenos, onde meios de cultura sólidos e semissólidos, caldos, etc. ainda permanecem como uma das primeiras opções de escolha, seguido de ensaios imunoenzimáticos como no ELISA e testes moleculares (AHMED et al., 2014). Entretanto, apesar de demonstrarem efetividade, para a obtenção dos resultados são necessários de 24h a 72h após o semeio em placa para a identificação parcial do microorganismo, imunoensaio e técnicas moleculares requerem pré-tratamento e purificação de amostras e equipamentos de elevado custo (MOBED et al., 2019). Portanto, visando vencer tais limitações, novas opções de baixo-custo, sensíveis e específicas são requeridas, onde biossensores se enquadram como uma inovadora opção para o diagnóstico de bactérias de interesse clínico.

Biossensores eletroquímicos são dispositivos que realizam a análise da interação sensor-analito alvo com dispositivos portáteis que apresentam elevada sensibilidade e especificidade (PARMIN et al., 2019). A estrutura típica de um biossensor eletroquímico compreende basicamente uma molécula de biorreconhecimento específica para o analito a ser detectado e um transdutor físico-químico, responsável por liberar um sinal elétrico com intensidade proporcional à concentração do analito presente na amostra clínica (MADURAIVEERAN; SASIDHARAN;



GANESAN, 2018). São várias as opções de moléculas de biorreconhecimento que podem ser usadas, onde anticorpos, enzimas, fragmentos de DNA/RNA, peptídeos, etc. são alguns dos exemplos mais explorados (HAMMOND et al., 2016).

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) são moléculas isoladas de múltiplos organismos vivos, como em animais, plantas e insetos, agindo como primeira linha de defesa (RIOOL et al., 2017). Nos últimos anos, tais AMPs se destacaram como uma excelente alternativa ao recorrente problema da resistência a antimicrobianos por meio de sua atividade bactericida e bacteriostática. Sua aplicabilidade foi reconhecida como efetiva na atividade de biorreconhecimento em biossensores, cuja interação com microorganismos se dá inicialmente pela diferença de cargas entre ambos, seguido da inserção do peptídeo na parede celular bacteriana, sendo facilmente detectado em uma plataforma biossensora (SILVA JUNIOR et al., 2018).

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de uma plataforma sensora eletroquímica nanoestruturada, baseada em nanopartículas magnéticas revestidas por quitosana e funcionalizada com o AMP bioinspirado Synoeca-MP (Syno-MP), com sequência de aminoácidos INWLKLGKKIIASL-NH₂, onde tal peptídeo é normalmente isolado a partir do veneno da vespa social *Synoeca surinama* (FREIRE et al., 2019). Em adição, as técnicas eletroquímicas voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foram utilizadas na caracterização da montagem do sensor, e o EIE na avaliação da detecção da bactéria Gram-negativa *Klebsiella pneumoniae* e da bactéria Gram-positiva *Enterococcus faecalis*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Cloreto de ferro (III) hexahidratado (FeCl₃.6H₂O) e sulfato de ferro (II) heptahidratado (FeSO₄.7H₂O) foram obtidos pela VETEC (Brasil). Ácido 4-mercaptobenzóico (MBA), 1-etil-3-(3dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS) e quitosana foram fornecidos pela Sigma Aldrich (EUA). Água deionizada ultrapura obtida pelo sistema MilliQ (Millipore Synergy, EUA) foi utilizada em todos os experimentos. O AMP Syno-MP foi sintetizado pela Aminotech (São Paulo, Brasil) foi sintetizado usando N-9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) e liofilizado, apresentando pureza >95%.

Cultura bacteriana e fúngica

Os microorganismos utilizados nos estudos de detecção foram obtidos na coleção do Departamento de Micologia da UFPE. *K. pneumoniae* e *E. faecalis* foram semeados em meio Mueller-Hinton, estocados em estufa 37°C durante 24h. Após crescimento, ambas bactérias foram colhidas (cultura isolada) e suspensas em tampão fosfato pH 7. Por meio de um espectrofotômetro (Labomed, EUA) em densidade óptica 600 nm (OD₆₀₀) e ajustadas para 0.50, as bactérias foram divididas em diferentes concentrações de acordo com a escala de McFarland, de 10¹ a 10⁵ CFU.mL e estocadas a 4°C.

Técnicas eletroquímicas

A avaliação da montagem da plataforma sensora e detecção dos microorganismos se deu em uma célula eletroquímica contendo três eletrodos: superfície de ouro como eletrodo de trabalho, platina como contra-eletrodo e prata/cloreto de prata como eletrodo de referência. Os



eletrodos foram imersos em 20mL de uma solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ preparado em tampão fosfato pH 7, usada como sonda redox. As análises voltamétricas e impedimétricas se deram por meio de um potenciostato Autolab PGSTAT 128N (Metrohm, Holanda) em temperatura ambiente. As medidas de VC ocorreram no potencial entre -0.2 a +0.7 V na taxa de varredura 50 mV/s. Os espectros de impedância foram obtidos pelo sinal de amplitude de 10 mV, onde 30 pontos de dados foram distribuídos em uma frequência que varia entre 100 mHz e 100 kHz.

Preparo das nanopartículas magnéticas funcionalizadas

A síntese das $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quit}$ se deram por meio do procedimento estabelecido por Zarnegar e Safari 2014, com algumas modificações. 8 mM de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 4 mM do $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ são dissolvidos em água deionizada e submetidos a agitação magnética. Em seguida, 5 mL de uma solução de quitosana 2% (preparada em ácido acético 0,05 M) é adicionado à solução, permanecendo em agitação na temperatura de 65°C por 1h. Em seguida, 5 mL de hidróxido de amônio é rapidamente vertido à solução anterior, resultando na mudança de cor da solução marrom para preta, indicativo da formação das nanopartículas magnéticas ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quit}$). As nanopartículas foram lavadas repetidamente em água e álcool 70% até a solução atingir pH 7 e secas em estufa.

A imobilização do peptídeo Syno-MP às $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quit}$ se deu ressuspensão 50 mg das nanopartículas em 25 mL do glutaraldeído 5% e aplicados em banho ultrassônico por 1h. Em seguida, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quit}$ são lavadas e Syno-MP é adicionado ($1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). Os grupos amino livres do PAM se ligaram aos grupos amino da quitosana por meio do glutaraldeído. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quit}$ -SynoMP foram lavados para remoção dos peptídeos não aderidos e estocados a 4°C até uso.

Montagem do sistema sensor

O eletrodo de trabalho com superfície de ouro é inicialmente imerso em HClO e submetido a banho ultrassônico em água deionizada. Em seguida, o eletrodo é imerso em solução etanólica de MBA (5 mM) durante 10 min. A ativação dos grupos carboxílicos livres do MBA se deram pela incubação dos agentes acopladores EDC (0.4M) e NHS (0.1M) durante 5 min. Posteriormente, 4 μL das $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quit}$ -SynoMP foram adsorvidas ao eletrodo e incubadas por 10 min. Água deionizada ultrapura foi utilizada em cada etapa para remoção de moléculas não aderidas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre diversas técnicas eletroquímicas, a VC e EIE se destacam pela simplicidade na análise de dados, onde após uma modificação química ou biológica na superfície do eletrodo de trabalho, resultará na alteração da interface eletrodo-solução redox adjacente, culminando na variação da resistência à transferência de carga (R_{CT}).

O processo de montagem da plataforma sensora via VC e EIE pode ser observado na Fig. 1 a e b, respectivamente. A curva preta refere-se ao eletrodo limpo. Após a adsorção do MBA à superfície de ouro do eletrodo, foi observada uma queda na corrente amperométrica, resultando no fechamento dos picos catódicos e anódicos (curva vermelha, Fig.1 a) e um aumento na R_{CT} (curva vermelha, Fig1 b). Tal resposta e deve à formação de monocamadas automontadas (MAM) do MBA, reação favorecida pela interação do seu grupo tiol (-SH) com o ouro, resultando na ligação S-Au (XUE et al., 2014). Em adição, MAMs amplamente utilizadas em superfícies sensoras devido a sua estabilidade e baixo-custo, além de fornecer grupos funcionais livres para ligação com outras moléculas e partículas (HASAN; PANDEY, 2018). A ativação dos grupos carboxílicos (-COOH)

livres do MBA pelo EDC NHS e adição das $Fe_3O_4@Quit-SynoMP$ resultou no aumento da corrente com abertura dos picos (curva azul, Fig. 1 a) e redução do R_{CT} (curva azul, Fig. 1 b) devido à formação do éster NHS com cargas neutras/positivas na interface eletrodo-solução, associado à condutividade das nanopartículas adsorvidas (KELEŞTEMUR; ALTUNBEK; CULHA, 2017).

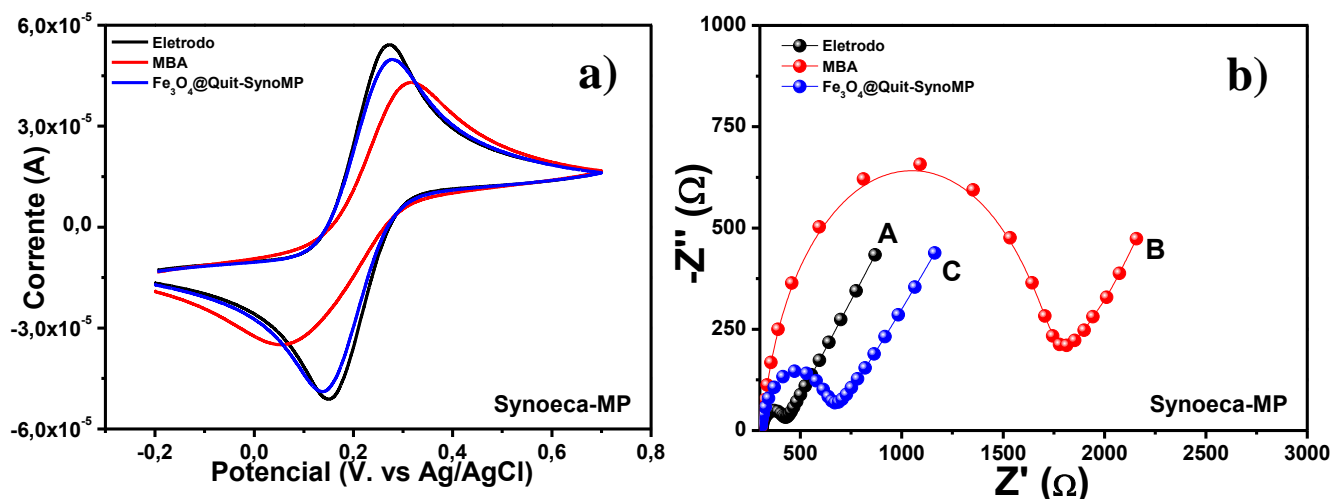


Figura 1 – Resposta voltamétrica (a) e impedimétrica (b) da montagem do sistema sensor MBA_ $Fe_3O_4@Quit-SynoMP$.

Após obtenção da resposta eletroquímica do biossensor, os testes com amostras líquidas contendo bactérias em diferentes concentrações foi iniciado. Cerca de $2\mu L$ da amostra com microorganismos foi aplicado à superfície do sensor, permanecendo adsorvido durante 5 minutos. Os resultados eletroquímicos referentes à detecção dos analitos-alvo se encontram na Fig. 2 a e b para *K. pneumoniae* e *E. faecalis*, respectivamente.

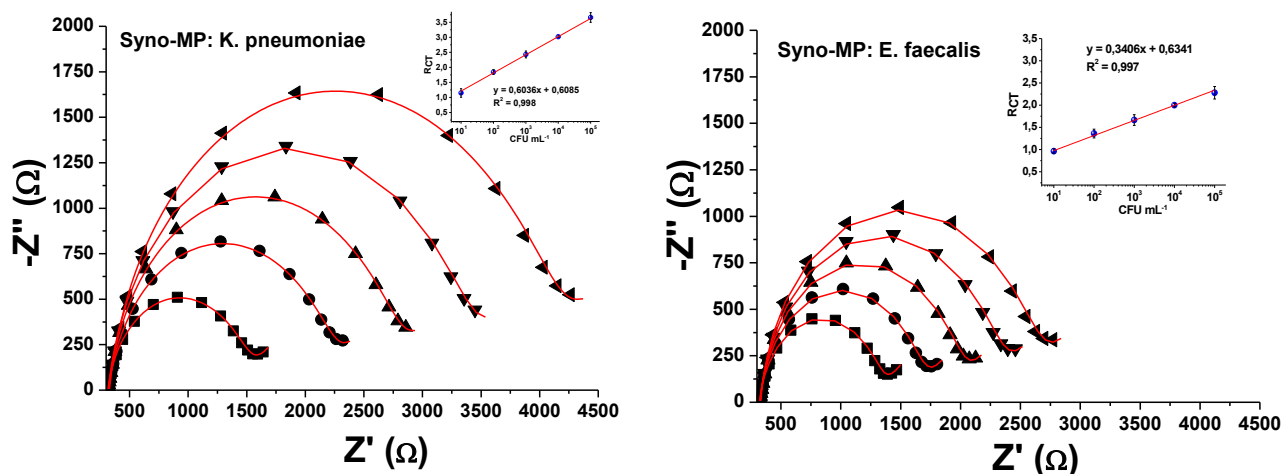


Figura 2 – Diagramas de Nyquist referentes à detecção de *K. pneumoniae* (a) e *E. faecalis* (b) por meio do biossensor. Os símbolos representam a concentração do microorganismo detectado em



termos de unidades formadoras de colônia por mL (UFC.mL⁻¹): (■) 10¹ UFC, (●) 10² UFC, (▲) 10³ UFC, (▼) 10⁴ UFC, (◀) 10⁵ UFC.

A busca por elementos de biorreconhecimento inovadores demonstraram a efetividade dos PAMs para a detecção de microorganismos patogênicos (ANDRADE et al., 2015; DE MIRANDA et al., 2017). A interação dessa classe de peptídeos com bactérias ocorre inicialmente por meio de uma interação eletrostática favorecida pela estrutura altamente catiônica dos PAMs com a superfície negativamente carregada de microorganismos como bactérias e fungos, seguida da inserção da estrutura helicoidal do PAM à bicamada lipídica microbiana (HOYOS-NOGUÉS; GIL; MAS-MORUNO, 2018). Tal característica é facilmente avaliada via EIE.

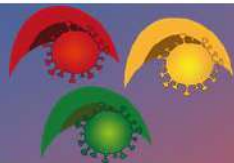
Como observado na Fig. 2, a interação com os microorganismos resultou no aumento da R_{CT}, demonstrado pelo aumento dos semicírculos de Cole-Cole proporcional ao aumento da concentração das bactérias testadas. Em adição, percebe-se que maior resposta elétrica foi referida à detecção de *K. pneumoniae*, característica resultante de sua natureza Gram-negativa, resultando em maior carga negativa devido à fina camada interna de peptidoglicano, quando comparado à espessa camada encontrada em bactérias Gram-positivas como a *E. faecalis* (QIAO et al., 2020).

4. CONCLUSÃO

O biossensor proposto composto por monocamadas de MBA e nanopartículas magnéticas contendo peptídeo antimicrobiano bioinspirado Syno-MP foi desenvolvido. Sua sensibilidade na detecção de bactérias foi avaliada via estudos impedimétricos. A interação PAM-bactéria resultou no aumento dos semicírculos referentes ao R_{CT}, sendo este aumento proporcional à concentração do analito, demonstrando detecção de *K. pneumoniae* e *E. faecalis* no limite de detecção de 10 UFC.mL⁻¹. O biossensor em questão se destaca como uma inovadora alternativa na detecção de microorganismos patogênicos, principalmente bactéria Gram-negativas.

5. REFERÊNCIAS

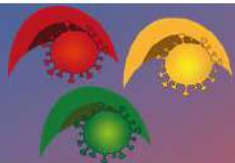
- AGARWAL, M.; SHIAU, S.; LARSON, E. L. Repeat gram-negative hospital-acquired infections and antibiotic susceptibility: A systematic review. **Journal of Infection and Public Health**, v. 11, n. 4, p. 455–462, 2018.
- AHMED, A. et al. Biosensors for whole-cell bacterial detection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 3, p. 631–646, 2014.
- ANDRADE, C. A. S. et al. Nanostructured sensor based on carbon nanotubes and clavamin A for bacterial detection. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 135, p. 833–839, 2015.
- DE MIRANDA, J. L. et al. A simple nanostructured biosensor based on clavamin A antimicrobial peptide for gram-negative bacteria detection. **Biochemical Engineering Journal**, v. 124, p. 108–114, 2017.
- FREIRE, D. O. et al. Wasp venom peptide, synoeca-MP, from *Synoeca surinama* shows antimicrobial activity against human and animal pathogenic microorganisms. **Peptide Science**, n. August, p. 1–6, 2019.
- HAMMOND, J. L. et al. Electrochemical biosensors and nanobiosensors. **Essays In Biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 69–80, 2016.
- HASAN, A.; PANDEY, L. M. Self-assembled monolayers in biomaterials. In: **Nanobiomaterials: Nanostructured Materials for Biomedical Applications**. [s.l.] Elsevier



- Ltd., 2018. p. 137–178.
- HOYOS-NOGUÉS, M.; GIL, F. J.; MAS-MORUNO, C. Antimicrobial peptides: Powerful biorecognition elements to detect bacteria in biosensing technologies. **Molecules**, v. 23, n. 7, p. 1–24, 2018.
- KELEŞTEMUR, S.; ALTUNBEK, M.; CULHA, M. Influence of EDC/NHS coupling chemistry on stability and cytotoxicity of ZnO nanoparticles modified with proteins. **Applied Surface Science**, v. 403, p. 455–463, 2017.
- KHAN, H. A.; BAIG, F. K.; MEHBOOB, R. Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 5, p. 478–482, 2017.
- MA, Y. X. et al. Considerations and Caveats in Combating ESKAPE Pathogens against Nosocomial Infections. **Advanced Science**, v. 7, n. 1, 2020.
- MADURAIVEERAN, G.; SASIDHARAN, M.; GANESAN, V. Electrochemical sensor and biosensor platforms based on advanced nanomaterials for biological and biomedical applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 103, n. December 2017, p. 113–129, 2018.
- MOBED, A. et al. Advances in detection of fastidious bacteria: From microscopic observation to molecular biosensors. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 113, p. 157–171, 2019.
- MULANI, M. S. et al. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. April, 2019.
- PARMIN, N. A. et al. Biosensor Recognizes the Receptor Molecules. In: **Nanobiosensors for Biomolecular Targeting**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. p. 195–210.
- QIAO, Z. et al. Advances in antimicrobial peptides-based biosensing methods for detection of foodborne pathogens: A review. **Food Control**, v. 112, 2020.
- RIOOL, M. et al. Antimicrobial Peptides in Biomedical Device Manufacturing. **Frontiers in Chemistry**, v. 5, n. August, p. 1–13, 2017.
- SILVA JUNIOR, A. G. et al. A simple nanostructured impedimetric biosensor based on clavanin a peptide for bacterial detection. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 255, p. 3267–3274, 2018.
- XUE, Y. et al. Quantifying thiol–gold interactions towards the efficient strength control. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 1–9, 2014.
- ZARNEGAR, Z.; SAFARI, J. Fe₃O₄@chitosan nanoparticles: A valuable heterogeneous nanocatalyst for the synthesis of 2,4,5-trisubstituted imidazoles. **RSC Advances**, v. 4, n. 40, p. 20932–20939, 2014.

6. AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores Prof. César Andrade e Isaac Morales pelo suporte no decorrer do estudo e à Profa. Maria Danielly pelo espaço no Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados e materiais fornecidos.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

PURIFICAÇÃO PARCIAL E INFLUÊNCIA DE ÍONS E AGENTES TENSOATIVOS SOBRE PROTEASES DE ORIGEM FÚNGICA

M. C. do NASCIMENTO¹, V. N. S. ALENCAR², T. P. NASCIMENTO¹, J. M. S. BARBOSA¹,
R.M.P.B. COSTA³, A. C. L. LEITE², A. L. F. PORTO¹

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal;

² Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia

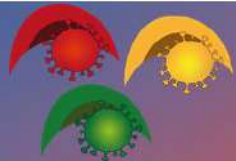
³ Universidade de Pernambuco, Instituto de Ciências Biológicas.

E-mail para contato: mclaranaascimento@hotmail.com

RESUMO – *Proteases são estudadas como material de prevenção de várias doenças, principalmente no tratamento da trombose. Pesquisas que envolvem as proteases incluem sua produção, purificação e caracterização para que sejam utilizadas com sucesso. Com isso, o objetivo desse trabalho foi a produção, partição de proteases fúngicas e a influência de íons na atividade proteásica. Para a produção da enzima foi realizada a fermentação em estado sólido utilizando o fungo isolado de solo da Caatinga, Aspergillus tamaritii Kita UCP1279, o mesmo foi inoculado em farelo de trigo (5g) durante 72h a 30°C. Após a obtenção do extrato, a amostra contendo a protease foi particionada em sistema de duas fases aquosas (SDFA) PEG/fosfato com condições determinadas por planejamento fatorial 2², sendo estudado o coeficiente de partição (K), rendimento (Y) e fator de purificação (FP). A protease particionou para a fase rica em PEG (superior), o rendimento variou de 23,74 a 95,50 % e o rendimento 0,06 a 1,94. Foi selecionado o ensaio 1 com o auxílio da estatística para a escolha do melhor ensaio para a extração da enzima. Os íons favoreceram a atividade proteásica enquanto os surfactantes inibiram, significando ser uma protease da classe metaloprotease. Contudo, tais resultados ressaltam a importância de pesquisas envolvendo proteases fúngicas com potencial de serem utilizadas no tratamento de doenças.*

Palavras - chave: peptidases, sistema de duas fases aquosas, caracterização bioquímica, biotecnologia, saúde.

ABSTRACT - *Proteases are studied as prevention material for several diseases, mainly in the treatment of thrombosis. Research involving proteases can generate their production, purification*



and characterization so that they can be used successfully. Thus, the objective of this work was the production, partition of fungal proteases and influence of activities on protein activity. For the production of the enzyme it was carried out with fermentation in the solid state, using the isolated fungus of the Caatinga, *Aspergillus tamaritii* Kita UCPI279, or it was inoculated in the wheat bran (5g) for 72h at 30°C. After sampling the extract, the prototype sample was partitioned in the two-phase aqueous system (SDFA), PEG / phosphate with test conditions by 2² factorial design, being studied or partition coefficient (K), yield (Y) and factor purification (FP). A protease partitioned for a PEG-rich phase (higher), the yield ranged from 23.74 to 95.50% and the yield 0.06 to 1.94. Assay I was selected with the aid of statistics to choose the best assay for enzyme extraction. The icons favor protein activity while surfactants are inhibited, meaning a protease of the metalloprotease class. However, these results underscore the importance of research involving fungal proteases with the potential to be used in the treatment of diseases.

Keywords: peptidases, aqueous two-phase system, biochemical characterization, biotechnology, health.

1. INTRODUÇÃO

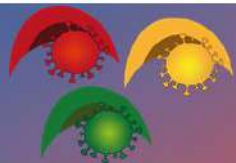
As proteases, enzimas capazes de hidrolisar proteínas, foram as primeiras enzimas a serem exploradas biotecnologicamente e possuem grande importância em diversos ramos industriais. Por estarem envolvidas em processos biológicos imprescindíveis, no ramo farmacêutico tais enzimas possuem grande importância no estudo de diversas doenças como a trombose, hepatite, Covid-19, dengue, HIV e outras (Bhardwaj *et al.*, 2020).

Para serem utilizadas com êxito, as enzimas devem passar por processos de purificação, em alguns casos restrições técnicas e econômicas os transformam em obstáculos, gerando a necessidade de redução dos processos e seu custo. Como alternativa de extração, pré-purificação ou partição de baixo custo, alta eficiência e de curto prazo destaca-se o sistema de duas fases aquosas (SDFA) (Zydney, 2016).

O sistema aquoso bifásico pode ser composto por um ou mais polímeros, ou, um polímero e um sal e água. O alto nível de água no sistema não permite a desnaturação das moléculas, o que o torna mais interessantes. A maioria dos SDFA é composto por um polímero e um sal, um dos polímeros mais usado é o Polietilenoglicol (PEG) por ter uma grande variação de peso molecular e baixa toxicidade, os sais mais usados são fosfato, citrato e cloreto de sódio. Tal técnica pode com uma única etapa clarificar, extrair e concentrar a amostra. (Iqbal *et al.*, 2016; Khan *et al.*, 2019).

Alguns estudos se baseiam na inibição da atividade proteolítica para o tratamento de doenças, já outros visam o aumento dessa atividade para combaterem anomalias. Com isso, além dos processos de produção, partição e purificação das enzimas, torna-se importante a sua caracterização bioquímica a fim de descobrir seu comportamento sob o efeito de determinados compostos (Bhardwaj *et al.*, 2020; Li, *et al.*, 2019).

Logo, o objetivo desse trabalho foi utilizar essa técnica de purificação de sistema de fases aquosas que já é conhecida como uma alternativa na pré-purificação de proteases produzidas por *Aspergillus tamaritii* Kita UCP 1279.



2. MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismo

A linhagem de *Aspergillus tamarii* Kita UCP 1279 foi isolada do solo da Caatinga através do projeto RENNORFUN/CNPq/FACEPE e encontra-se depositada na coleção de culturas da Universidade Católica de Pernambuco (UCP). O fungo foi posto em meio CZ (Czapek Dox Ágar) a 30°C durante 7 dias.

Produção de proteases por fermentação em estado sólido

O fungo *Aspergillus tamarii* Kita UCP 1279 foi inoculado no farelo de trigo (5g) com a concentração de 10^7 esporos/mL determinada por contagem microscópica em Câmara de Neubauer em uma solução salina contendo Tween 80 e NaCl a 0,9% (p/v) para a suspensão dos esporos e para a 40% de umidade foi utilizada solução nutritiva durante 72h a 30°C.

A extração foi executada utilizando água destilada na proporção de 7,5 mL para 1 g de substrato, em seguida, o extrato obtido foi filtrado utilizando papel filtro (Watman nº1) e utilizado para as posteriores análises bioquímicas (Nascimento *et al.* 2016).

Dosagem de Proteína Total

A determinação de proteína total foi de acordo com Smith *et al.* (1985) utilizando albumina do soro bovino (BSA) como padrão.

Atividade Proteásica

A atividade proteásica foi determinada de acordo com Ginther (1979) e o substrato utilizado foi azocaseína a 1% (p/v). Uma unidade de enzima proteolítica foi definida como a quantidade de enzima para produzir um aumento na absorbância de 0,1 em 1 hora a 420nm.

Extração das proteases utilizando Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA)

O SFDA foi preparado com concentrações distintas de soluções de mistura de sais de fosfato de sódio e 50% de soluções de PEG a $25^\circ\text{C} \pm 2$ de acordo com o desenho estatístico 2^2 , onde serão verificadas as variáveis: concentração de fosfato de sódio e concentração de PEG, nas variáveis respostas: rendimento (Y), coeficiente de partição (K) e fator de purificação (PF), com quatro repetições nos pontos centrais.

Definição das equações do SDFA

O coeficiente de partição (K) foi definido como a razão da atividade proteásica na fase superior sobre a fase inferior ($K=A_s/A_i$) onde, A é a atividade (U/mL) e os índices “s” e “i” representam as fases superior e inferior, respectivamente.

O fator de purificação (FP) foi definido como a razão da atividade específica da fase inferior (AEi) pela atividade específica do extrato bruto (AEe). Onde, a atividade específica (AE) foi definida como a razão da atividade proteásica (U/mL) pela concentração de proteína (mg/mL).

O rendimento da atividade (Y) foi definido como a razão da atividade total na fase inferior pela atividade total do extrato bruto e expressa como porcentagem: $Y=(A_i.V_i/A_e.V_e).100$ onde, A_i e A_e são as atividade proteásica na fase inferior e extrato enzimático, respectivamente. V_i e V_e são os volumes da fase inferior e extrato enzimático, respectivamente.

Influência de íons e surfactantes



Para determinar o efeito de íons e surfactantes durante a atividade proteásica da enzima, foram utilizados os seguintes compostos: cloreto de cálcio, zinco, sulfato de magnésio, sulfato de ferro, sulfato de cobre, Tween 20, Tween 80, Triton X-100 e Dodecil sulfato de sódio (SDS) a concentração de 2.5 mM.

Em tubos foram colocados 200µL da enzima pré-purificada e 200µL do íon/surfactante. Os ensaios ficaram em banho maria a 37°C durante 60min, após isso foi feita a atividade proteásica.

Análise estatística dos resultados

Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 95%, utilizando o Software *Statistica* 8.0 (Statsoft Inc, 2008).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de proteases por *Aspergillus tamaraii* Kita UCP 1279 em substrato de farelo de trigo na fermentação em estado sólido com 72 horas atingiu atividade proteolítica de 64,07 U/mL. O resultado se mostra superior quando comparado a resultados de outros autores, como o de Novelli *et al.* (2016), que apresentou um resultado 130% menor (27,28 U/mL) em sua pesquisa com o gênero *Aspergillus* sob as mesmas condições de estudo (substrato, tipo de fermentação e horas), e Alves *et al.* (2017) que também realizaram estudos com *Aspergillus tamaraii* e observaram 60,3 U/mL na produção de proteases durante 72h.

Em relação a extração por sistema de duas fases aquosas PEG/fosfato, em todos os ensaios ocorreu a formação das duas fases imiscíveis, isso porque a composição do sistema apresenta valores acima da curva de equilíbrio, condição essencial para a formação de fases.

Os resultados da partição das proteases produzidas por *Aspergillus tamaraii* Kita UCP 1279 podem ser encontrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Atividade proteolítica e partição das proteases por SDFa PEG/Fosfato de sódio por planejamento fatorial 2²

Ensaio	C _{PEG} ^a (%)	C _{sal} ^b (%)	AP _{sal} ^c (U/mL)	AP _{PEG} ^d (U/mL)	K ^e	Y _{sal} ^f (%)	FP _{sal} ^g	Y _{PEG} ^h (%)	FP _{PEG} ⁱ
1	12,5	10	23,76	3,73	0,15	95,50	1,94	12,69	0,37
2	17,5	10	23,96	6,04	0,26	88,90	1,83	23,74	0,06
3	12,5	15	15,96	25,13	1,57	74,03	1,02	69,92	2,15
4	17,5	15	14,83	18,33	1,23	45,85	1,02	65,17	1,46
5 ^j	15	12,5	19,43	19,08	1,01	60,07	1,73	76,50	1,6
6 ^j	15	12,5	20,08	21,00	1,00	83,58	1,82	61,66	1,78
7 ^j	15	12,5	18,23	22,00	1,20	78,90	1,06	68,00	2,02
8 ^j	15	12,5	19,16	21,06	1,09	79,98	1,64	65,12	1,84

a Concentração de PEG; b Concentração de sal; c Atividade proteolítica no PEG; d Atividade proteolítica no sal; e Coeficiente de partição das proteases; f Índice de recuperação das proteases na fase inferior; g Fator de purificação das proteases na fase inferior; h Índice de recuperação das proteases na fase superior; i Fator de purificação das proteases na fase superior; j Ponto central; Valores em negrito representam o ensaio com a melhor extração da protease.



A maioria dos ensaios da Tabela 1 demonstrou o coeficiente de partição maior que um ($K > 1$), enfatizando que as proteases particionaram para a fase do sistema rica em PEG. Apenas dois ensaios (1 e 2) apresentaram $K < 1$, o que significa que as proteases desses ensaios particionaram para a fase rica em sal. Conforme mostra a Figura 1A, a análise estatística demonstra que a variável que mais influenciou nesse resultado foi a concentração do sal, ou seja, o aumento da concentração do sal fez com que a enzima particionasse para a fase superior. Siqueira *et al.* (2020) ao realizar a extração de proteases produzidas por *Aspergillus tamaris* URM 4634 através do SDA PEG/Fosfato também observou a preferência da biomolécula pela fase rica em polietilenoglicol. O maior índice de recuperação (Y) foi visto na fase inferior do sistema, ensaio 1 (95,50%). Conforme mostra a Figura 1B, o gráfico de Pareto constata que a concentração de sais de fosfato foi a variável que mais influenciou no fator de purificação (FP) das proteases presentes na fase inferior, onde estão os maiores valores. Os resultados do fator de purificação demonstram-se superiores aos encontrados por Barros *et al.* (2014) em seu experimento de purificação de proteases produzidas por *Penicillium restrictum* através de SDA.

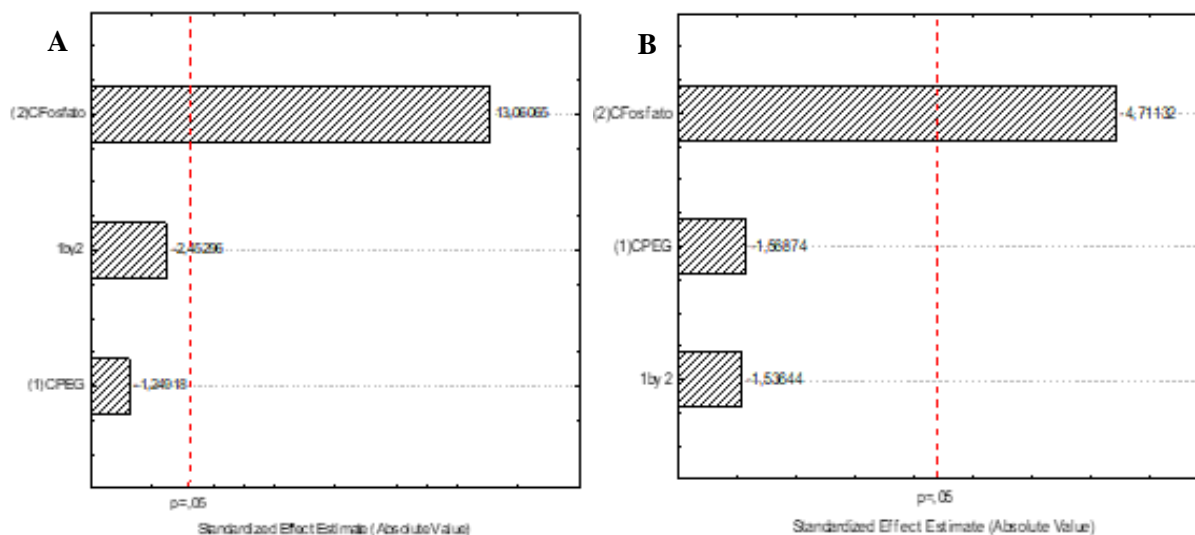


Figura 1A – Gráfico de Pareto apresentando a influência das variáveis no coeficiente de partição (K) das proteases produzidas por *Aspergillus tamaris* Kita UCP 1279. Figura 1B – Gráfico de Pareto demonstrando a interferência das variáveis no fator de purificação das proteases produzidas por *Aspergillus tamaris* Kita UCP 1279.

Os resultados do estudo da influência de íons e tensoativos sob a atividade proteolítica da protease produzida podem ser encontrados na Tabela 2.



Tabela 2 – Influência de íons metálicos e detergentes na atividade proteásica da enzima proteolítica produzida por *Aspergillus tamaris* Kita UCP 1279.

Íons	Atividade Residual (%)	Surfactantes	Atividade Residual (%)
Controle	100	Controle	100
CaCl ₂	102	Tween 20	96
ZnSO ₄	117	Tween 80	95
CuSO ₄	124	Triton X-100	88
FeSO ₄	172	SDS	86

Todos os íons proporcionaram um aumento na atividade proteásica da enzima, destacando-se entre eles o sulfato de ferro e o sulfato de cobre que aumentaram, respectivamente, em 72 e 24% a atividade proteásica. Resultados semelhantes foram vistos em estudos anteriores como o de, Ao *et al.* (2018) ao caracterizar bioquimicamente a protease produzida por *Aspergillus oryzae* Y1 constatou que tais íons são estimulantes ao aumento da atividade proteásica. Já os surfactantes, todos, inibiram a atividade da enzima variando entre valores de 4 a 14% na diminuição da atividade. Esse resultado é correlativo com o de Zheng *et al.* (2020) em seu estudo com proteases de *Neurospora crassa* que também evidenciou a inibição da atividade proteásica por SDS (27%). Visto que a enzima aumenta a sua atividade na presença de íons metálicos ela pode ser componente da classe metaloprotease.

4. CONCLUSÃO

Os resultados são promissores, visto que a linhagem de *Aspergillus tamaris* Kita UCP 1279 isolada da Caatinga do Estado de Pernambuco é boa produtora de proteases. A concentração de sal foi a variável mais importante na partição de ambas as enzimas para a fase superior (PEG), o que pode ser explicado pelo fato de o sal agir na carga elétrica das moléculas. O sistema de duas fases aquosas PEG/Fosfato demonstrou ser uma técnica eficaz ao extrair, concentrar e ao garantir maior seletividade na separação da molécula. A influência dos íons e tensoativos demonstra que tal protease pertence à classe das metaloproteases.

5. REFERÊNCIAS

ALVES, R. O. *et al.* Purificação de proteases de *Aspergillus tamaris* URM4634 por cromatografia de troca iônica. *Rev. Bras. Agrotec.*, v. 7, n. 2, p. 329-334, 2017.

AO, X. *et al.* Purification and characterization of neutral protease from *Aspergillus oryzae* Y1 isolated from naturally fermented broad beans. *AMB Express*, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018.

BARROS, K. V. G. *et al.* PEG/NaPA aqueous two-phase systems for the purification of proteases expressed by *Penicillium restrictum* from Brazilian Savanna. *Process Biochemi.*, v. 49, n. 12, p. 2305-2312, 2014.

BHARDWAJ, V. K. *et al.* Identification of bioactive molecules from Tea plant as SARS-CoV-2 main protease inhibitors. *J. Biomol. Struct. and Dyn.*, n. just-accepted, p. 1-13, 2020.



GINTHER, C. L. Sporulation and the production of serine protease and cephamycin C by *Streptomyces lactamdurans*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.15, p.522-526, 1979.

IQBAL, M. *et al.* Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. *Biol. proced. online*, v. 18, n. 1, p. 18, 2016.

KHAN, B. M.; CHEONG, K.; LIU, Y. ATPS: “Aqueous two-phase system” as the “answer to protein separation” for protein-processing food industry. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v. 59, n. 19, p. 3165-3178, 2019.

LI, H. *et al.* Characterization of a novel *Mycobacterium tuberculosis* serine protease (Rv3194c) activity and pathogenicity. *Tuberculosis*, v. 119, p. 101880, 2019.

NASCIMENTO, T. P. *et al.* Purification of a fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 by aqueous two-phase systems (PEG/sulfate). *J. Chromatogr. B*, v. 1025, p. 16-24, 2016.

NOVELLI, P. K.; BARROS, M. M.; FLEURI, L. F. Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization. *Food Chem.*, v. 198, p. 119-124, 2016.

SIQUEIRA, J. G. W. *et al.* Extraction of protease from *Aspergillus tamarii* URM 4634 in aqueous two-phase system under continuous and discontinuous process. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, p. 1-8, 2020.

SMITH, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.

ZHENG, Liufeng *et al.* Production and characterization of a novel alkaline protease from a newly isolated *Neurospora crassa* through solid-state fermentation. *LWT*, v. 122, p. 108990, 2020.

ZYDNEY, A. L. Continuous Downstream Processing for High Value Biological Products: A Review. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 113, n. 3, 2016.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos a contribuição da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco, a Universidade Federal de Pernambuco e a Universidade Federal Rural de Pernambuco por proporcionar excelentes condições para o desenvolvimento dessa pesquisa.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

CAPTURA DE ANTICORPOS ANTI-ZIKAV COM MEMBRANAS NANOESTRUTURADAS ELETROFIADAS

D. M. SILVA¹, I.A.M. FRÍAS¹, M.D.L. OLIVEIRA¹
e C.A.S. ANDRADE¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica, Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados;

E-mail para contato: cesar.sandrade@ufpe.br

RESUMO – *A infecção pelo vírus Zika ganhou grande destaque ao ser associado a graves complicações neurológicas e sua possível ligação com a Síndrome de Guillain Barré. O seu diagnóstico ainda é um desafio, visto que os métodos convencionais possuem um alto custo econômico. Diante da necessidade de um diagnóstico preciso e de baixo custo, este trabalho propõe o uso de nanofibras produzidas por eletrofição funcionalizadas com proteína NS1 e utilizadas para captura de anticorpos anti-ZIKAV. Cada membrana foi capaz de capturar 30µg de anticorpo com uma eficiência de recuperação do 98%.*

PALAVRAS-CHAVE: *Eletrofição; Anticorpos; Captura; Nanotecnologia.*

ABSTRACT – *Zika virus infection became a significant concern after its association with severe neurological complications and its possible connection with Guillain Barré Syndrome. Its diagnosis is still a challenge since conventional methods have a high economic cost. In view of the need for an accurate and low-cost diagnosis, this work proposes the use of electrospun nanofibers functionalized with NS1 protein and used to capture anti-ZIKAV antibodies. Each membrane was able to capture 30 µg of the antibody with a recovery efficiency of 98%.*

KEYWORDS: *Electrospinning; Antibodies; Capture; Nanotechnology.*

1. INTRODUÇÃO

O Zika vírus (ZIKAV) pertence ao grupo dos arbovírus, conjunto de vírus que se hospedam em artrópodes e que, neste caso, é transmitido para o ser humano através da picada do mosquito infectado. O ZIKAV ganhou grande notoriedade mundial ao ser associado a distúrbios neurológicos e malformações neonatais, como também sua ligação como possível fator de risco para o desenvolvimento da síndrome de Guillain Barré (KRAUER et al., 2017). No Brasil, com a presença de outras arboviroses que apresentam similaridade etiológica, o diagnóstico clínico do ZIKAV torna-se desafiador em regiões com co-circulação de outros arbovírus (CABRAL-



CASTRO et al., 2016; HEINZ, 2017; SHARP et al., 2019). Assim, o diagnóstico do ZIKAV é feito principalmente através do ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e da reação em cadeia da polimerase (PCR), métodos que necessitam de estrutura física especializada e equipe técnica qualificada, o que inviabiliza seu uso na rotina comum. Os biossensores, por sua vez, apresentam-se como alternativas de baixo custo que podem oferecer um método diagnóstico rápido e preciso. Com o uso da eletrofição, produzimos fibras em escalas nanométricas com características que atendem idealmente aos requisitos desejados para sensores. Tais fibras eletrofiadas, são altamente promissoras no uso de sensores, devido à sua estrutura porosa e grande área superficial, fornecendo elevada interação molecular (HAIDER et al., 2018; MURTHE, 2019; XUE et al., 2019). Além da sua facilidade de produção, as fibras eletrofiadas podem ser funcionalizadas por processos químicos e/ou físicos que permitem a melhoria de propriedades customizadas para cada uso. Desta forma, neste trabalho investigamos o uso de fibras nanoestruturadas mediante sua funcionalização na captura de biomoléculas e seu potencial uso como biodispositivo para diagnóstico.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Os materiais utilizados foram: polivinil álcool [PVA (C_2H_4O)_n], alginato de sódio, N-hidroxisuccinimida (NHS), 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) carbodiimida (EDC), ácido clorídrico (HCl), glutaraldeído [OHC (CH₂)₃CHO], álcool metílico (CH₃OH) e água ultrapura obtida do sistema de purificação de água Synergy.

Métodos

A eletrofição das fibras foi realizada utilizando um sistema composto por uma fonte de alta tensão, uma placa metálica coletora, recoberta com papel alumínio, sob aterramento e uma seringa descartável de 20 mL, com uma agulha de ponta plana, acoplada numa bomba de infusão, contendo a solução polimérica. As amostras foram eletrofiadas na tensão de 24kV, com tempo de processamento entre 3-6 horas, numa velocidade de injeção de 0.5µL/min a 1µL/min. A distância de trabalho entre a agulha e a placa coletora foi de 13 cm. As soluções para a produção das fibras, foram preparadas duas soluções separadamente, uma de PVA e outra de alginato de sódio. Para a solução de PVA foi utilizado 16g de PVA que foi solubilizado em 100 mL de água ultrapura sob aquecimento. Para a solução de alginato de sódio foi utilizado 2g de alginato de sódio que foi solubilizado em 100 mL de água ultrapura em temperatura ambiente. Em ambas as soluções foi utilizado agitação magnética. Por fim, foi misturado ambas as soluções na seguinte proporção: 13,34 mL da solução de PVA para 6,66 mL da solução de alginato de sódio. Para reticulação das membranas de PVA/Alginato foi utilizada uma solução contendo 99 mL de álcool metílico, 1 mL de glutaraldeído e 100 µL de ácido clorídrico puro. A solução foi resfriada durante 30 min. As fibras foram colocadas na solução e deixadas sob refrigeração. Após 2 dias, as fibras foram retiradas da solução e lavadas com água ultrapura para sua utilização. Após o processo de reticulação, as fibras foram lavadas com água e deixadas em estufa para secagem do material na temperatura de 50°C. Logo depois, foram cortadas em pequenos discos e colocadas num filtro para seringa, onde foi testada sua capacidade para passagem de água. Permitindo a passagem de água, as amostras foram funcionalizadas com EDC/NHS para posteriormente imobilizar covalentemente a proteína antígeno que servirá como alvo para captura do anticorpo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As membranas a serem empregadas para a imobilização da proteína NS1 foram lavadas por passagem de 200 mL de água ultrapura, monitorando a sua limpeza pela espectroscopia de absorção UV-Vis, garantindo assim absorção zero nos comprimentos de onda dentro da faixa 250-300 nm. A partir da concentração da solução de sonda NS1, calculamos que 50 µg de sonda foram imobilizados covalentemente na membrana. Em se tratando de um sistema de captura específico 1:1, esta quantidade de massa imobilizada se converte então em nosso limite máximo possível de anticorpo a ser capturado. Finalmente, uma vez realizada a imobilização covalente da proteína NS1, novamente as membranas foram lavadas com aproximadamente 100 mL de água para garantir a não presença de proteína NS1 livre (não imobilizada) sobre a membrana confirmado pela ausência de fluorescência durante os lavados. A captura do anticorpo foi monitorada pela espectroscopia de fluorescência, assim, foram obtidos resultados a respeito da captura gradativa de anticorpos específicos para a proteína imobilizada, o lavado da membrana e a posterior extração do anticorpo. Na Figura 1A são mostrados os resultados da captura do anticorpo que foi realizada passando através da membrana, durante 4 vezes consecutivas, 3 mL de uma solução de anticorpo. Desta maneira, pode ser observada a diminuição gradativa da concentração de anticorpos presentes nessa solução, indicando que após cada passagem, a membrana continuava a capturar anticorpo.

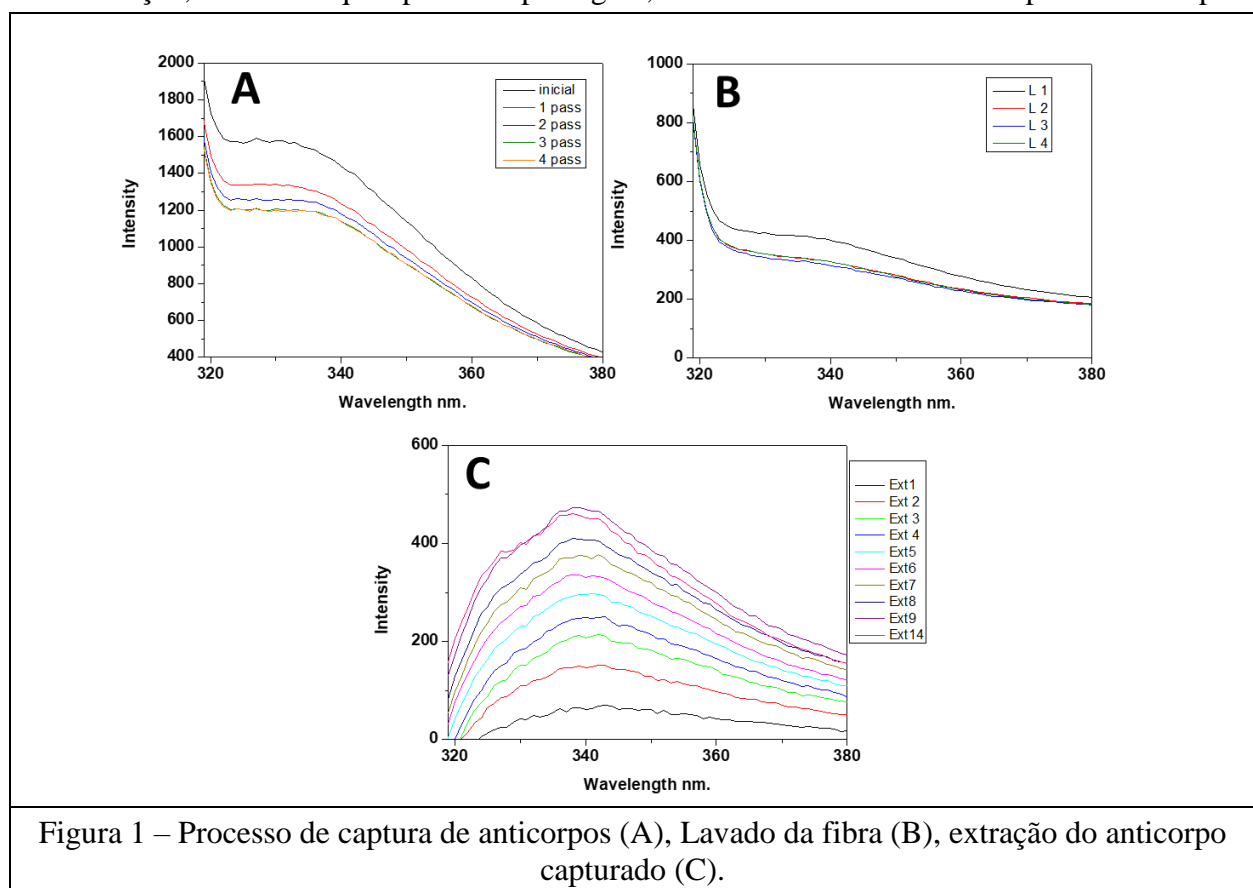
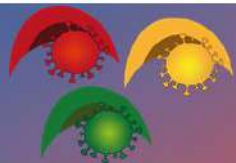


Figura 1 – Processo de captura de anticorpos (A), Lavado da fibra (B), extração do anticorpo capturado (C).

Na quarta passagem, e passagens posteriores, a intensidade da fluorescência se manteve a mesma, demonstrando o limite de captura da membrana. Após a captura do anticorpo, a fibra foi lavada com água, com a intenção de lavar o anticorpo que não tivesse sido capturado pela proteína NS1.



Inicialmente, houve um leve desprendimento no primeiro lavado, porém nas três lavagens subsequentes não ocorreu sinal de fluorescência, indicando assim o equilíbrio da membrana como mostra a Figura 1B. Finalmente, para proceder com a recuperação do anticorpo capturado pela proteína NS1, a membrana foi lavada diversas vezes com 3 mL de uma solução tampão fosfato pH 3.15, onde a diferença de pH promove a separação do anticorpo ligado especificamente à proteína NS1, como indica a Figura 1C. Como pode ser observado, ao realizar a recirculação dos 3mL de tampão fosfato pela membrana, a concentração de anticorpo aumenta na solução de dessorção, evidenciado pelo incremento da intensidade da fluorescência. A partir da circulação 9, a fluorescência manteve-se constante pelo que este limite foi caracterizado como concentração máxima desprendida de anticorpo. Analisando com uma curva de calibração, nossos resultados de captura indicam que a massa de anticorpo capturado é estabilizada próxima de 30 µg, sendo a recuperação do material capturado de 98%. O tempo de dessorção é de aproximadamente 5 min, sem contar o tempo necessário para realizar as medidas de fluorescência entre cada passagem.

4. CONCLUSÃO

No presente trabalho, foi demonstrado que as fibras produzidas através da técnica de eletrofiação, foram adequadas para seu processamento através da reticulação. As membranas selecionadas demonstraram ser resistentes à passagem de água, o que possibilitou sua posterior funcionalização com a proteína NS1, alvo especificamente complementar empregado na promoção da captura do seu anticorpo específico para ZIKAV. Os testes de captura de anticorpos foram realizados com sucesso devido à ausência de interferentes que pudessem atrapalhar na leitura das medidas de fluorescência, mostrando assim o seu potencial uso como biodispositivo para diagnóstico.

5. REFERÊNCIAS

- CABRAL-CASTRO, M. J. et al. Molecular and serological techniques to detect co-circulation of DENV, ZIKAV and CHIKV in suspected dengue-like syndrome patients. *J. Clin. Virol.*, v.82, p. 108-111, 2016.
- HAIDER, A. et al. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arab. Jour. Chem.*, v.11, n. 8, p. 1165-1188, 2018.
- HEINZ, F. X.; STIASNY, K. The antigenic structure of Zika vírus and its relation to other flaviviruses: implications for infection and immunoprophylaxis. *Micr. Mole. Biol. rev.*, v.81, n. 1, 2017.
- KRAUER, F. et al. Zika vírus infection as a cause of congenital brain abnormalities and Guillain-Barré syndrome: systemic review. *PLoS medic.*, v.14, n. 1, p. e1002203, 2017.
- MURTHE, S. S. et al. Electrospun Nanofibers for Biosensing Applications. *Nano. Biom. Targ.*, p.253-267, 2019.
- SHARP, T. M. et al. Dengue and Zika vírus diagnostic testing for patients with a clinically compatible illness and risk for infection with both viruses. *MMWR Recom. Repor.*, v. 68, n.1, p.1, 2019.
- XUE, J. et al. Electrospinning and electrospun nanofibers: methods, materials and applications. *Chem. rev.*, v. 119, n. 8, p. 5298-5415, 2019.



6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos às agências de fomento CAPES, CNPq e FACEPE pelo financiamento do respectivo trabalho e pelas bolsas PIBIC e Pós-Doutorado.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

APLICAÇÃO DE UM BIOSSENSOR DE DNA EM CAMADA AUTOMONTADA PARA A IDENTIFICAÇÃO DE TIPOS ONCOGÊNICOS DE HPV EM AMOSTRAS DE cDNA

L. S. OLIVEIRA¹, K. Y. P. S. AVELINO^{1,2}, N. LUCENA-SILVA³, C. A. S. ANDRADE^{1,2} e M. D. L. OLIVEIRA^{1,2}.

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica, Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados;

² Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica;

³ Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

E-mail para contato: ony.soares@gmail.com

RESUMO – Atualmente, são conhecidos mais de 200 genótipos de HPV subdivididos de acordo com o seu potencial oncogênico em tipos de baixo risco e de alto risco. Os tipos de alto risco são responsáveis por alterações citogenéticas que levam ao desenvolvimento de cânceres. Os métodos moleculares de diagnóstico utilizados na pesquisa do HPV consistem na reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-PCR) e ensaios de captura híbrida. Essas técnicas apresentam obstáculos que limitam seu amplo uso, como sensibilidade limitada, altos custos e protocolos complexos. Em contraste, os biossensores são biodispositivos analíticos que possuem rápido tempo de análise, baixo custo, elevada sensibilidade, além da possibilidade de miniaturização, portabilidade e automação. Nesse cenário, esse trabalho tem o objetivo de desenvolver um biodispositivo baseado em uma camada automontada de polipirrol (PPy), nanoestruturas de ouro (AuNs), cisteamina (Cys) e sonda de DNA, visando o diagnóstico de HPV. Após a obtenção do genossensor, o eletrodo modificado foi exposto a amostras clínicas de pacientes infectados com HPV16, 31, 33, 45 e 58. Todas as etapas de construção e ensaios de bioatividade do dispositivo bioanalítico foram caracterizados por voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). Nos estudos de biointeração do biossensor frente a amostras genômicas se percebeu alterações no perfil eletroquímico com a diminuição das correntes amperométricas e aumento da resposta impedimétrica, evidenciando o processo de biorreconhecimento. Portanto, o sensor desenvolvido demonstra ser promissor e com real impacto na rotina de diagnóstico do HPV, podendo resultar em melhor prognóstico para os pacientes.

Palavras-chave: Biossensor. Genossensor. HPV. Voltametria cíclica.

ABSTRACT – Currently, more than 200 HPV genotypes are known subdivided according to their



oncogenic potential into low-risk and high-risk types. High-risk types are responsible for cytogenetic changes that lead to the development of cancers. The molecular diagnostic methods used in HPV research consist of real-time quantitative polymerase chain reaction and hybrid capture assays. These techniques present obstacles that limit their wide use, such as limited sensitivity, high costs and complex protocols. In contrast, biosensors are analytical biodevices that have fast analysis time, low cost, high sensitivity, and the possibility of miniaturization, portability and automation. In this scenario, this work aims to develop a biodevice based on a self-assembled layer of polypyrrole (Ppy), gold nanostructures (AuNs), cysteamine (Cys) and DNA probe, aiming at the diagnosis of HPV. After obtaining the genosensor, the modified electrode was exposed to clinical samples from patients infected with HPV16, 31, 33, 45 e 58. All stages of construction and bioactivity tests of the bioanalytical device were characterized by cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). In biointeraction studies of the biosensor in the face of genomic samples, changes in the electrochemical profile were noticed with the decrease in amperometric currents and an increase in the impedimetric response, evidencing the biorecognition process. Therefore, the sensor developed shows to be promising and with real impact on the routine of HPV diagnosis, which may result in a better prognosis for patients.

Keywords: Biosensor. Genosensor. HPV. Cyclic Voltammetry.

1. INTRODUÇÃO

O câncer cervical é o quarto câncer mais frequentemente diagnosticado e a quarta principal causa de morte por câncer em mulheres, sendo ocasionado pela infecção persistente de HPV de alto risco (BRAY et al., 2018). Assim a classificação oncogênica do HPV é de extrema importância para o direcionamento da terapêutica dos pacientes infectados. Entretanto, a diferenciação do HPV é uma tarefa desafiadora, pois todas as linhagens de HPV estão intimamente relacionadas. As principais técnicas moleculares utilizadas para o diagnóstico são *Southern Blots*, *Dot Blots*, hibridização *in situ*, ensaios de captura híbrida e RT-PCR. Porém essas técnicas possuem limitações como seletividade variável, protocolos extensos, alto custo, longo tempo de resposta, necessidade de pessoal treinado, além de equipamentos avançados e a necessidade de reagentes específicos. Diante disso, a capacidade de determinar a presença e o tipo e HPV de forma rápida, sensível, específica e de baixo custo é de extrema importância para um método diagnóstico apropriado (MAHMOODI et al., 2019; RASOULI et al., 2018).

Nos últimos anos, os biossensores têm recebido considerável atenção por serem ferramentas analíticas que detectam alvos específicos de forma simples e rápida. Além disso, possuem grande aplicabilidade no monitoramento de distintas doenças, tais como, doenças infecciosas, genéticas, crônico-degenerativas e cardiovasculares. Outras qualidades atrativas dos biossensores são a capacidade de automação, portabilidade e miniaturização com protocolos simples, sem a necessidade de grandes volumes de amostras ou longos períodos de análise (ROSARIO; MUTHARASAN, 2014). Dentre os tipos de biossensores, os eletroquímicos demonstram um futuro promissor por serem altamente específicos e capazes de discriminar perturbações mínimas no sistema. Como por exemplo, genossensores também chamados de biossensores de DNA que conseguem detectar alterações em sequências de DNA com substituições de apenas um nucleotídeo. Além disso, também possuem uma alta produtividade, quantificação confiável de variantes genéticas e biomarcadores de DNA a um baixo custo e com alta sensibilidade (XU et al.,



2017; HUANG et al., 2018).

A evolução da nanotecnologia e dos estudos dos nanomateriais contribuiu para a resolução de diversos problemas, como também, auxiliou no aumento da qualidade desses sistemas de detecção. Isso ocorreu pela da incorporação de nanopartículas metálicas, nanotubos, nanofibras e nanocompósitos na elaboração de biossensores nanoarquitetados, resultando em uma maior qualidade analítica desses sistemas (FARKA et al., 2017; AVELINO et al., 2020). As AuNs são largamente utilizadas por suas características de elevada área de superfície, capacidade de ancoragem de diversas moléculas biológicas, biocompatibilidade e fácil síntese (WANG et al., 2016; AVELINO et al., 2020). Outra categoria de materiais importantes são os polímeros intrinsecamente condutores (ICPs) que têm demonstrado uma ótima viabilidade proporcionando novos designs e adjetivos na construção de sensores bioquímicos, com fácil polimerização. Alguns dos polímeros mais utilizados em biossensores são a polianilina, politiofeno e polipirrol (VELASCO et al., 2019).

A VC é uma das principais técnicas utilizadas na análise e desenvolvimento de biossensores e fornece informações qualitativas e quantitativas de uma espécie química, que são obtidas a partir do registro de curvas corrente-potencial, feitas durante a eletrólise em uma célula eletroquímica. A VC possibilita o acompanhamento de cada etapa de construção do sensor através da análise das correntes de pico anódicas (ipa) e catódicas (ipc) dos voltamogramas cíclicos (ALEIXO, 2003). A EIE é uma técnica eficaz para examinar as propriedades interfaciais da superfície do eletrodo durante o processo de montagem do biossensor. Na EIE, o diâmetro do semicírculo do espectro é igual a resistência à transferência de carga, R_{ct} . Esta resistência reflete a cinética de transferência de elétrons entre o par redox da solução eletrolítica e o eletrodo utilizado como plataforma sensora (OLIVEIRA et al., 2011; LUNA et al., 2015).

Diante desse contexto acerca do HPV e seu diagnóstico, o principal objetivo desse estudo é desenvolver um biossensor de DNA eletroquímico baseado em uma camada automontada para a identificação de HPV de alto risco. Dessa forma, espera-se que a nova ferramenta analítica seja capaz de gerar um impacto significativo no prognóstico de pacientes com HPV.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 CONSTRUÇÃO DA PLATAFORMA NANOESTRUTURADA

Os eletrodos de ouro foram utilizados como superfície de trabalho para construção do genossensor. Em seguida, foi realizada a eletropolimerização do filme polimérico de PPy, a partir de uma solução de ácido clorídrico a 0,5M contendo o monômero pirrol a uma concentração de 30 mM. Através da técnica de voltametria cíclica, foram aplicados seis ciclos de polimerização em uma faixa de potencial de -0,2 a +0,7 V com uma velocidade de varredura de 100 mV.s⁻¹. Posteriormente, foi feita a deposição eletroquímica de AuNs, por meio de uma solução de ácido tetracloroauríco a 0,25 mM. Nesta etapa, foram realizados dez ciclos voltamétricos com uma faixa de potencial de +0,2 a -1 V e velocidade de varredura de 50 mV.s⁻¹. Em sequência, moléculas de Cys a 2 mg/mL foram adicionadas ao sistema através da técnica de drop-coating. Após a modificação do eletrodo com PPy-AuNs-Cys, a sonda de DNA específica para o reconhecimento de grupo de HPV de alto risco foi imobilizada covalentemente através do agente reticulante glutaraldeído. Por fim, os sítios inespecíficos do biossensor de DNA foram bloqueados por meio de uma solução de BSA a 1% (pH 7,4).

2.2 ENSAIOS DE BIORECONHECIMENTO

Após a obtenção do sistema PPy-AuNs-Cys-Sonda_{DNA}-BSA, foram realizados testes de biodeteção com amostras clínicas de pacientes infectados especificamente com HPV16, 31, 33, 45 e 58 (amostras de cDNA). As amostras de cDNA foram utilizadas na concentração fixa de 100 pg.μL⁻¹ e foram preparadas com solução salina de tampão fosfato (PBS; pH 7,4) e mantidas congeladas. Em cada ensaio, o biossensor foi exposto a 5 μL do analito por 15 minutos para promover o processo de biorreconhecimento através da hibridação.

2.3 AVALIAÇÃO ELETROQUÍMICA

Os experimentos de VC e EIE foram realizados após cada etapa de montagem do biossensor e ensaios de bioreconhecimento na presença de uma solução de 10 mM de ferroferricianeto de potássio (K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆]) (1:1) como indicador redox (OLIVEIRA et al., 2011). Em adição, foi utilizada uma célula eletroquímica composta por três eletrodos acoplados a um Potenciostato/Galvanostato Autolab PGSTAT 128N. A superfície modificada com PPy-AuNs-Cys-Sonda_{DNA} foi utilizada como eletrodo de trabalho, o eletrodo de Ag/AgCl saturado com KCl a 3M e o eletrodo de platina foram usados, respectivamente, como eletrodo de referência e contra-referência.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a padronização da construção do biossensor foi estabelecido um padrão voltamétrico e impedimétrico demonstrado na figura 1, onde observamos alterações no perfil eletroquímico da plataforma em cada etapa de construção. Foi possível perceber alterações nos voltamogramas cíclicos de acordo com o material imobilizado na superfície, caracterizando a modificação e construção das camadas automontadas (Figura 1a). Os resultados de EIE corroboraram e confirmaram os resultados obtidos na VC, através de alterações nos diâmetros dos semicírculos nos diagramas de Nyquist em cada etapa de montagem (Figura 1b).

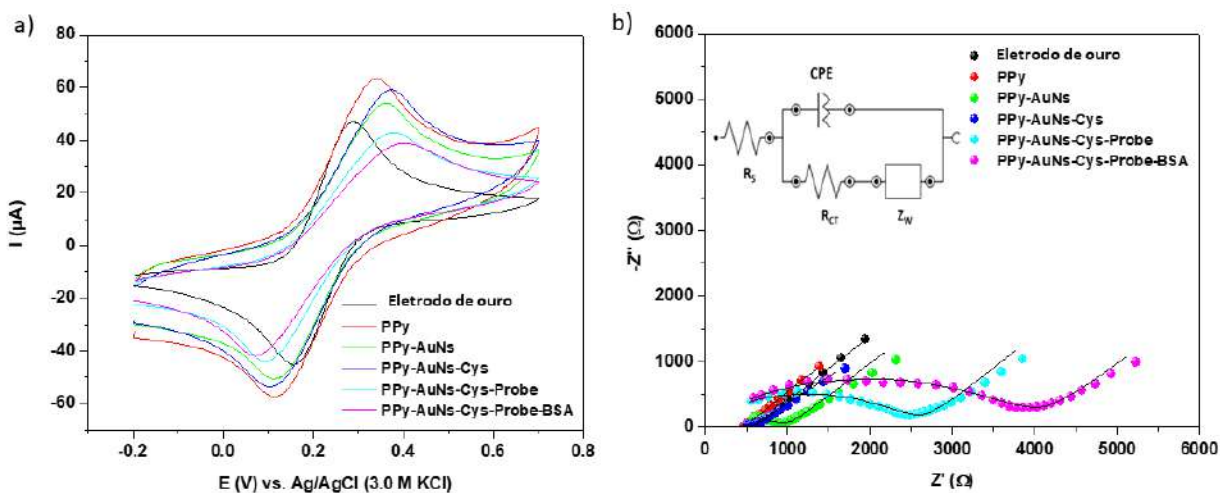


Figura 1 – Voltamogramas cíclicos (a) e diagramas de Nyquist com inserção do circuito equivalente de Randles (b) para a padronização do biossensor.

Na figura 2 podemos observar os ensaios de biodeteção, onde foi possível constatar que modificações eletroquímicas ocorreram de acordo com a exposição do biossensor as amostras de cDNA de pacientes infectados com HPV (tipos 16, 31, 33, 45 e 58). Essas alterações eletroquímicas foram observadas através da EIE onde ocorreu um aumento da R_{ct} quando comparadas ao padrão do biossensor. Isso ocorre porque o anelamento entre o analito alvo e a sonda oligonucleotídica ocasiona o aumento da repulsão eletrostática entre os grupos fosfatos da molécula híbrida de DNA carregados negativamente com o par redox negativo da solução eletrolítica. Como consequência, a transferência de elétrons é dificultada, causando mudanças no padrão eletroquímico. Sendo esse processo indicativo de bioreconhecimento (BENVIDI et al., 2015; AVELINO et al., 2016; 2020).

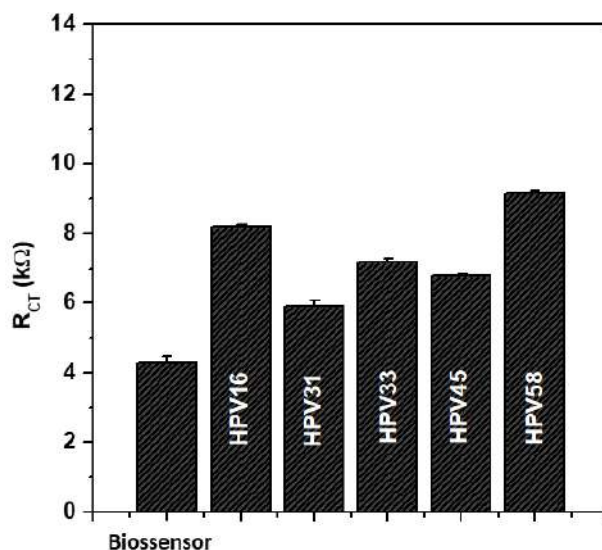


Figura 2 – R_{ct} do biossensor e dos ensaios de biodeteção com amostras do HPV16, 31, 33, 45 e 58 (cDNA) concentração de $100 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

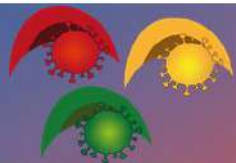
4. CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, podemos constatar que o biossensor de DNA construído é capaz de detectar tipos de HPV de alto risco permitindo essa classificação inicial quanto ao grau oncogênico. Em adição, é uma ferramenta com rápida resposta analítica, sensível, seletiva e simples, apresentando elevada capacidade bioanalítica. Portanto, o biossensor desenvolvido poderá ser utilizado no diagnóstico de HPV resultando em um melhor direcionamento de prognóstico dos pacientes infectados através de um rastreamento mais rápido e eficaz.

5. REFERÊNCIAS

ALEIXO, L. M. Voltametria: conceitos e técnicas. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2003.

AVELINO, K. Y. P. S. et al. Metal-polymer hybrid nanomaterial for impedimetric detection of human papillomavirus in cervical specimens. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*,



p. 113249, 2020.

AVELINO, K. Y. P. S. et al. Attomolar electrochemical detection of the BCR/ABL fusion gene based on an amplifying self-signal metal nanoparticle-conducting polymer hybrid composite. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 148, p. 576-584, 2016.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

BENVIDI, A. et al. Ultrasensitive DNA sensor based on gold nanoparticles/reduced graphene oxide/glassy carbon electrode. *Analytical biochemistry*, v. 484, p. 24-30, 2015.

FARKA, Z. et al. Nanoparticle-based immunochemical biosensors and assays: recent advances and challenges. *Chemical reviews*, v. 117, n. 15, p. 9973-10042, 2017.

HUANG, R.; HE, N.; LI, Z. Recent progresses in DNA nanostructure-based biosensors for detection of tumor markers. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 109, p. 27-34, 2018.

LUNA, D. M. N. et al. Electrochemical immunosensor for dengue virus serotypes based on 4-mercaptobenzoic acid modified gold nanoparticles on self-assembled cysteine monolayers. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 220, p. 565-572, 2015.

MAHMOODI, P. et al. Early detection of cervical cancer based on high-risk HPV DNA-based genosensors: A systematic review. *Biofactors*, v. 45, n. 2, p. 101-117, 2019.

OLIVEIRA, M. D. L. et al. Development of impedimetric and optical calcium biosensor by using modified gold electrode with porcine S100A12 protein. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 82, n. 2, p. 365-370, 2011.

RASOULI, E. et al. Advancements in electrochemical DNA sensor for detection of human papilloma virus-A review. *Analytical biochemistry*, v. 556, p. 136-144, 2018.

ROSARIO, R.; MUTHARASAN, R. Nucleic acid electrochemical and electromechanical biosensors: a review of techniques and developments. *Reviews in Analytical Chemistry*, v. 33, n. 4, p. 213-230, 2014.

VELASCO, A. X. V.; ROMO, J. J. R.; DURAN, H. A. E. Modified graphite biosensor with polypyrrole (PPY) and MWCNT-NH₂. In: *Journal of Physics: Conference Series. IOP Publishing*, 2019. p. 012003.

WANG, N. et al. Functionalized gold nanoparticles/reduced graphene oxide nanocomposites for ultrasensitive electrochemical sensing of mercury ions based on thymine–mercury–thymine structure. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 79, p. 320-326, 2016.

XU, S. et al. Real-time reliable determination of binding kinetics of DNA hybridization using a multi-channel graphene biosensor. *Nature communications*, v. 8, p. 14902, 2017.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, FINEP, FACEPE, UFPE e Propesq pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

IMOBILIZAÇÃO DE PROTEASES EM NANOPARTICULAS: UMA BREVE REVISÃO

B. V. B. REGUEIRA¹, M. T. T. do COUTO¹, M. M. da SILVA², R. M. P. B. COSTA³, T. P. NASCIMENTO⁴, A. C. L. LEITE¹, A. L. F. PORTO⁴

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas;

² Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão, Laboratório de Nanotecnologia, Biotecnologia e Cultura Celular;

³ Universidade de Pernambuco, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Avanços em Biotecnologia de Proteínas;

⁴ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Laboratório de Tecnologia de Produtos Bioativos;

E-mail para contato: brunovbregueira@gmail.com

RESUMO – *As proteases são enzimas que possuem uma ampla aplicação industrial e médica, elas representam cerca de 60% do total de enzimas. No intuito de apresentar uma maior estabilidade térmica e pH, muitas proteases vêm sendo utilizadas em diferentes suportes e metodologias de imobilização, esse é um dos métodos mais inovadores e recentes que vêm sendo estudados para aumentar a eficácia das atividades dessas enzimas e promover superação de algumas limitações. Nesse sentido o objetivo dessa revisão narrativa foi de analisar os mais recentes estudos e artigos dos últimos 20 anos, pesquisados nas bases de dados: www.sciencedirect.com, www.scopus.com e www.pubmed.ncbi.nlm.nih.gov, nesses artigos foram observados os diferentes tipos de suporte e métodos de imobilização para enzimas proteolíticas com diferentes aplicações biotecnológicas. Portanto, tornou-se importante a imobilização de proteases nesses materiais para garantir um aprimoramento da sua funcionalidade e permitir o desenvolvimento de medicamentos ou de outras aplicações industriais dessas enzimas de forma segura e eficaz.*

Protease, nanopartículas, imobilização.

ABSTRACT - *Proteases are enzymes which have a wide industrial and medical application, they represent about 60% among total enzymes. In order to present greater thermal stability and pH, many proteases have been used in different support and immobilization methodologies, this is one of the most innovative and recent methods that have been studied to increase the effectiveness of*



these enzymes' activities and overcoming some limitations. Regarding this, the objective of this narrative review was to analyze the most recent studies and articles from the last 20 years, researched in the databases: www.sciencedirect.com, www.scopus.com and www.pubmed.ncbi.nlm.nih.gov, in these articles the different kinds of support and methods of immobilization for proteolytic enzymes with different biotechnological applications were observed. Therefore, it became important to immobilize proteases in these materials to ensure an improvement in their functionality and allow the development of drugs or other industrial applications of these enzymes in a safe and effective way.

Protease, nanoparticles, immobilization.

1. INTRODUÇÃO

As proteases são consideradas as enzimas mais importantes do ponto de vista industrial, representando cerca de 60% do total das vendas mundiais de enzimas (Diyanat *et al.*, 2018). As proteases medeiam inúmeras atividades biológicas e são industrialmente importantes devido às suas amplas aplicações no processamento de couro, indústria de detergentes, indústrias alimentícias, farmacêutica, indústria têxtil, etc. (Hamada *et al.*, 2017). Como todas as enzimas, as proteases catalisam reações químicas complexas, porém apresentam algumas limitações, como a baixa estabilidade e a dificuldade de poderem ser reutilizadas nos processos industriais.

O sistema de imobilização de enzimas é um dos mais inovadores e recentemente vêm sendo estudado para aumentar a eficácia das atividades e superar algumas limitações. Em comparação com as formas livres, enzimas imobilizadas apresentam maior estabilidade térmica e de pH, podem ser facilmente manipuladas e removidas da mistura de reação, levando a produtos puros, e são reutilizáveis, reduzindo o custo dos produtos formados (Homaei, 2017). Além disso, a imobilização garante a enzima maior resistência à ação de inibidores e, no caso das proteases, maior resistência à autólise (Yücel, 2012). Vários tipos de suportes podem ser utilizados para imobilizar uma enzima, através de diferentes métodos de ligação da enzima nesses suportes (Tavano *et al.*, 2013). A utilização de um suporte e método de imobilização adequado pode promover à enzima uma ótima atividade e alta estabilidade (Duarte Neto *et al.*, 2017).

As aplicações das enzimas imobilizadas incluem o processamento e produção de alimentos, medicamentos, biodiesel, tratamento de águas residuais industriais, têxteis e detergentes (Shukla e Singh, 2016). Sendo os suportes magnéticos, especialmente nanopartículas magnéticas, amplamente utilizados para a imobilização de enzimas, nos campos das pesquisas biológicas e médicas (Kim *et al.*, 2005). Nesse sentido, o objetivo desse artigo de revisão foi analisar os mais recentes tipos de suporte e métodos de imobilização para enzimas proteolíticas com diferentes aplicações biotecnológicas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizada uma revisão narrativa com artigos dos últimos 20 anos, pesquisados nas bases de dados: www.sciencedirect.com, www.scopus.com e www.pubmed.ncbi.nlm.nih.gov.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As proteases são um grupo de enzimas cuja função catalítica é hidrolisar as ligações peptídicas das proteínas e decompô-las em proteínas menores, poli peptídeos ou aminoácidos livres



(Mehdi *et al.*, 2018). As proteases são de grande importância para a manutenção da vida, sendo encontradas em todos os seres vivos e constituem o maior grupo de enzimas encontrado no corpo humano (Rogers e Overall, 2013). Estas enzimas desempenham funções fisiológicas complexas e são importantes em vias regulatórias e metabólicas.

As proteases são consideradas o grupo mais importante de enzimas industriais, com uma grande variedade de aplicações industriais e biotecnológicas, representando cerca de 60% do mercado total de enzimas em todo o mundo e 40% das vendas totais de enzimas (Soares *et al.*, 2013). Essas enzimas podem ser obtidas a partir de plantas, órgãos animais e micro-organismos, sendo a maioria obtida de fontes microbianas. Atualmente, uma grande proporção de proteases disponíveis comercialmente é derivada de bactérias e fungos (Raj *et al.*, 2012).

No entanto, a estabilidade destas enzimas é baixa, e ainda há desafios na sua reciclagem, que limitam suas aplicações em produção industrial (Jin *et al.*, 2010). Existem muitas abordagens, como a engenharia de proteínas, o uso de aditivos e a imobilização, para melhorar a estabilidade da enzima. Entre os métodos de modificação das enzimas, a imobilização enzimática é preferida devido à facilidade de manuseamento e recuperação do catalisador (Aslani *et al.*, 2018).

A utilização de enzimas imobilizadas pode trazer muitas vantagens em relação ao uso da enzima nativa, como isolamento, possibilidade de reuso e aumento de estabilidade (Werner *et al.*, 1982). Elas são geralmente mais estáveis em solventes orgânicos e resistentes a variações de pH e temperatura (Aslani *et al.*, 2018). Além disso, no caso das proteases, a taxa do processo de autólise pode ser drasticamente reduzida após a imobilização (Cherry *et al.*, 2003; Massolini *et al.*, 2005).

Diferentes suportes podem ser utilizados para imobilização de uma enzima via diferentes processos físicos ou químicos, envolver diferentes partes e atingir diferentes orientações da enzima (Tavano *et al.*, 2013). O uso de um suporte apropriado em condições de imobilização adequadas pode proporcionar alta estabilidade e ótima atividade à enzima (Duarte Neto *et al.*, 2017). As propriedades de suporte ideais incluem resistência física à compressão, hidrofobicidade, inércia em relação às enzimas, facilidade de derivatização, biocompatibilidade, resistência a ataque microbiano e disponibilidade a baixo custo (Foresti e Ferreira, 2007).

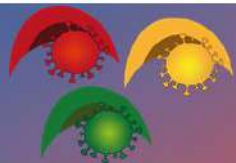
Vários materiais poliméricos naturais como celulose, alginato, quitina, colágeno, carragenina, quitosana, amido, sefrose, pectina, etc. são comumente usados como materiais de suporte (Datta *et al.*, 2013). Uma variedade de suportes inorgânicos também é usada para a imobilização de enzimas, como por exemplo, alumina, sílica, zeólitas, sílicas mesoporosas e partículas magnéticas (Hudson *et al.*, 2008; Hartmann e Kostrov, 2013). Nos últimos anos, com os avanços na nanotecnologia, os materiais nanoestruturados têm sido bastante utilizados na imobilização de enzimas, devido ao seu tamanho reduzido, grande área superficial, baixa toxicidade, alta capacidade de carga enzimática e resistência mínima à transferência de massa, e com isso, maior eficiência catalítica e estabilidade da enzima (Neri *et al.*, 2008; Jordan *et al.*, 2011).

Os métodos de imobilização de enzimas em suportes inertes incluem adsorção, ligações dissulfeto, ligação iônica, ligação covalente, reticulação, encapsulamento, quelação de metais, conjugação enzimática e aprisionamento enzimático (Mattiasson, 2018). Entre esses métodos, a ligação covalente atrai atenção devido à estabilidade da combinação entre os suportes e as enzimas. A Tabela 1 a seguir apresenta alguns estudos onde foram utilizados diferentes suportes e métodos de imobilização de proteases obtidas a partir de diferentes fontes.



Tabela 1 – Diferentes suportes e métodos de imobilização de proteases.

Obtenção da Protease	Suporte de Imobilização	Método de Imobilização	Recuperação da atividade enzimática após a imobilização (%)	Referências
<i>Panaeus vannamei</i>	Nanopartículas de ZnO	--	90,0	Diyanati et al., 2013
<i>Helianthus annuus L.</i>	Material de quitina e amido	Adsorção, ligação iônica e ligação covalente	46,2 e 2,5	Mehdi et al., 2018
<i>Bacillus subtilis</i>	Nanopartículas de Fe ₃ O ₄	--	47,8	Jin et al., 2010
<i>Bacillus subtilis</i>	Nanopartículas de Fe ₃ O ₄	--	70,0	Sahu et al., 2016
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	Nanopartículas de Fe ₃ O ₄	--	74,0	Duarte Neto et al., 2017
<i>Bacillus subtilis</i>	Nanopartículas magnéticas	Ligação covalente	66,5	Ibrahim et al., 2016
<i>Bacillus sp.</i>	Nanopartículas de sílica	Adsorção e ligação covalente	60,0	Sinha e Khare, 2014
<i>Bacillus subtilis</i>	Alginato de cálcio	Aprisionamento enzimático	0,4	Anwar et al., 2009
<i>Bacillus licheniformis</i>	Dois suportes de sílica quimicamente distintos	Ligação Covalente	39,0 e 62,0	Ferreira et al., 2002
<i>Bacillus licheniformis</i>	Agregados enzimáticos reticulados	--	39,7	Bashir et al., 2018
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	Quitosana	Reticulação	92,8	Cavello et al., 2014
<i>Pseudomonas sp.</i>	Diferentes matrizes poliméricas	Aprisionamento enzimático	-	Sankaralingam et al., 2012
	Poliamida	Ligação covalente	58,0	



*Conidiobolus
macrosporus*

Tanksale et al.,
2001

*Myceliophthora
sp.*

Alginato de
cálcio

Aprisionamento
enzimático

-

Zanphorlin et
al., 2010

*Streptomyces
avermectinus*

Alginato de
cálcio

Adsorção, ligação
iônica, ligação
covalente e
aprisionamento
enzimático

86,1

Shayeb et al.,
2007

4. CONCLUSÃO

Nos últimos 20 anos, uma variedade de suporte e métodos de imobilização foram desenvolvidos com a capacidade e a biocompatibilidade de imobilizar proteases oriundas de diferentes fontes. É nítido que na escolha do melhor revestimento para a protease é levado em conta fatores como características de superfície do nanomaterial, sua aplicação biotecnológica, estabilidade da atividade da enzima e a conjugação da protease com o tipo de ligante utilizado. Embora as nanopartículas para imobilização de proteases ainda não tenham atingido totalmente sua segurança e eficiência, devido a diferentes desafios enfrentados como alto custo e principalmente sua aplicação quando utilizado *in vivo*, novos e diferentes estudos devem ser realizados para o aprimoramento e aplicação desse tipo de imobilização.

5. REFERÊNCIAS

ANWAR, A.; QADER, S. A. U.; RAIZ, A.; IQBAL, S.; AZHAR, A. Calcium Alginate: A Support Material for Immobilization of Proteases from Newly Isolated Strain of *Bacillus subtilis* KIBGEHAS. *World Appl Sci J*, v.7, n.10, p. 1281-1286, 2009.

ASLANI, E.; ABRI, A.; PAZHANG, M. Immobilization of trypsin onto $Fe_3O_4.SiO_2 -NH_2$ and study of its activity and stability. *Colloid Surfaces B*, v. 170, p. 553-562, 2018.

BASHIR, F.; ASGHER, M.; HUSSAIN, F.; RANDHAWA, M. A. Development and characterization of cross-linked enzyme aggregates of thermotolerant alkaline protease from *Bacillus licheniformis*. *Int J Biolog Macromol*, v. 113, 944-951, 2018.

CAVELLO, I. A.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; CAVALITTO, S. F. Immobilization of a keratinolytic protease from *Purpureocillium lilacinum* on genipin activated-chitosan beads. *Process Biochem*, v. 49, n. 8, p. 1332-1336, 2014.

CHERRY, J. R.; FIDANTSEF, A. L. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Curr Opin Biotech*, v. 14, n. 4, p. 438-443, 2003.



DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2013.

DIYANAT, S.; HOMAELI, A.; MOSADDEGH, E. Immobilization of *Penaeus vannamei* protease on ZnO nanoparticles for long-term use. *Int J Biol Macromol*, v. 118, p. 92-98, 2018.

DUARTE NETO, J. M. W.; MACIEL, J. C.; CAMPOS, J. F.; CARVALHO JUNIOR, L. B.; MARQUES, D. A. V.; LIMA, C. A.; PORTO, A. L. F. Optimization of *Penicillium aurantiogriseum* protease immobilization on magnetic nanoparticles for antioxidant peptides obtainment. *Prep Biochem Biotech*, v. 47, n. 7, p. 644-654, 2017.

FERREIRA, L.; RAMOS, M.; DORDICK, J.; GIL, M. Influence of different silica derivatives in the immobilization and stabilization of a *Bacillus licheniformis* protease (Subtilisin Carlsberg). *J Mol Catal B: Enzymatic*, v. 21, n. 4, p. 189-199, 2003.

FORESTI, M.; FERREIRA, M. Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterifications. *Enzyme Microb Tech*, v.40, n. 4, p. 769-777, 2007.

HAMADA, S.; KUBOTA, K.; SAGISAKA, M. Purification and characterization of a novel extracellular neutral metalloprotease from *Cerrena albocinnamomea*. *J Gen Appl Microbiol*, v. 63, n. 1, p. 51-57, 2017.

HARTMANN, M.; KOSTROV, X. Immobilization of enzymes on porous silicas—benefits and challenges. *Chem Soc Rev*, v. 42, p. 6277-6289, 2013.

HOMAELI, A. Immobilization of *Penaeus merguensis* alkaline phosphatase on gold nanorods for heavy metal detection. *Ecotox Environ Safe*, v. 136, p. 1-7, 2017.

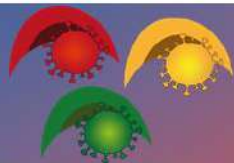
HUDSON, S.; COONEY, J.; MAGNER, E. Proteins in mesoporous silicates. *Angewandte Chemie (International ed. In English)*, v. 47, n. 41, p. 8582-8594, 2008.

IBRAHIM, A. S. S.; EL-TONI, A. M.; AL-SALAMAH, A. A.; ALMAARY, K. S.; EL-TAYEB, M. A.; ELBADAWI, Y. B., ANTRANIKIAN, G. Development of novel robust nanobiocatalyst for detergents formulations and the other applications of alkaline protease. *Bioproc Biosyst Eng*, v. 39, n.5, p. 793-805, 2016.

JIN, X.; LI, J. F.; HUANG, P. Y.; DONG, X. Y.; GUO, L. L.; YANG, L.; CAO, Y. C.; WEI, F.; ZHAO, Y.; CHEN, H. Immobilized protease on the magnetic nanoparticles used for the hydrolysis of rapeseed meals. *J Magn Magn Mater*, v. 322, n. 14, p. 2031-2037, 2010.

JORDAN, J.; KUMAR, C. S. S. R.; THEEGALA, C. Preparation and characterization of cellulase-bound magnetite nanoparticles. *J Mol Catal B: Enzym*, v. 68, n. 2, p. 139-146, 2011.

KIM, J.; LEE, J.; NA, H. B.; KIM, B. C.; YOUN, J. K.; KWAK, J. H.; MOON, K.; LEE, E.; KIM, J.; PARK, J.; DOHNALKOVA, A.; PARK, H. G.; GU, M. B.; CHANG, H. N.; GRATE, J. W.; HYEON, T. A magnetically separable, highly stable enzyme system based on nanocomposites of



enzymes and magnetic nanoparticles shipped in hierarchically ordered, mesocellular, mesoporous silica. *Small*, v. 1, p. 1203-1207, 2005.

MASSOLINI, G.; CALLERI, E. Immobilized trypsin systems coupled on-line to separation methods: Recent developments and analytical applications. *J Sep Sci*, v. 28, p. 7-21, 2005.

MATTIASSON, B. Immobilization methods. In: Immobilized Cells and Organelles. *CRC Press*, v. 1, p. 3-26, 2018.

MEHDI, W. A.; MEHDE, A. A.; ÖZACAR, M.; ÖZACAR, Z. Characterization and immobilization of protease and lipase on chitin-starch material as a novel matrix. *Int J Biol Macromol*, v. 117, p. 947-958, 2018.

NERI, D. F. M.; BALCÃO, V. M.; COSTA, R. S.; FERREIRA, E. M. F. C.; TORRES, D. P. M.; RODRIGUES, L. R.; JR, L. B. C.; TEIXEIRA, J. A. B-Galactosidase from *Aspergillus oryzae* immobilized onto different magnetic supports : A comparative experimental and modelling study of the galactooligosaccharides production. p. 1036-1041, 2008.

RAJ, A.; KHESS, N.; PUJARI, N.; BHATTACHARYA, S.; DAS, A.; RAJAN, S. S. Enhancement of protease production by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from dairy effluent sludge and determination of its fibrinolytic potential. *Asian Pac J Trop Biomed*, v. 2, n. 3, p. 1845-1851, 2012.

ROGERS L. D.; OVERALL C. M. Proteolytic post-translational modification of proteins: Proteomic tools and methodology. *American Soc for Biochem Mol Biol*, v. 12, n. 12, p. 3532-3542, 2013.

SAHU, A.; BADHE, P. S.; ADIVAREKAR, R.; LADOLE, M. R.; PANDIT, A. B. Synthesis of glycinamides using protease immobilized magnetic nanoparticles. *Biotechnology Reports*, v. 12, p. 13-25, 2016.

SANKARALINGAM, S.; SHANKAR, T.; SENDESHKANNAN, K.; RAMASUBBURAYAN, R.; PRAKASH, S. Production of Protease from *Pseudomonas* sp. by Immobilization Approach on Different Matrices. *Eur J Appl Sci*, n. 4, v. 4, p. 146-156, 2012.

SHAYEB, N. M. A. E.; AHMED, S. A.; SAMIA A.; AHMED, AL-DOMANY, A. R.; SALEH, S.; SALEH, S. Optimization, immobilization of extracellular alkaline protease and characterization of its enzymatic properties. *Res J Agriculture Biolog Sci*, n. 4, v. 5, p. 434-446, 2008.

SINHA, R.; KHARE, S. K. Immobilization of halophilic *Bacillus* sp. EMB9 protease on functionalized silica nanoparticles and application in whey protein hydrolysis. *Bioproc Biosyst Eng*, v. 38, n. 4, p. 739-748, 2014.

SOARES, F. E. F.; BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V.; GENIÊR, H. L. A.; GOUVEIA, A. S.; QUEIROZ, J. H. Nematicidal activity of three novel extracellular proteases of the nematophagous fungus *Monacrosporium sinense*. *Parasitol Res*, v. 112, n. 4, p. 1557-1565, 2013.



SHUKLA, R. J.; SINGH, S. P. Structural and catalytic properties of immobilized α -amylase from *Laceyella sacchari* TSI-2. *Int J Biol Macromol*, v. 85, p. 208-216, 2016.

TANKSALE, A.; CHANDRA, P. M.; RAO, M.; DESHPANDE, V. Immobilization of alkaline protease from *Conidiobolus macrosporus* for reuse and improved thermal stability. *Biotech Letters*, v. 23, p. 51-54, 2001.

TAVANO, O. L.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GOULART, A. J.; MONTI, R. Optimization of the immobilization of sweet potato amylase using glutaraldehyde-agarose support. Characterization of the immobilized enzyme. *Process Biochem*, v. 48, n. 7, p. 1054-1058, 2013.

WERNER, M.; GARRETT, C.; CHIU, A.; KLEMPNER, L. The biological role of enzyme attachment and immobilization. *Clin Chem*, v. 28, n. 12, p. 2351-2358, 1982.

YÜCEL, Y. Optimization of immobilization conditions of *Thermomyces lanuginosus* lipase on olive pomace powder using response surface methodology. *Biocatal Agric Biotechnol*, v. 1, n. 1, p. 39-44, 2012.

ZANPHORLIN, L. M.; FACCHINI, F. D. A.; VASCONCELOS, F.; BONUGLI-SANTOS, R. C.; RODRIGUES, A.; SETTE, L. D.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. Production, partial characterization, and immobilization in alginate beads of an alkaline protease from a new thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. *J Microbiol*, n.48, v.3, p.331–336, 2010.

6. AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

TERAPÊUTICA À BASE DE GELATINA: UMA MINI-REVISÃO

F.A. MATOS¹, B.A.M. COSTA², A.L.F. PORTO² e V.M. OLIVEIRA²

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Graduando em Licenciatura em Ciências Biológicas, Departamento de Biologia.

²Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, DMFA, Laboratório de Tecnologia de Produtos Bioativos, LABTECBIO.

E-mail para contato: vagne_melo@hotmail.com

RESUMO – A gelatina é um biopolímero produzido a partir da hidrólise do colágeno, por meio ácido (Gelatina Tipo A) ou alcalis (Gelatina Tipo B). A gelatina tem sido obtida de mamíferos (bovinos e suínos, principalmente) e, recentemente, de peixes. Por possuir propriedades físico-químicas e reológicas de interesse industrial, tem sido amplamente empregada em medidas terapêuticas. Assim, esta mini-revisão objetivou elencar as principais aplicações terapêuticas da gelatina extraída de mamíferos e de peixes como forma de compilar os dados disponíveis na literatura científica. Para tanto, foram utilizados os seguintes sites científicos: ScienceDirect, Elsevier, Springer, TandFonline, PubMed, Wiley Online Library e o Google Scholar. De acordo com o volume de publicações, a gelatina tem sido indicada para utilização como composto nutracêutico (possui funções anti-hipertensiva, antioxidante, anticâncer e antimicrobiana, por exemplo), na engenharia de tecidos, na cicatrização de feridas, formação óssea e doenças relacionadas aos ossos, na terapia gênica, com papel anti-adesão e até na preparação de embalagens com propriedades antimicrobianas. Com isso, o campo de utilização da gelatina mostra-se promissor, e a tendência é que fontes alternativas desse biopolímero possam ser cada vez mais exploradas.

Palavras-chave: biopolímero, colágeno, proteína, nutracêutico, peixes.

ABSTRACT–Gelatin is a biopolymer produced from the hydrolysis of collagen, using acid (Gelatine Type A) or alkalis (Gelatine Type B). Gelatine has been obtained from mammals (mainly cattle and pigs) and, recently, from fish. Due to its physico-chemical and rheological properties of industrial interest, it has been widely used in therapeutic measures. Thus, this mini-review aimed to list the main therapeutic applications of gelatine extracted from mammals and fish as a way of compiling the data available in the scientific literature. For this, the following scientific sites were used: ScienceDirect, Elsevier, Springer, TandFonline, PubMed, Wiley Online Library and Google Scholar. According to the volume of publications, gelatine has been indicated for use as a nutraceutical compound (it has antihypertensive, antioxidant, anticancer and antimicrobial functions, for example), in tissue engineering, wound healing, bone formation and related diseases



bone, in gene therapy, with anti-adhesion paper and even in the preparation of packages with antimicrobial properties. With this, the field of use of gelatin is promising, and the trend is that alternative sources of this biopolymer can be increasingly explored.

Keywords: biopolymer, collagen, protein, nutraceutical, fish.

1. INTRODUÇÃO

Os biomateriais fornecem uma ampla gama de oportunidades interessantes na biomedicina (Sun; Wang, 2015), sobretudo através das propriedades biológicas dos biopolímeros envolvidos, como a gelatina (Milakin *et al.*, 2020). A gelatina é um biopolímero natural derivado de colágeno e que tem sido amplamente utilizado em aplicações de medicina regenerativa ao longo dos anos, devido às suas propriedades de resposta às células e à capacidade de fornecer uma ampla variedade de biomoléculas (Echave *et al.*, 2019).

A gelatina é uma substância sólida, sem sabor e incolor (Lv *et al.*, 2019). Pode ser obtida através da hidrólise controlada de colágeno de várias fontes, sendo, então, dividida em dois tipos: Tipo A (através do processo de extração ácida, pI 7-9) e Tipo B (extraído por álcalis, pI 4,7-5,4) (Ahmad *et al.*, 2017). A gelatina pode ser classificada de acordo com a fonte de obtenção em: gelatina bovina, gelatina suína ou gelatina de peixe. A gelatina bovina e a suína são amplamente utilizadas pelo mercado comercial devido ao seu preço relativamente mais baixo e disponibilidade substancial. No entanto, como a encefalopatia espongiforme bovina, a febre aftosa e a influenza suína se tornaram problemas de saúde pública, além das restrições de produtos suínos nos países e comunidades muçulmanos e judeus (proíbem o consumo de qualquer carne de porco ou produtos relacionados à carne bovina), a gelatina de peixe recebeu muita atenção não apenas porque é uma alternativa confiável para os outros tipos de gelatinas, mas também devido às suas propriedades e aplicações funcionais únicas (Huang *et al.*, 2019; Lv *et al.*, 2019).

As vantagens atraentes da gelatina, como sua estrutura adesiva celular, baixo custo, disponibilidade imediata, alta biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa imunogenicidade, entre outras, tornaram-no um candidato desejável para o desenvolvimento de biomateriais. A gelatina pode ser formulada na forma de nanopartículas, adotada como agente de revestimento de superfície e misturada com biopolímeros sintéticos e/ou naturais, formando estruturas compostas (Sun; Wang, 2015). Assim, esta mini-revisão objetivou elencar as principais aplicações terapêuticas da gelatina extraída como forma de compilar os dados disponíveis na literatura científica.

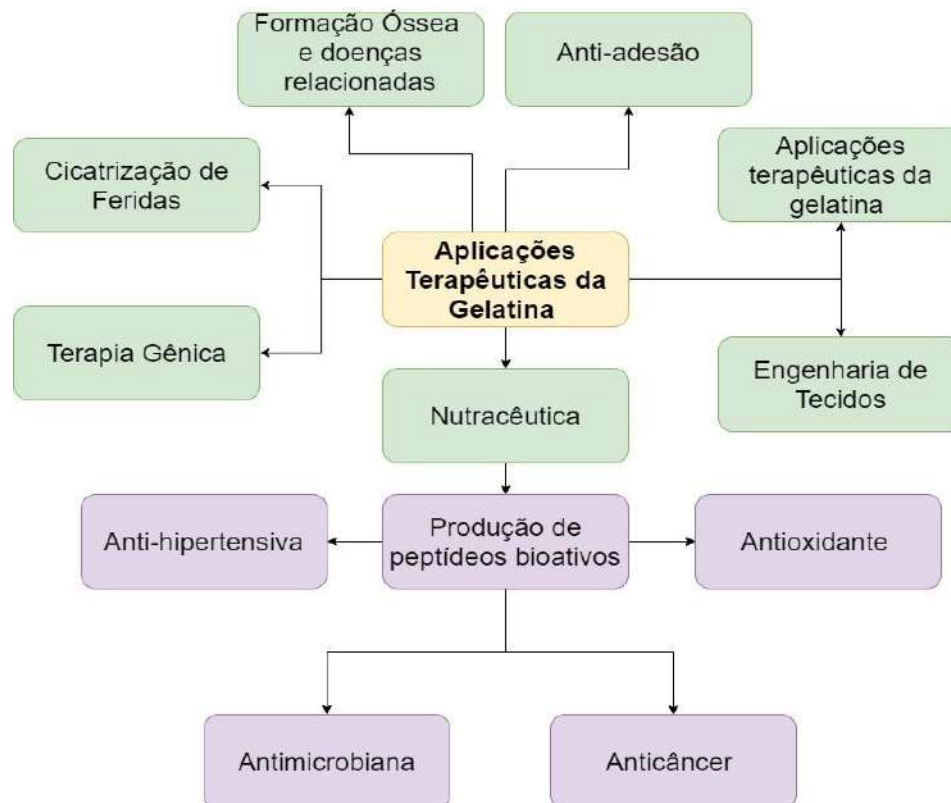
2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para esta mini-revisão, foi realizada uma busca bibliográfica utilizando sites científicos, tais como ScienceDirect (<https://www.sciencedirect.com/>), Elsevier (<https://www.elsevier.com/>), Springer (<https://www.springer.com/>), Tandfonline (<https://www.tandfonline.com/>), PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), Wiley Online Library (<https://onlinelibrary.wiley.com/>) e o Google Scholar (<https://scholar.google.com.br/>). A pesquisa foi realizada a partir das palavras-chave: gelatina, gelatina peixe, gelatina biomédica, em português e sua tradução em inglês. Os materiais encontrados nos diferentes bancos de bases de dados científicos foram, posteriormente, conferidos com detalhes sobre os modelos e tipos (artigos científicos; revisões bibliográficas), não havendo restrição quanto ao uso destes. Não houve qualquer restrição quanto a período de publicação. As informações gerais foram catalogadas de acordo com interesse dos autores.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A gelatina é um biopolímero utilizado na indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética e fotográfica, devido às suas propriedades funcionais e tecnológicas, como ilustrado na Figura 1. É composta por cadeias poliméricas combinadas de hidrolisados com pesos moleculares diferentes, incluindo cadeias α (80-125 kDa), cadeias β (160-250 kDa), cadeias γ (240-375 kDa) (Huang *et al.*, 2019).

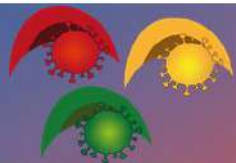
Figura 1- Aplicações terapêuticas da gelatina extraída de mamíferos e peixes.



Fonte: Lv *et al.* (2019).

A gelatina apresenta em sua composição uma série de aminoácidos importantes para o metabolismo humanos e nutrientes que tornam esse alimento valioso (Casanova *et al.*, 2020). Durante a hidrólise parcial do colágeno é produzida uma série de peptídeos com propriedades biologicamente ativas (Qiu *et al.*, 2019). Os peptídeos formados pela hidrólise apresentam inúmeras funções biológicas de interesse para o segmento biomédico e terapêutico (Lv *et al.*, 2019). Lassoued *et al.* (2015) descreveram peptídeos de gelatina extraídas a partir do músculo de uma espécie de raia (*Raja clavata*) com atividade inibidora da enzima conversora da angiotensina-I (ECA) e antioxidantes. O método mais amplamente utilizado para extrair o peptídeo anti-hipertensivo da gelatina de peixe é o corte enzimático (Lv *et al.*, 2019). As atividades antioxidantes e antimicrobianas da gelatina foram reportadas por Abdelhedi *et al.* (2017) e Roy; Rhim (2019), respectivamente.

Os hidrogéis de gelatina são uma alternativa válida para aplicações na área de engenharia



de tecidos (Perez-Puyana *et al.*, 2020), principalmente para a produção de andaimes para substituição óssea (Chen; Yao, 2011), na preparação de curativos e sistemas de administração de medicamentos. No entanto, a fonte animal da qual o colágeno é extraído para obter gelatina podem influenciar as propriedades dos hidrogéis de gelatina obtidos (Michelini *et al.*, 2020).

Como descrito, o biopolímero de gelatina é um potente agente biomédico, funcionando como agente de revestimento de superfícies e/ou misturadas com biopolímeros sintéticos ou naturais, formando estruturas compostas (Sun; Wang, 2015), visando à cicatrização de feridas *in vitro* e *in vivo* (Afjoul; Shamloo; Kamali, 2020) e na preparação de biocompostos associados à quitosana para produção de curativos biológicos (Sakthiguru; Sithique, 2020). Jridi *et al.* (2017) reportaram atividade cicatricial da gelatina extraída de moluscos (chocos); enquanto Jana *et al.* (2016) relataram sobre o potencial antiinflamatório da gelatina quando associada outros compostos.

As características naturais da gelatina de peixe significam que os produtos derivados são relativamente inofensivos para o corpo em comparação com terapias clínicas e medicamentos. Assim, o uso dietético de gelatina de peixe pode trazer excelentes benefícios para pessoas com doenças crônicas (hipertensão, osteoporose e diabetes) (Lv *et al.*, 2019).

No campo nano-farmacêutico, as nanopartículas à base de gelatina têm mostrado grande potencial como sistemas multifuncionais de administração de medicamentos, muito devido à fácil adaptação, incluindo porções de direcionamento, polímeros hidrofílicos, corantes fluorescentes ou diferentes agentes terapêuticos sem a perda de propriedades físico-químicas e biológicas desejadas (Saber, 2019). Paula *et al.* (2019) reportaram uso da gelatina associada a goma arábica para microencapsulação de células probióticas de *Lactobacillus plantarum*.

Entre outras aplicações, a gelatina, tem sido adotada como vetor não viral para a entrega de genes na terapia gênica do câncer (Lv *et al.*, 2019) e na produção de matrizes de para sequestro de fatores de crescimento (Buie; McCune; Cosgriff-Hernandez, 2020).

4. CONCLUSÃO

A gelatina tem sido aplicada a vários segmentos de bases terapêuticas. Esta mini-revisão buscou correlacionar os principais usos no âmbito biomédico, farmacêutico e nutracêutico. Com inúmeras possibilidades, é um campo amplo e que está em constante prospecção por matérias-primas alternativas, como a partir de resíduos de peixes e invertebrados marinhos.

5. REFERÊNCIAS

ABDELHEDI, O.; NASRI, R.; MORA, L.; TOLDRÁ, F.; NASRI, M.; JRIDI, M. Collagenous proteins from black-barred halfbeak skin as a source of gelatin and bioactive peptides. *Food Hydrocoll.*, v.70, p.123–133, 2017.

AFJOUL, H.; SHAMLOO, A.; KAMALI, A. Freeze-gelled alginate/gelatin scaffolds for wound healing applications: An in vitro, in vivo study. *Mater. Sci. Eng. C*, v.113, p.110957, 2020.

AHMAD, A.; ISMAIL, S.A.; AHMAD, K.A.; KHALIL, Y.; KUMAR, K.D.; ADEYEMI, K.D.; SAZILI, A.Q. Recent advances on the role of process variables affecting gelatin yield and characteristics with special reference to enzymatic extraction: A review. *Food Hydrocoll.*, v.63, p.85-96, 2017.



BUIE, T.; MCCUNE, J.; COSGRIFF-HERNANDEZ, E. Gelatin Matrices for Growth Factor Sequestration. *Trends in Biotechnol.*, v.38, p.546-557, 2020.

CASANOVA, F.; MOHAMMADIFAR, M.A.; JAHROMI, M.; PETERSEN, H.O.; EYBYE, K.L.; KOBELGAARD, S.; JAKOBSEN, G.; JESSEN, F. Physico-chemical, structural and techno-functional properties of gelatin from saithe (*Pollachius virens*) skin. *Int. J. Biol. Macromol.*, v.156, p.918-927, 2020.

CHEN, K.-Y.; YAO, C.-H. Repair of bone defects with gelatin-based composites: A review. *BioMedicine*, v.1, p.29-32, 2011.

ECHAVE, M.C.; HERNÁEZ-MOYA, R.; ITURRIAGA, L.; PEDRAZ, J.L.; LAKSHMINARAYANAN, R.; DOLATSHAHI-PIROUZ, A.; ORIVE, G. Recent advances in gelatin-based therapeutics. *Expert Opin. Biol. Ther.*, p.773-779, 2019.

HUANG, T.; TU, Z.; SHANGGUAN, X.; SHA, X.; WANG, H.; ZHANG, L.; BANSAL, N. Fish gelatin modifications: A comprehensive review. *Trends Food Sci. Technol.*, v.86, p.260-269, 2019.

JANA, S.; BANERJEE, A.; SEN, K.K.; MAITI, S. Gelatin-carboxymethyl tamarind gum biocomposites: In vitro characterization & anti-inflammatory pharmacodynamics. *Mater. Sci. Eng. C*, v.69, p.478-485, 2016.

JRIDI, M.; SELLIMI, S.; LASSOUED, K.B.; BELTAIEF, S.; SOUISSI, N.; MORA, L., TOLDRÁ, F.; ELFEKI, A.; NASRI, M.; NASRI, R. Wound healing activity of cuttlefish gelatin gels and films enriched by henna (*Lawsonia inermis*) extract. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, v.512, p.71-79, 2017.

PEREZ-PUYANA, V.; JIMÉNEZ-ROSADO, M.; ROMERO, A.; GUERRERO, A. Fabrication and characterization of hydrogels based on gelatinised collagen with potential application in tissue engineering. *Polymers (Basel)*, v.17, p.1146, 2020.

QIU, Y.T.; WANG, Y.M.; YANG, X.R.; ZHAO, Y.Q.; CHI, C.F.; WANG, B. Gelatin and antioxidant peptides from gelatin hydrolysate of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) Scales: preparation, identification and activity evaluation. *Mar. drugs*, v.17, p.565, 2019.

LASSOUED, I.; MORA, L.; BARKIA, A.; ARISTOY, M.-C.; NASRI, M.; TOLDRÁ, F. Bioactive peptides identified in thornback ray skin's gelatin hydrolysates by proteases from *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *J. Proteomics*, v.128, p.8-17, 2015.

LV, L.-C.; HUANG, Q.-Y.; DING, W.; XIAO, X.-H.; ZHANG, H.-Y.; XIONG, L.-X. Fish gelatin: The novel potential applications. *J. Func. Foods*, v.63, p.103581, 2019.



MICHELINI, L.; PROBO, L.; FARÈ, S.; NEGRINI, N.C. Characterization of gelatin hydrogels derived from different animal sources. *Mat. Lett.*, v.272, p.127865, 2020.

MILAKIN, K.A.; CAPÁKOVÁ, Z.; ACHARYA, U.; VAJĎÁK, J.; MORÁVKOVÁ, Z.; HODAN, J.; HUMPOLÍČEK, P.; BOBER, P. Biocompatible and antibacterial gelatin-based polypyrrole cryogels. *Polymer*, v.197, p.122491, 2020.

PAULA, D.A.; MARTINS, E.M.F.; COSTA, N.A.; OLIVEIRA, P.M., OLIVEIRA, E.B.; RAMOS, A.M. Use of gelatin and gum arabic for microencapsulation of probiotic cells from *Lactobacillus plantarum* by a dual process combining double emulsification followed by complex coacervation. *Int. J. Biological Macromol.*, v.133, p.722-731, 2019.

ROY, S.; RHIM, J.-W. Preparation of antimicrobial and antioxidant gelatin/curcumin composite films for active food packaging application. *Colloid. Surface. B: Biointerfaces*, v.188, p.110761, 2019.

SABER, M.M. Strategies for surface modification of gelatin-based nanoparticles. *Colloid. Surface. B: Biointerfaces*, v.183, p.110407, 2019.

SAKTHIGURU, N.; SITHIQUE, M. A. Fabrication of bioinspired chitosan/gelatin/allantoin biocomposite film for wound dressing application. *Int. J. Biol. Macromol.*, v.1521, p.873-883, 2020.

SU, K.; WANG, C. Recent advances in the use of gelatin in biomedical research. *Biotechnol. Lett.*, v.37, p.2139–2145, 2015.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS DE NÚCLEO LIPÍDICO CONTENDO FÁRMACO IMUNOSSUPRESSOR

G.S GOMES¹, L.A FRANK¹, A. POHLMANN¹ e S.S.GUTERRES¹

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas;

E-mail para contato: Graziela.scheuer@gmail.com

RESUMO – *Tacrolimus (TAC), inibidor da calcineurina com atividade imunossupressora, possui indicação off label no tratamento de doenças autoimunes que acometem a pele, tais como a psoríase, porém, possui permeação limitada em algumas regiões com placas hiperqueratósicas, devido às suas características físico-químicas, como a alta lipofilicidade. Nanocápsulas de núcleo lipídico (NC) podem ser uma alternativa na otimização dessas formulações tópicas por serem capazes de promover a permeação dos fármacos e seu depósito no estrato córneo e epiderme, sem que haja absorção sistêmica. Assim, este trabalho visou a obtenção e caracterização de TAC incorporado a NLC de PCL 80.000 (NC-TAC) para uma adequada entrega do fármaco através da via cutânea. Após a sua obtenção, as NC-TAC apresentaram uma eficiência de encapsulação de $99.47\% \pm 0.11$, teor de $98.90\% \pm 2.32$, tamanho médio de $199 \text{ nm} \pm 13.81$ e potencial zeta médio de -15.73 mV . As formulações apresentaram-se estáveis pelo período de 30 dias quanto as suas características físico-químicas. Além disso, o fármaco encapsulado exibiu um perfil de liberação controlada quando comparado ao fármaco livre, sendo de 64% e 91% respectivamente, após 48 horas. Assim, NC-TAC foram obtidas com características satisfatórias e indicam a adequabilidade dessa formulação para posterior incorporação em veículo semissólido para o tratamento de doenças autoimunes que acometem a pele.*

Palavras-chave: Nanocarreador, tacrolimus, psoríase.

ABSTRACT. *Tacrolimus (TAC) is a calcineurin inhibitor with immunosuppressive activity, has an off-label indication in the treatment of autoimmune diseases that affect the skin, such as psoriasis, but has limited permeation in some regions with hyperkeratotic plaques, due to its physical-chemical characteristics, such as high lipophilicity. Lipid core nanocapsules (NC), as they can promote the permeation of drugs and their deposition in the stratum corneum and epidermis, without systemic absorption, can be an alternative in the optimization of these topical formulations. Thus, this work aimed at obtaining and characterizing TAC incorporated to PCL 80,000 NLC (NC-TAC) aiming at an adequate delivery of the drug through the cutaneous route. After obtaining the NC-TAC, they showed an incorporation efficiency of $99.47\% \pm 0.11$, a content of $98.90\% \pm 2.32$, an average size of $199 \text{ nm} \pm 13.81$ and an average zeta potential of -15.73 mV .*



The formulations were stable for a period of 30 days in terms of their physical and chemical characteristics. In addition, the encapsulated drug showed a controlled release profile when compared to the free drug, being 64% and 91% respectively, after 48 hours. Thus, NC-TAC were obtained with satisfactory characteristics and indicate the suitability of this formulation for subsequent incorporation in a semi-solid vehicle for the treatment of autoimmune diseases that affect the skin.

Keywords: Nanocarrier, tacrolimus, psoriasis.

1. INTRODUÇÃO

A psoríase é uma doença inflamatória crônica recorrente, caracterizada pelo surgimento de lesões, placas escamosas e eritematosas na pele e que ainda não possui cura (Menter *et al.*, 2008). O seu tratamento consiste na remissão da doença, sendo a via tópica a mais indicada, uma vez que é de fácil administração e apresenta reduzidos efeitos colaterais. Além disso, há indicações *off label* para o tratamento da psoríase pela via tópica, sendo um deles a utilização do tacrolimo (TAC), um inibidor da calcineurina, com efeito farmacológico imunossupressor (Zhai *et al.*, 2011). Sua indicação é restrita ao uso na face, dobras e semimucosas, pois através do uso tópico, o fármaco fica restrito ao local de aplicação devido a sua alta lipofilicidade, restringindo assim as estratégias de tratamento (Yamamoto *et al.*, 2003; SBD, 2009). O desenvolvimento de estratégias capazes de aumentar a concentração do fármaco na área afetada pode otimizar o tratamento. Dentre as estratégias citadas na literatura para otimizar formulações tópicas destacam-se as nanocápsulas de núcleo lipídico (NC) que são capazes de aumentar a deposição do fármaco no estrato córneo e epiderme, além de promover sua permeação sem que haja absorção sistêmica. Essas estruturas são formadas por uma parede polimérica disposta ao redor de um núcleo chamado de organogel devido à sua característica viscosa, oriunda da mistura de triglicerídeos de cadeia média e monoestearato de sorbitano. Um dos polímeros utilizados para o revestimento dessas estruturas é o policaprolactona (PCL) 80.000, polímero com uso consolidado no desenvolvimento de nanocápsulas devido às suas características de biocompatibilidade, biodegradabilidade, alta permeabilidade e atoxicidade (Domingues *et al.*, 2008; Miladi *et al.*, 2014). Outra característica importante é que o mesmo apresenta lenta degradação, o que confere vantagem para o desenvolvimento de fármacos para liberação controlada e uso a longo prazo (Calgaroto *et al.*, 2018). Considerando isso, o presente trabalho visa obter e realizar a avaliação da qualidade de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo tacrolimus (NC-TAC) produzidas com PCL 80.000, bem como realizar o estudo de estabilidade frente ao armazenamento e o estudo de liberação *in vitro*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

NC-TAC (0,08 mg/mL) e NC branca (NC-Br) foram obtidas através do método de deposição interfacial. A avaliação da qualidade foi realizada através da caracterização físico-química das suspensões aquosas por meio da determinação do diâmetro de partícula e polidispersão utilizando a técnica de difratometria de laser (Mastersizer 2000, Malvem). Além disso, as formulações tiveram seus diâmetros de partículas e índices de polidispersão determinados também pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer® nano-ZS modelo ZEN 3600, Malvem). Para a determinação do potencial zeta das suspensões, utilizou-se eletroforese e a análise de pH foi realizada diretamente nas suspensões, em potenciômetro (B474 Micronal) previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e pH 7,0. Para os experimentos, as formulações foram preparadas



em triplicata de lote.

O teor de TAC nas formulações e a eficiência de encapsulação (EE%) foram analisados por cromatografia líquida de fase reversa (CLAE) por método previamente validado e para a eficiência de encapsulação usou-se da técnica de ultrafiltração-centrifugação.

Para estudo de estabilidade das formulações frente ao armazenamento, as suspensões de NC-TAC foram armazenadas em frascos vedados de vidro por 30 dias, à temperatura ambiente e protegidos da luz. Além do aspecto físico destas formulações, foram avaliados o diâmetro médio, polidispersão, potencial zeta, pH e teor (%) de TAC presente nas suspensões a partir do dia do preparo e após 0, 15 e 30 dias de armazenamento. Os resultados foram expressos em duplicata.

Além disso, o ensaio de liberação foi realizado em Célula de Franz. O meio receptor foi composto por solução etanólica (30%) e entre o compartimento doador e o receptor havia uma membrana de diálise, de celulose regenerada, com massa molecular de 12-14 KDa. O sistema foi mantido com temperatura e agitação constantes. O experimento foi realizado em duplicata e a quantidade de TAC liberada em cada tempo foi quantificada em CLAE.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a preparação, NC-TAC e NC-Br, apresentaram-se macroscopicamente homogêneas, com coloração branca azulada e aspecto leitoso (Efeito Tyndall), característico de sistemas coloidais obtidos por nanoprecipitação (Schaffazick *et al.*, 2003). As características físico-químicas das suspensões podem ser observadas de forma detalhada na tabela 1. As suspensões com fármaco apresentaram eficiência de encapsulação de $99.47 \pm 0.11\%$. E as formulações NC-TAC e NC branca apresentaram diâmetro médio nanométrico semelhantes, indicando não haver influência do fármaco, bem como foi demonstrado por Friedrich (2014), que avaliou NC-TAC com PCL 50.000. O pH ácido e o potencial zeta negativo apresentados pelas formulações, são característicos da presença de grupamentos ésteres presentes no polímero PCL (Muller *et al.* 2001), o que também foi observado com o uso de PCL em nanocápsulas de dexametasona (Ferrony *et al.*, 2009; Freitas *et al.*, 2017). Esses resultados encontrados são considerados adequados para a manutenção do sistema sem agregação e precipitação das nanoestruturas, isto ocorre devido à repulsão eletrostática que as suspensões apresentam, resultantes da densidade de carga de superfície (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Tabela 1- Parâmetros de caracterização de NC e comparativo

SUSPENSÃO	D4.3	SPAN	diâmetro zeta	PDI	zeta	pH	teor mg/mL
NC-TAC	201.33±46	1.554±0.184	199±13.81	0.138±0.01	-15.73±0.3	5.58±0.06	98.90±2.32
NC-Br	202.33±2.31	1.746±0.031	198.55±4.71	103±0.02	-10.70±0.5	5.12±0.11	-

A estabilidade das suspensões NC-TAC armazenadas em temperatura ambiente foi estudada pela análise de mudanças no tamanho de partícula, SPAN, teor de fármaco, potencial zeta e PDI. Alterações nesses parâmetros são comumente consideradas como indicadores de instabilidade das formulações (Heurtault *et al.*, 2003). Durante o período de 30 dias, nenhuma suspensão polimérica apresentou alterações macroscópicas que indicassem a presença de agregados. Após três análises (dias 0, 15 e 30) o teor permaneceu próximo a 100%, pH da média das análises feitas nos diferentes dias foi de 5.53 ± 0.38 , diâmetro 194.96 ± 4.11 nm, pDI 0.121 ± 0.014 , potencial zeta de -16.97 ± 1.38 e span de 1.616 ± 0.04 . Assim, o estudo de estabilidade



frente ao armazenamento sugeriu que as NC-TAC são estáveis por 30 dias, sem alterações significativas nos parâmetros analisados.

Considerando o ensaio de liberação, é possível observar que o fármaco na sua forma não encapsulada, difundiu através da membrana cerca de 62% após 48h, após esse período observou-se o platô, enquanto na sua forma livre difundiu mais de 90% de fármaco no meio nas primeiras 24 h. Podemos observar que o aumento da massa molecular do polímero utilizado, de 50.000 para 80.000, proporcionou uma maior liberação do fármaco quando confrontado com o trabalho de Friedrich (2014) que utilizou o mesmo meio de liberação.

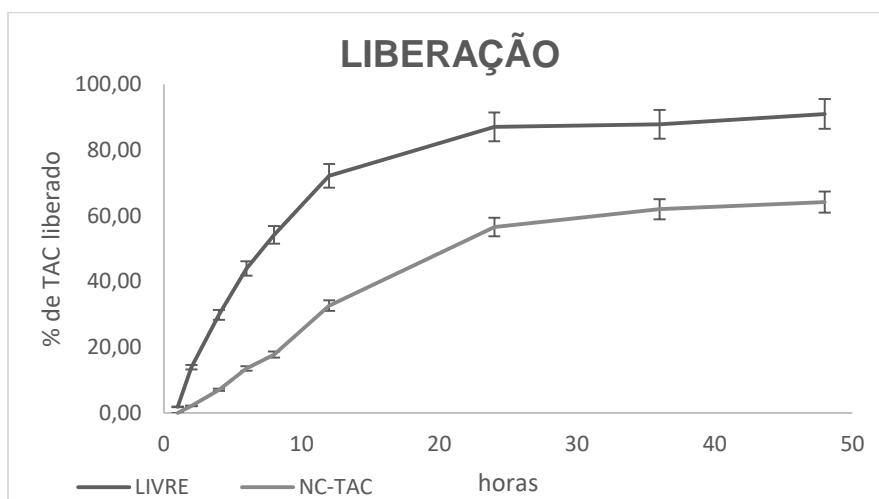


Figura 1- Perfil de liberação do TAC a partir de NC-TAC e de dissolução do TAC livre

4. CONCLUSÃO

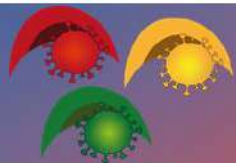
A partir dos resultados, observa-se que foi possível obter nanocápsulas de núcleo lipídico contendo tacrolimus utilizando PCL 80.000, com qualidade farmacêutica adequada, uma vez que as suspensões apresentaram tamanho nanométrico adequado observado por todas as técnicas utilizadas. Além disso, a suspensão apresentou perfil de liberação controlado e adequada estabilidade de armazenamento, indicando a adequabilidade dessa suspensão para posterior incorporação em veículo semissólido para o tratamento de doenças autoimunes que acometem a pele, como a psoríase.

5. REFERÊNCIAS

CALGAROTO, S., FAURI, L. E., FRANK, L. A., PAESE, K., GUTERRES, S. S., & POHLMANN, A. R. Chemical stability, mass loss and hydrolysis mechanism of sterile and non-sterile lipid-core nanocapsules: The influence of the molar mass of the polymer wall. *React Funct Polym.*, 2018.

DOMINGUES, G. S.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; Micropartículas nanorevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. *Quim. Nova*, v. 31, n.8, p. 1966-1972, 2008

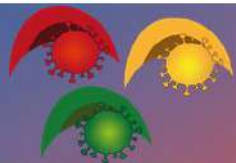
FREITAS, G. M.; BASTIANI, J. M.; PEREIRA, T. C. B.; BAJERSKI, L.; BENDER, E. A.; HAAS, S. E.; COLOMÉ, L. M. Validation of analytical method by HPLC for determination of dapsone in polymeric nanocapsules based on crude rice brain oil. *J. Appl. Pharm. Sci.*, v. 7, p. 230, 2017.



- GUTERRES, S.S.; ALVES, M.P.; POLHMANN, A.R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. *Drugs Target Insights*, 2007.
- FRIEDRICH, R. B., DIMER, F. A., GUTERRES, S. S., BECK, R. C. R., & POHLMANN, A. R. (2014). Nanoencapsulation of Tacrolimus in Lipid-Core Nanocapsules Showed Similar Immunosuppressive Activity After Oral and Intraperitoneal Administrations. *J. Biomed. Nanotechnol*, 10(8), 1599–1609.
- HEURTAULT, B., SAULNIER, P., PECH, B., PROUST, J.E., BENOIT, J.P., 2003. Physicochemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials* 24, 4283–4300.
- MENTER, A.; GOTTLIEB, A.; FELDMAN, S.R.; VAN VOORHEES, A.S.; LEONARDI, C.L.; GORDON, K.B. et al., Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: Section 1. Overview of psoriasis and guidelines of care for the treatment of psoriasis with biologics, *J. Am. Acad. Dermatol.* 58 (2008) 826–850
- MILADI, K.; IBRAHEEM, D.; IQBAL, M.; SFAR, S.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Particles from preformed polymers as carriers for drug delivery. *Excli Journ.*, v.13, p.28-57, 2014
- MÜLLER, C. R.; SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; DE LUCCA FREITAS, L.; PESCE DA SILVEIRA, N.; DALLA COSTA, T.; GUTERRES, S. S. Spray-dried diclofenac-loaded poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules and nanospheres: preparation and physicochemical characterization. *Pharmazie*, v.56, p. 864-867, 2001
- PISCHON, H., RADBRUCH, M., OSTROWSKI, A., SCHUMACHER, F., HÖNZKE, S., KLEUSER, B., MUNDHENK, L. How Effective Is Tacrolimus in the Imiquimod-Induced Mouse Model of Psoriasis? *J Invest Dermatol.* 2018 138(2), 455–458. doi:10.1016/j.jid.2017.09.019
- SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quím Nova*, v.26, p.726-737, 2003
- SINHA, V.R.; BANSAL, K.; KAUSHIK, R.; TREHAN, A. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *Int. Journ. of Pharm.*, v.278, 2004.
- Sociedade Brasileira de Dermatologia (SBD). Consenso brasileiro de psoríase – guias de avaliação e tratamento Sociedade Brasileira de Dermatologia – 2 ed. 2012 Rio de Janeiro
- ZHAI, J., GU, J., YUAN, J., & CHEN, J. Tacrolimus in the Treatment of Ocular Diseases. *BioDrugs*, 2011. 25(2), 89–103.
- YAMAMOTO, T.; NISHIOKA, K. Topical tacrolimus: an effective therapy for facial psoriasis. *Eur. J. Dermatol.* 2003. 13, 471–473.

6. AGRADECIMENTOS

Ao PPGCF/UFRGS, ao Laboratório 405 e ao CNPq.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

CONSTRUÇÃO DE UMA NOVA PLATAFORMA NANOESTRUTURADA BASEADA EM NANOFITAS DE GRAFENO PARA DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DO HPV 16 EM CONCENTRAÇÃO ATOMOLAR

R. P. S. de LUCENA¹, I. A. M. FRÍAS, N. LUCENA-SILVA, C. A. S. ANDRADE e M. D. L. OLIVEIRA

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

² Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Departamento de Imunologia;

³ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica.

E-mail para contato: raiza.lucena16@hotmail.com

RESUMO – A infecção por HPV 16 está presente na maioria dos casos associados a lesões cancro uterino. Essa infecção tem prevalência na maioria dos jovens, com índice de mortalidade elevada. Porém, as atuais técnicas de diagnóstico para identificação do HPV 16 e demais subtipos de HPV, apresentam algumas limitações para o diagnóstico preciso deste patógeno sexualmente transmissível. Diante dessa necessidade, fabricamos um genossensor eletroquímico baseado em nanofitas de grafeno, excelente nanomaterial que possibilita alta sensibilidade elétrica do sistema sensor, e uma sonda degenerada aminada (MY11) capaz de detectar e identificar o subtipo de HPV infectante. Objetiva-se uma detecção imediata do HPV 16 em baixo nível de concentração presentes em amostras plasmídias. Métodos de caracterização eletroquímica foram utilizados para construção do sistema genossensor, como a voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica. Técnicas estas capazes de fornecer informações sobre o processo de modificação interfaciais da superfície sensora, capazes de mensurar respostas elétricas. O genossensor proposto foi altamente específico e seletivo, apresentando uma diferenciada magnitude nas respostas impedimétricas do HPV 16 e o controle negativo, além de apresentar um limite de detecção (LOD) de $5.20 \text{ aM} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. O genossensor possui potencial para automação e aplicação em análises clínicas, proporcionando um diagnóstico precoce do HPV e qualidade de vida ao paciente.

Palavras-chave: Genossensor, Eletroquímica; Nanoestruturas de carbono; Papiloma vírus humano.



ABSTRACT – *HPV 16 infection is present in most cases associated with uterine cancer lesions. This infection is prevalent in most young people, with a high mortality rate. However, current diagnostic techniques for identifying HPV 16 and other HPV subtypes, have some limitations for the accurate diagnosis of this sexually transmitted pathogen. In view of this need, we manufactured an electrochemical genosensor based on graphene nanofibers, an excellent nanomaterial that enables high electrical sensitivity of the sensor system, and an amino-degenerated probe (MY11) capable of detecting and identifying the infectious HPV subtype. Enabling an immediate detection of HPV 16 at a low concentration level present in plasmid samples. Electrochemical characterization methods were used to build the genosensor system, such as cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. Techniques capable of providing information about the process of interfacial modification of the sensor surface, capable of measuring electrical responses. The proposed genosensor was highly specific and selective, with an impedimetric variation between HPV 16 and the negative control, in addition to having a very low detection limit (LOD) of $5.20 \text{ aM} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Presenting potential for automation and application in clinical analyzes, providing an early diagnosis and quality of life to the patient.*

Keywords: Genosensor, Electrochemistry; Carbon nanostructures; Human papilloma virus.

1. INTRODUÇÃO

Infecção pelo HPV é a doença sexualmente transmissível (DST) com maior prevalência no mundo. O HPV 16 se destaca como o tipo oncogênico mais frequente em exames citológicos normais (Wendland *et al.*, 2018). A prevalência por HPV ainda é uma problemática para o sistema de saúde, e no Brasil se apresenta como o terceiro tipo de câncer mais comum nas mulheres, ficando atrás apenas do câncer de mama e do câncer de colo-retal, sendo, a quarta causa mais comum de morte de mulheres por câncer (Abreu *et al.*, 2018). Segundo o Inca, cerca de 7,6 milhões de pessoas em todo o mundo podem morrer por causa do câncer a cada ano. O câncer do colo do útero é o segundo mais incidente no Nordeste (16,10/100 mil) entre os óbitos por câncer em mulheres (INCA, 2020).

Os testes atualmente empregados para diagnosticar o câncer cervical não são imediatos. Quando existe uma suspeita de infecção por HPV, são realizados exames citológicos e moleculares. O diagnóstico molecular emprega a reação em cadeia da polimerase (PCR) como padrão ouro para o diagnóstico do HPV. Embora altamente específico e confiável, requer pessoal devidamente treinado, assim como instrumentos, equipamentos e instalações especiais que distam

bastante da realidade em que muitos centros de saúde operam. O desenvolvimento de dispositivos analíticos capazes de executar rapidamente análises precisas, se fazem necessários, como os genossensores.

Genossensores eletroquímicos são biossensores baseados em ácidos nucleicos, tanto DNA quanto RNA. Bastante usados na detecção de sequências de ácidos nucleicos específicas, sendo capazes de realizar o diagnóstico e identificação de doenças genéticas de maneira precisa e simples. Os genossensores possuem um mecanismo baseado na detecção das mudanças das propriedades elétricas devido a interação de ácidos nucleicos com moléculas alvo, proporcionando ao sistema alta sensibilidade e seletividade (Zucolotto *et al.*, 2018). Nanofitas de grafeno (NFG) têm sido relatadas na literatura devido a sua eficácia em melhorar o desempenho eletroquímico, facilitando a imobilização de biomoléculas e sendo favorável para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos (Gursu *et al.*, 2018). Métodos eletroanalíticos, tais como voltametria cíclica (VC)



e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), fazem uso de propriedades elétricas mensuráveis (potencial, carga e corrente) e podem ser utilizadas para o estudo da interação entre biomoléculas e plataformas nanoestruturadas composta por nanomateriais, tais como o nanofitas de grafeno quimicamente modificado. Desenvolvemos um genossensor baseado em NFG e sonda degenerada MY11 para o diagnóstico precoce e sensível da infecção pelo HPV 16.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

As análises de VC e EIE foram realizada através de um potenciostato/galvanostato PGSTAT 302N, utilizando uma célula eletroquímica composta por três eletrodos, sendo um contra eletrodo de platina, um eletrodo de referência Ag/AgCl e um eletrodo de trabalho de disco de ouro de 3mm de diâmetro. Como sonda redox, foi utilizada uma solução de 20 mL de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (1:1). As análises de VC foram realizadas a um potencial de varredura fixo de -0,2 a 0,7 V. A EIE foi obtida numa faixa de frequência entre 100 mHz a 100 KHz com um potencial de amplitude alternada de 10 mV. As análises de circuito equivalente foram obtidos na caracterização de EIE representados na forma de um diagrama de Nyquist e serão ajustados utilizando o software NOVA 1.11. O software origin 8.0 foi utilizado para confecção dos gráficos e obtenção de dados matemáticos.

As NFG foram sintetizadas e modificadas quimicamente com grupos terminais sulfidrilas e grupos carboxílicos segundo o protocolo de patente registrada sob o número BR1020150012705. Primeiramente foi realizado a limpeza da superfície do eletrodo de ouro foi imerso em NaClO por 10 minutos. Em seguida, foi preparada uma solução de NFG para caracterização do eletrodo, 10mg de NFG foi dissolvida em 20 mL de acetona. Em seguida, a solução foi colocada em um banho ultrassônico por 10 minutos para homogeneização do sistema junto com 0.01mM de 1,4-ditiotreitól (DTT) para promover a redução dos grupos dissulfeto para sulfidrilas. Os mesmos se fazem necessários para conseguir a imobilização do nanomaterial na superfície do eletrodo de ouro pela interação enxofre-ouro.

Para caracterizar a base transdutora, 2 μ L da solução de NFG foram gotejados sobre o disco de ouro, deixando passar 10 minutos incubando antes de começar as análises de VC e EIE. Posteriormente, para promover a imobilização covalente da sonda de DNA, os grupos carboxílicos das NFGs foram ativados durante 10 minutos empregando 4 μ L de uma solução de EDC:NHS (1:1) através de gotejamento sobre o eletrodo modificado com NFG. Em seguida, 2 μ L da solução de oligonucleotídeo degenerado aminado (0.1 μ M) foram gotejados sobre o eletrodo, que depois foi incubado por 30 minutos para permitir a imobilização covalente da sonda. Por fim, a capacidade sensora do genossensor foi avaliada frente às diferentes concentrações (1aM, 100aM, 100fM, 50pM, 100pM) da amostra de plasmídeos recombinante contendo HPV 16. A amostra foi aquecida numa temperatura 90°C, e gotejado 2 μ L na plataforma sensora, em seguida foi feita as análises de VC e EIE para caracterização.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1A corresponde à caracterização voltamétrica da camada nanoestruturada constituída por NFG. Inicialmente, o eletrodo de ouro limpo apresenta picos anódicos / catódicos bem definidos com carga reversível da taxa de transferência na presença da solução $Fe(CN)_6^{3-}$

Fe (CN)₆⁴⁻ em PBS (pH 7,4) como uma sonda redox. Após a adsorção NFG, observa-se uma redução correntes de pico anódicas e catódicas (Rasheed; Sandhyarani, 2017).

Após a imobilização da sonda degenerada (MY11) no eletrodo revestido com NFG foi evidenciado um aumento da magnitude dos picos nos voltamogramas cíclicos. Depois de ativado pelo EDC:NHS, o grupo carboxílico terminal carregado negativamente presentes na NFG, são substituídos pelo éster do NHS. O aumento é devido à atração eletrostática das cargas positivas/neutras presentes no éster do NHS, que promoveu a transferência do par redox negativo para a superfície do eletrodo. Os agentes de acoplamento ativam o grupamento amina presente no eixo terminal da estrutura Cys, que reage com o éster NHS, resultando em uma ligação amida estável, aumentando a resposta da corrente (Samanta; Sarkar, 2011).

Os gráficos de Nyquist do estudo de EIE (Figura 1B) estão de acordo com os voltamogramas cíclicos apresentados anteriormente. O R_{ct} da curva do eletrodo limpo é baixo (189 Ω). Assim, o aumento da resistência de transferência de carga (2.29k Ω) reflete a presença de moléculas imobilizadas sobre a superfície em estudo (Azimzadeh *et al.*, 2017). Após a adição da sonda MY11 observa-se uma diminuição do semicírculo de cole-cole e, portanto o R_{ct} diminuiu (562 Ω). As mudanças de R_{ct} durante as etapas de construção do genossensor corroboram com os resultados de VC, que foram explicados anteriormente. O circuito equivalente de Randles foi utilizado para facilitar a interpretação dos dados experimentais obtidos dos resultados de impedância.

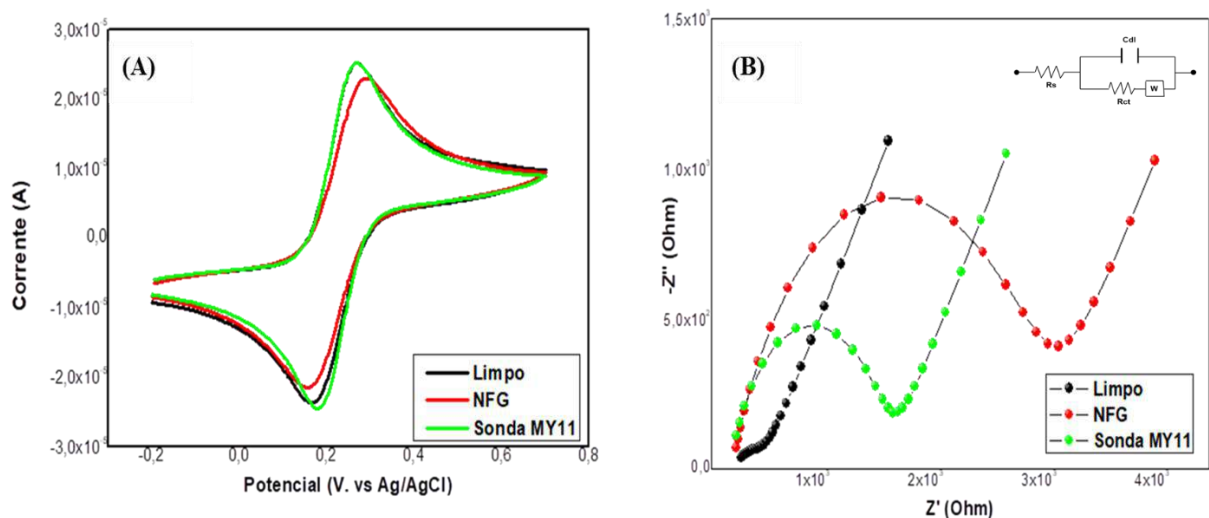


Figura 1. Voltamogramas cíclicos (A) e gráficos de Nyquist (B) para cada etapa da montagem do genossensor. Inserção: Circuito equivalente usado para ajustar os resultados da impedância.

O genossensor foi exposto a diferentes concentrações de DNA plasmidial contendo o HPV 16 (1aM, 100aM, 100000 aM, 50000000 aM, 100000000 aM). A Figura 2 representa o processo de interação biospecífica. O voltamograma cíclico (Figura 2A) apresenta uma redução nas correntes de pico redox e uma redução nas áreas voltamétricas. O diagrama de Nyquist (Figura 2B) revela um aumento sequencial no diâmetro do semicírculo proporcional ao aumento da concentração de DNA plasmidial. Os resultados impedimétricos estão de acordo com os

resultados obtidos em voltametria cíclica.

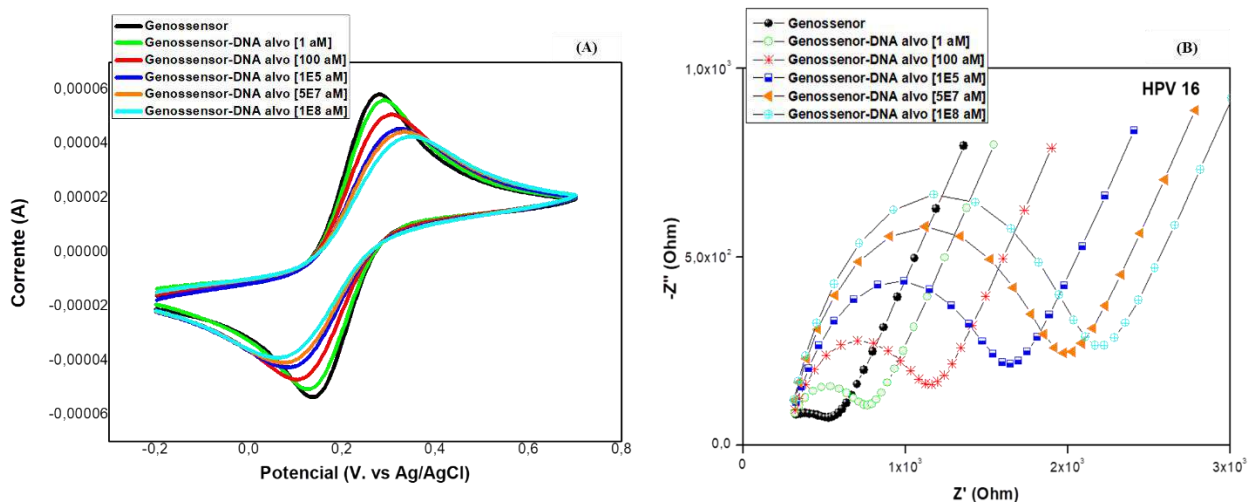


Figura 2. Voltamogramas (A) e diagramas de Nyquist (B) do genossensor exposto a diferentes concentrações de plasmídeo recombinante contendo o HPV 16 (concentrações - 1, 100, 100000, 50000000, 100000000 aM).

A partir da análise da impedância, o genossensor apresentou uma excelente capacidade sensora com limite de detecção (LOD) de $5.20 \text{ aM} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Tais dados revelam uma variação de respostas para as diferentes concentrações do HPV 16, demonstrando que o genossensor proposto é capaz de diagnosticar a infecção pelo HPV 16 em baixa concentração, com um tempo de detecção de 30 minutos para todo o processo de construção.

HPV 16				
Concentração (aM. μL^{-1})	Rct (k Ω)	Q (μF)	N	% Δ Rct
1	518	9.25	0.672	12,37
100	876	7.07	0.704	90,02
1E5 (100fM)	1.34	5.13	0.724	190,67
5E7 (50pM)	1.66	3.42	0.765	260,08
1E8 (100pM)	1.85	2.90	0.783	301,30

Tabela 1. Valores dos elementos de circuito equivalente dos resultados de impedância.

A Figura 3 demonstra a bioatividade do sistema sensor através das respostas de $\Delta R_{CT}\%$ frente às amostras plasmidiais contendo HPV 16 e controle negativo.

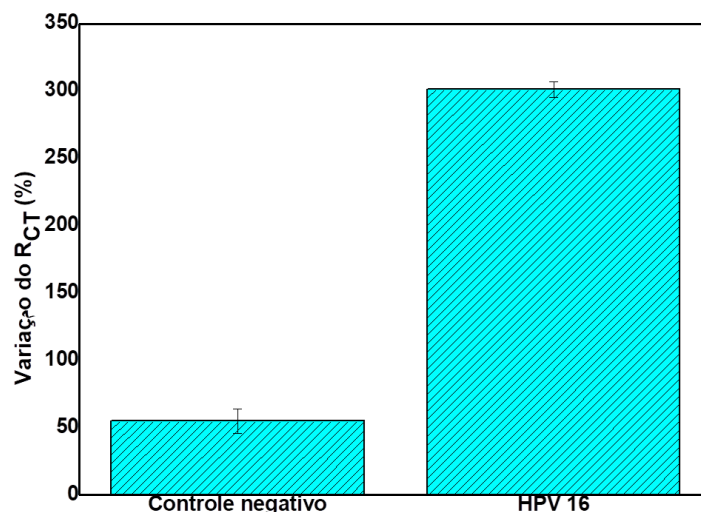


Figura 3. ΔR_{CT} (%) do genossensor após exposição a amostra positiva (HPV 16) e controle negativo (tuberculose) na concentração de 100 pM ($1E8$ aM). Foram utilizadas três repetições para cada condição experimental. Os valores experimentais são relatados como os valores médios \pm desvio padrão.

Podemos observar que existe uma grande variação linear do $\Delta R_{CT}\%$ do HPV 16 (301,30) quando comparado ao controle negativo (54,93). Esse comportamento demonstra a seletividade do genossensor e a capacidade de discriminar entre o HPV 16 e controle negativo.

4. CONCLUSÃO

Desenvolvemos uma plataforma genossensora baseada em NFG-sondaMY11 que apresentou excelente desempenho analítico, com alta sensibilidade e seletividade para detectar a presença do HPV 16 em amostras plasmidiais. As análises voltamétricas e impedimétricas foram utilizadas para caracterizar o processo de construção do sistema sensor e também avaliar sua capacidade de reconhecimento em baixo nível de concentração. O genossensor proposto apresentou um limite de detecção (LOD) de $5.20 \text{ aM} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, incomumente baixo comparado ao padrão ouro (50nM). Desta forma, a plataforma exibiu potencial para o diagnóstico e monitoramento dos níveis mínimo da infecção por HPV 16. Possibilitando um diagnóstico precoce do câncer cervical em estado inicial, visando o apoio aos programas de prevenção de CCU como uma ferramenta complementar para o diagnóstico da infecção por HPV.

5. REFERÊNCIAS

ABREU, Mery Natali Silva et al. Knowledge and perception of HPV in the population over 18 years of age in the city of Ipatinga–state of Minas Gerais, Brazil. **Ciencia & saude coletiva**, v. 23, n. 3, p. 849-860, 2018.



AZIMZADEH, Mostafa et al. Detecção precoce da doença de Alzheimer usando um biossensor à base de óxido de grafeno eletroquimicamente reduzido e nanofios de ouro para quantificação do microRNA-137 sérico. **Avanços do RSC**, v. 7, n. 88, p. 55709-55719, 2017.

GURSU, Hurmus; GENCTEN, Metin; SAHIN, Yucel. Preparation of sulphur-doped graphene-based electrodes by cyclic voltammetry: a potential application for vanadium redox flow battery. **Int. J. Electrochem. Sci**, v. 13, p. 875-885, 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Estimativa 2020. Incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2020.

RASHEED, P. Abdul; SANDHYARANI, N. Carbon nanostructures as immobilization platform for DNA: a review on current progress in electrochemical DNA sensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 97, p. 226-237, 2017.

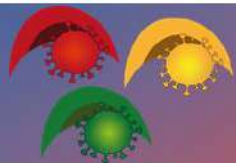
SAMANTA, Debasis; SARKAR, Amitabha. Immobilization of bio-macromolecules on self-assembled monolayers: methods and sensor applications. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 5, p. 2567-2592, 2011.

WENLAND, Eliana Marcia et al. POP-Brazil study protocol: a nationwide cross-sectional evaluation of the prevalence and genotype distribution of human papillomavirus (HPV) in Brazil. **BMJ open**, v. 8, n. 6, p. e021170, 2018.

ZUCOLOTTO, Valtencir et al. Biossensor eletroquímico de DNA, processo para sua preparação e uso do mesmo. 2018.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos a CAPES e ao FINEP pelo termo de outorga concedido para esta bolsa e fontes de recursos do projeto de pesquisa.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

DESENVOLVIMENTO DE NANOBLENDA ELETROFIADAS BASEADAS EM CELULOSE BACTERIANA CONTENDO ALOE VERA PARA O TRATAMENTO DE LESÕES CUTÂNEAS

G. M. OLIVEIRA¹, A. G. SILVA JUNIOR¹, J. G. M. SILVA², F.C.M. PINTO³,
J.L.A. AGUIAR⁴, M. D. L. OLIVEIRA¹, e C. A. S. ANDRADE¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife/PE, Brasil;

² Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife/PE, Brasil;

³ Polisa, Biopolímeros para Saúde, Departamento de Pesquisa, Inovação e Desenvolvimento, Carpina-PE, Brasil;

⁴ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Cirurgia.

E-mail para contato: glliciaoliveira@gmail.com

RESUMO – Feridas cutâneas configuram uma falha na integridade da pele, podendo ser classificadas quanto ao tempo de cicatrização como lesões agudas ou crônicas. A cronicidade ocorre quando há uma falha ou prolongamento do processo cicatricial. Estas lesões são por vezes incapacitantes e onerosas. Dessa forma, faz-se necessário a implementação de novas abordagens terapêuticas para o desenvolvimento de curativos inovadores, que ofereçam eficácia e boa relação custo-benefício. A integração de polímeros naturais como a celulose bacteriana em biopolímero (CBP) obtido a partir da cana de açúcar, o polímero sintético álcool polivinílico (PVA) e extrato de Aloe vera (AV) constituem-se como elementos úteis na reintegração da pele, possibilitando o desenvolvimento de nanofibras com tamanho similar a matriz extracelular. O blend polimérico de PVA 11%+CBP+AV mostrou-se promissor pelos testes de resistência à tração, onde fibras puras de PVA 8% romperam a 2,837 MPa e da nova composição com BPC e AV, romperam-se a 2.560 MPa, valores aproximados aos da pele natural. Tais características destacam a nanofibra proposta como uma excelente alternativa de curativo obtido a partir da técnica da eletrofiação.

Palavras-chave: Nanofibras; eletrofiação; curativo.

ABSTRACT - Skin wounds result in a failure in the integrity of the skin, which can be classified based on the healing time as acute or chronic injuries. Chronicity occurs when a failure or prolongation of the healing process is present. These injuries are sometimes disabling and costly. Thus, it is important to implement new therapeutic approaches for the development of innovative



dressings, which offer efficacy and good cost-benefit ratio. The integration of natural polymers such as bacterial cellulose in biopolymer (BCP) obtained from sugar cane, the synthetic poly(vinyl alcohol) polymer (PVA) and Aloe vera extract (AV) are useful elements in skin reintegration, enabling the development of nanofibers presenting a similar size to the extracellular matrix. The polymeric blend of PVA 11%+BCP+AV proved to be promising by the tensile strength tests, where pure fibers of PVA 8% torn at 2.837 MPa and the new composition with BPC and AV, broke at 2,560 MPa, values close to those of natural skin. Such features highlight the proposed nanofiber as an excellent dressing alternative obtained from the electrospinning technique.

Keywords: Nanofibers; electrospinning; healing dressing.

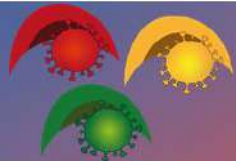
1. INTRODUÇÃO

O processo de cicatrização de feridas revela uma série complexa de eventos biológicos para reparar a função de barreira da pele, prevenir a desidratação e reduzir o risco de infecção bacteriana. No entanto, a cicatrização tardia de ferimentos frequentemente resulta em inflamação crônica (ROWAN et al., 2015). As principais funções dos curativos são remover os exsudatos, bloquear a entrada de microrganismos na lesão e propiciar o estabelecimento do melhor ambiente para a cicatrização natural. Atualmente, sabe-se que os curativos de alta qualidade são projetados para gerar um ambiente úmido para promover o processo cicatricial (HASATSRI et al., 2018).

A nanotecnologia oferece novas opções e metodologias inovadoras no que diz respeito a produção de curativos com capacidade de cicatrização acelerada e liberação de compostos bioativos úteis no processo de cura de lesões na pele. A técnica “eletrofiação” (do inglês *electrospinning*) tem ganhado bastante destaque na área biomédica, uma vez que as fibras produzidas apresentam um tamanho entre 50-500 nm de diâmetro, com uma morfologia semelhante aos glicosaminoglicanos da matriz extracelular (NEMATI et al., 2019).

A eletrofiação é reconhecida como uma técnica de baixo custo e extensivamente explorada para aplicações emergentes em diferentes áreas (THENMOZHI et al., 2017), como na liberação controlada de fármacos (TOPUZ; UYAR, 2019), biossensores (SAPOUNTZI et al., 2017), tratamento e purificação de água (SHAHABADI; BRANT, 2019), dentre outras áreas. Em adição, as nanofibras produzidas apresentam diversas vantagens quando comparadas com curativos tradicionais, como elevada porosidade e ampla área superfície/volume, características essenciais que possibilitam a cultura de células, inserção de moléculas bioativas e nanopartículas, como as de prata (AgNPs) que dispõem de atividade antimicrobiana (WU et al., 2020).

Um típico equipamento de eletrofiação compreende basicamente uma bomba de infusão, fonte de alta-tensão, placa coletora aterrada e uma seringa onde será aplicada a solução polimérica a ser eletrofiada. Basicamente, o processo de produção de nanofibras ocorre pela movimentação de cargas na solução polimérica através da agulha. Tal atividade leva a instabilidade da mistura polimérica, resultando na formação de uma gotícula na ponta da agulha. Com a aplicação e aumento de um campo elétrico, a repulsão recíproca das cargas produz uma força que se opõe a tensão superficial em direção ao campo elétrico produzido entre a agulha (polo positivo) e placa coletora (polo negativo). Como resultado, a gotícula se deforma, dando origem a um cone, chamado cone de Taylor, de onde as nanofibras emergem em direção a placa coletora ao mesmo tempo em que o solvente é volatilizado, sendo mantida a uma determinada distância (HAIDER; HAIDER; KANG, 2015). O ajuste de parâmetros como solvente utilizado, concentração polimérica, potencial aplicado, taxa de infusão, diâmetro da agulha, distância entre placa coletora



e agulha são de suma importância para a obtenção de nanofibras de tamanho adequado (LIU; RENEKER, 2019).

Além de ser biodegradável (SILVA et al., 2019), não-tóxica (PINTO et al., 2016) e biocompatível (OLIVEIRA et al., 2019) a celulose bacteriana em biopolímero (CBP) é quimicamente equivalente a celulose de plantas, mas com a adição de subprodutos, como lignina, pectina e ser totalmente pura, sem necessidade de purificação posterior (PORTELA et al., 2019). Em adição, a CBP absorve exsudatos inflamatórios e acelera a granulação no local lesionado (KHALID et al., 2017). Formada por múltiplos exopolissacarídeos, sua síntese a partir do melaço da cana-de-açúcar ocorre por flotação, usando como vetor o microrganismo *Zoogloea* sp., onde quando a mesma se encontra em contato com o melaço, forma uma matriz gelatinosa (DA SILVA et al., 2019). O conteúdo gelatinoso do *Aloe vera* (AV) tem sido utilizado na área da saúde desde a antiguidade, cujo foco de aplicação em ferimentos, queimaduras e redução da febre. Com dezenas de elementos bioativos em sua composição, o AV é marcado uma alternativa amplamente utilizada até os dias atuais (SÁNCHEZ-MACHADO et al., 2017).

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de filmes eletrofiados formados a partir de blendas poliméricas de álcool polivinílico (PVA), CBP e AV, avaliados por testes de resistência a tração, com a perspectiva de serem empregadas no tratamento de lesões cutâneas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

O PVA foi obtido pela Dinâmica (Brasil). Todos os experimentos foram realizados utilizando água ultrapura obtida a partir do sistema de purificação Milli-Q (Billerica, EUA).

Produção do biopolímero a partir do melaço da cana-de-açúcar

A CBP foi sintetizada pela *Zoogloea* sp. por flotação, quando a bactéria está em contato com o melaço de cana-de-açúcar, as culturas são incubadas a 30 °C durante sete dias, formando na interface ar-líquido uma matriz gelatinosa (PATERSON-BEEDLE et al., 2000). Sua produção é realizada na Universidade Federal Rural de Pernambuco na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Carpina (EECC-UFRPE).

Obtenção do extrato a partir da *Aloe vera*

As folhas da AV foram lavadas com água destilada, sendo extraída uma quantidade de gel viscoso e transparente presente dentro do parênquima de reserva da AV. Os filetes foram exaustivamente lavados com água destilada, prosseguindo para pesagem, passando por trituração, sendo extraída a mucilagem da planta.

Produção de nanofibras baseadas em blendas poliméricas

Inicialmente, soluções aquosas de PVA e CBP com diferentes concentrações e formulações específicas foram diluídas em água deionizada em temperatura ambiente e mantidos em agitação magnética por 30 min para obtenção de soluções homogêneas. O AV foi inserido na etapa de homogeneização dos polímeros para a produção da nanofibras.



Tabela 1 – Parâmetros e formulações utilizadas no processo de eletrofição

Cada formulação polimérica foi adicionada separadamente a uma seringa com capacidade de 20 mL, tendo um fluxo fixo em 0,75 $\mu\text{L/h}$. A voltagem utilizada foi variável de 16 a 24 kV fornecida por uma fonte de alta tensão. A seringa conectada à agulha teve diâmetro interno de 0.5 mm. Para a formação das nanofibras, um eletrodo aterrado esteve conectado a um coletor metálico coberto por folha de alumínio (20 cm x 20 cm), assim permitindo a formação do jato polimérico

Formulação	PVA (%)	BCP (g)	AV (g)	Voltagem (kV)	Tempo de eletrofição (h)	Distância entre placa coletora e agulha (cm)	Taxa de infusão ($\mu\text{L}/\text{min}$)
1	11	2,5	2,5	24	6	14	0,75
2	8	0	0	22	6	13	1,5

ejetado na direção do alvo. As nanofibras foram coletadas a uma distância de 13 e 14 cm entre a ponta da agulha e o coletor. O processo de eletrofição foi realizado em temperatura ambiente de $24^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

Ensaio de resistência à tração

O ensaio de tração das nanofibras de PVA 8% e PVA11%+CBP+AV foi realizado em uma máquina universal de ensaios mecânicos, com velocidade de 10 mm/s, e com o auxílio de célula de carga 2 kiloNewtons (kN), os ensaios seguiram a norma ASTM 882 (SOSIATI; WIDODO; NUGROHO, 2018).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foram preparadas formulações homogêneas obtidas em diferentes concentrações conforme mostra a Tabela 1. Houve a necessidade no aumento da taxa de infusão na formulação (1), pois esta possuía aspecto mais viscoso necessitando de uma infusão mais eficiente. Estudos anteriores indicam concentrações variando de 8% a 12% como ótimas na produção de nanofibras, resultando em melhor dissolução no solvente, além de fibras de menor diâmetro (PARK et al., 2010; YUSUF et al., 2016).

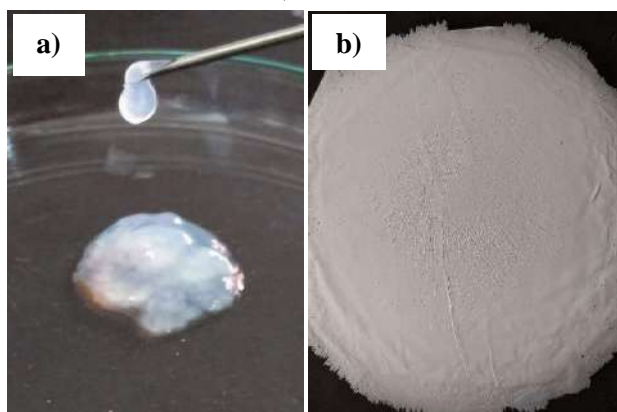


Figura 1 – Blenda polimérica contendo PVA, CBP e AV (a) e filme de nanofibras eletrofiadas de PVA+CBP+AV.



Para um material ser utilizado como curativo deve possuir propriedades mecânicas adequadas para manutenção da sua integridade durante o uso. Um método padrão usado para medir as características físicas de um curativo é o teste de resistência a tração. A resistência à tração demonstra como o curativo suporta as forças que afetam em direção do plano do curativo (HAKKARAINEN et al., 2016). Para esta análise foram utilizadas duas amostras com diferentes concentrações, conforme tabela 1: nanofibras de PVA 8% e nanofibras de PVA 11% contendo CBP e AV, onde a espessura e a largura das nanofibras obtidas foram em média 0,05 mm e 10,0 mm, respectivamente.

Os resultados obtidos por meio do teste de tração foram de 2.837 MegaPascals (MPa) para a fibra PVA 8% e 2.560 MPa para a fibra PVA 11%+CBP+AV. As nanofibras de PVA 8% apresentaram maior flexibilidade por não haver outros componentes poliméricos na solução eletrofiada. Foi observada uma diminuição na capacidade de resistência a tração nas nanofibras associadas ao CBP e AV, onde a resistência a tração foi reduzida. Este fato pode ter relação com a presença do AV, visto que estudos anteriores indicam que a elasticidade da membrana eletrofiada reduz quando há o aumento da concentração de AV na composição (SOSIATI; WIDODO; NUGROHO, 2018). A literatura descreve que a resistência à tração da pele varia entre 2 a 28 MPa (GZIK et al., 2017). Assim, pode-se afirmar que as nanofibras de PVA+CBP+AV obtidas no presente trabalho demonstram características promissoras no que diz respeito à aplicação em lesões na derme e epiderme, além da possibilidade de funcionalização com biomoléculas e nanopartículas úteis no processo de cicatrização.

4. CONCLUSÃO

Filmes de nanofibras eletrofiadas foram produzidos com o objetivo de aplicação em ferimentos na pele. Dentre as composições testadas, a que continha CBP e AV mostrou-se adequada para uso tópico na pele, uma vez que os testes de resistência a tensão comprovaram que a mesma se equipara a resistência da pele sadia. Em adição, os componentes da nanofibras produzida são biocompatíveis e biodegradáveis, colocando-as, portanto, como promissores curativos.

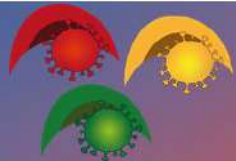
5. REFERÊNCIAS

DA SILVA, I. B. et al. Sugarcane biopolymer as a guide tube in the regeneration of peripheral nerves in rats. **International Journal of Morphology**, v. 37, n. 1, p. 289–295, 2019.

GZIK, M. et al. **Innovations in Biomedical Engineering**. [s.l.] Springer International Publishing, 2017. v. 623

HAIDER, A.; HAIDER, S.; KANG, I. K. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. **Arabian Journal of Chemistry**, p. 1–24, 2015.

HAKKARAINEN, T. et al. Nanofibrillar cellulose wound dressing in skin graft donor site treatment. **Journal of Controlled Release**, v. 244, p. 292–301, 2016.



- HASATSRI, S. et al. Comparison of the Morphological and Physical Properties of Different Absorbent Wound Dressings. **Dermatology Research and Practice**, v. 2018, 2018.
- KHALID, A. et al. Bacterial cellulose-TiO₂ nanocomposites promote healing and tissue regeneration in burn mice model. **RSC Advances**, v. 7, n. 75, p. 47662–47668, 2017.
- LIU, S.; RENEKER, D. H. Droplet-jet shape parameters predict electrospun polymer nanofiber diameter. **Polymer**, v. 168, n. December 2018, p. 155–158, 2019.
- NEMATI, S. et al. Current progress in application of polymeric nanofibers to tissue engineering. **Nano Convergence**, v. 6, n. 1, 2019.
- OLIVEIRA, G. M. DE et al. Curativo de celulose bacteriana para o tratamento de lesões por pressão em pacientes hospitalizados. **Revista Enfermagem Atual In Derme**, v. 87, n. Edição Esp, 8 abr. 2019.
- PARK, J. C. et al. Electrospun poly(vinyl alcohol) nanofibers: Effects of degree of hydrolysis and enhanced water stability. **Polymer Journal**, v. 42, n. 3, p. 273–276, 2010.
- PATERSON-BEEDLE, M. et al. Cellulosic exopolysaccharide produced from sugarcane molasses by a Zoogloea sp. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, n. 4, p. 375–383, 2000.
- PINTO, F. C. M. et al. Acute toxicity, cytotoxicity, genotoxicity and antigenotoxic effects of a cellulosic exopolysaccharide obtained from sugarcane molasses. **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 556–560, fev. 2016.
- PORTELA, R. et al. Bacterial cellulose: a versatile biopolymer for wound dressing applications. **Microbial Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 586–610, 2019.
- ROWAN, M. P. et al. Burn wound healing and treatment: Review and advancements. **Critical Care**, v. 19, n. 1, p. 1–12, 2015.
- SÁNCHEZ-MACHADO, D. I. et al. Aloe vera: Ancient knowledge with new frontiers. **Trends in Food Science and Technology**, v. 61, p. 94–102, 2017.
- SAPOUNTZI, E. et al. Recent advances in electrospun nanofiber interfaces for biosensing devices. **Sensors (Switzerland)**, v. 17, n. 8, 2017.
- SHAHABADI, S. M. S.; BRANT, J. A. Bio-inspired superhydrophobic and superoleophilic nanofibrous membranes for non-aqueous solvent and oil separation from water. **Separation and Purification Technology**, v. 210, n. June 2018, p. 587–599, 2019.
- SOSIATI, H.; WIDODO, A. N.; NUGROHO, A. W. The influence of Aloe vera concentration on morphology and tensile properties of electrospun Aloe vera-PVA nanofiber. **Jurnal Sains Materi Indonesia**, v. 19, n. 4, p. 157–162, 31 jul. 2018.



THENMOZHI, S. et al. Electrospun nanofibers: New generation materials for advanced applications. **Materials Science and Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology**, v. 217, p. 36–48, 2017.

TOPUZ, F.; UYAR, T. **Electrospinning of cyclodextrin functional nanofibers for drug delivery applications** *Pharmaceutics*, 2019.

WU, T. et al. Resorbable polymer electrospun nanofibers: History, shapes and application for tissue engineering. **Chinese Chemical Letters**, v. 31, n. 3, p. 617–625, 2020.

YUSUF, Y. et al. Study of parallel oriented electrospun polyvinyl alcohol (PVA) nanofibers using modified electrospinning method. **AIP Conference Proceedings**, v. 1725, n. April 2016, 2016.

6. AGRADECIMENTOS

Ao laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados (BIONANO-UFPE), a Polisa Biopolímeros para Saúde, a Farmácia Viva (UFPE-CAV), a Fundação de Amparo à Pesquisa de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa concedida e a todas às instituições que contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

GENOSENSOR NANOESTRUTURADO PARA DETECÇÃO IMPEDIMÉTRICA DE *Leishmania chagasi*

M. L. S. BANDEIRA¹, A. G. SILVA JUNIOR^{1,2}, F. L. MELO³, M. D. L. OLIVEIRA^{1,2} e
C. A. S. ANDRADE^{1,2}

¹ Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brasil;

² Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brasil;

³ Laboratório de Doenças Transmissíveis, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, 50670-420 Recife, PE, Brasil.

E-mail para contato: salustianomalul@gmail.com

RESUMO – A leishmaniose visceral é uma zoonose causada pelo protozoário da espécie *Leishmania chagasi*. Os métodos de diagnóstico atuais para detecção da doença apresentam limitações como o tempo de análise, reações cruzadas e elevado custo de equipamentos e insumos. Assim, faz-se necessária a busca por alternativas para o diagnóstico mais rápido, sensível e menor custo. Biossensores eletroquímicos representam uma ótima solução para o diagnóstico presuntivo. A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e a voltametria cíclica (VC) são técnicas eletroquímicas utilizadas para avaliar esses dispositivos. O presente trabalho objetiva o desenvolvimento de uma plataforma genossensora para detecção de *L. chagasi* presente em amostras de soro de cães com suspeita da doença. A montagem da plataforma é composta por camadas automontadas de ácido 4-mercaptopbenzóico, nanopartículas de óxido de zinco (NpsZnO) e primer específico. O estudo da interação do biossensor frente a diferentes concentrações conhecidas de sequências-alvo de DNA genômico de *L. chagasi* indicam a efetividade do processo de hibridização. Testes com cinco diferentes amostras de soro de cães infectados com *L. chagasi* foram realizados e apontaram a detecção do genoma-alvo por meio da VC e EIE, confirmando o funcionamento do biossensor. Ademais, o sistema foi submetido a análise morfológica por microscopia de força atômica para comprovar a montagem. O sensor desenvolvido representa como uma excelente alternativa para o diagnóstico presuntivo de *L. chagasi*.

Palavras-chave: Diagnóstico; Eletroquímica, Leishmaniose; Genossensor, Nanotecnologia.

ABSTRACT – Visceral leishmaniasis is a zoonosis caused by the protozoan of the species *Leishmania chagasi*. Current diagnostic methods for detecting the disease have limitations such as analysis time, cross reactions and high cost of equipment and supplies. Thus, it is necessary to search for alternatives for a faster, cheaper and more sensitive diagnosis. Electrochemical



*biosensors represent a great solution for presumptive diagnosis. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry (CV) are electrochemical techniques used to evaluate these devices. The present work aims to develop a sensor platform for the detection of *L. chagasi* present in serum samples from potentially infected dogs. The platform assembly is composed of self-assembled monolayers of 4-mercaptobenzoic acid, zinc oxide nanoparticles (NpsZnO) and a specific primer. The studies of the biosensor interaction against different known concentrations of *L. chagasi* genomic DNA target sequences indicate the effectiveness of the hybridization process. Tests with five different serum samples from *L. chagasi* infected dogs were performed and indicated the detection of the target genome by means of VC and EIE, confirming the effectiveness of the biosensor. In addition, the system was subjected to morphological analysis by atomic force microscopy to prove the assembly. The developed sensor represents an excellent alternative for the presumptive diagnosis of *L. chagasi*.*

Keywords: Diagnosis; Electrochemistry; Leishmaniasis; Genosensor; Nanotechnology.

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é doença causada por protozoários do gênero *Leishmania*. A doença é reconhecida como a segunda causa de mortalidade entre as doenças parasitárias, atrás apenas da malária, e causa entre vinte e trinta mil mortes ao ano (Kevric *et al.*, 2015). É uma zoonose com várias manifestações clínicas que variam de acordo com a espécie. Nas Américas, a espécie responsável pela forma visceral da doença é a *Leishmania chagasi*, sinônimo para *Leishmania (L.) infantum chagasi* (Lima *et al.*, 2017).

O principal reservatório da *L. chagasi* no ambiente urbano são cães. É estimado que a razão entre infecção humana e canina na Amazônia brasileira é de 4:1 (Lima *et al.*, 2017). No Brasil, foi constatado que as residências onde havia um ou mais animais, os moradores apresentavam maiores chances de desenvolverem a doença, quando comparado a residências sem animais (Marques *et al.*, 2017). Sua presença no ciclo biológico é a responsável pela natureza endêmica da doença (Curi *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2017).

Testes confirmatórios são necessários para decidir quais pacientes devem ser tratados considerando que os sinais clínicos na leishmaniose visceral (LV) não são específicos. (Chappuis *et al.*, 2007). O método parasitológico ainda é considerado o padrão-ouro para o diagnóstico da doença. A identificação microscópica direta das formas amastigotas em esfregaços de aspirado de linfonodo, medula óssea, baço, fígado, pele e sangue corados com coloração específica é uma forma simples de diagnosticar a LV (Laurenti, 2009). Apesar da elevada sensibilidade quando há análise combinada de tecidos, a coleta de tecido esplênico acarreta o risco de hemorragia aguda fatal (WHO, 2008) e a coleta de medula óssea pode ser bastante dolorosa e desconfortável para o paciente (Khatun *et al.*, 2017).

Dentre os testes sorológicos, destacam a imunofluorescência indireta (RIFI), o ensaio imunoenzimático (ELISA) e teste de aglutinação direta (DAT). Essa classe de testes possui desvantagens descritas a seguir: Apesar da redução do título de anticorpos após o tratamento eficiente do paciente, eles ainda podem ser detectados anos após a cura. A outra desvantagem é que uma parcela significativa da população de áreas endêmicas para LV é positiva para anticorpos anti-*Leishmania* mesmo sem ter desenvolvido sintomas clínicos (Chappuis *et al.*, 2007).

Existem ainda os testes moleculares, os quais são baseados na amplificação de fragmentos de DNA, utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variantes (Nunes *et al.*, 2007).



A sensibilidade e especificidade desta técnica variam de acordo com o tipo de amostra utilizado (Khatun *et al.*, 2017). Em adição, é um procedimento mais demorado quando comparado às outras técnicas e requer adequações físicas e profissionais especializados para seu desenvolvimento, o que pode explicar a reduzida aplicação na rotina clínica (Nunes *et al.*, 2007). Desta forma, a busca por alternativas inovadoras para detecção de *L. chagasi* se faz necessária, em especial empregando métodos de detecção rápidos, sensíveis e de baixo custo. Uma excelente abordagem é o desenvolvimento de biossensores.

Biossensores são dispositivos analíticos que realizam ensaios bioanalíticos complexos, com uma estrutura que compreende um elemento sensor biológico ativo (responsável pela especificidade ao analito-alvo), um transdutor físico-químico que converterá o evento da detecção em um sinal elétrico detectável e um sistema de processamento de sinal (Grieshaber *et al.*, 2008; Luz *et al.*, 2013). Os elementos sensores são principalmente compostos por células, peptídeos, enzimas, anticorpos, fragmentos de DNA e RNA, dentre outros. Entre os transdutores mais utilizados podem ser destacados o óptico, piezoelétrico, calorimétrico e eletroquímico (Perumal; Hashim, 2014).

Os métodos eletroquímicos apresentam destaque entre os demais devido à facilidade no desenvolvimento de dispositivos portáteis e de fácil uso, podendo aplicá-los em áreas como diagnóstico e monitoramento ambiental (Hammond *et al.*, 2016). Para tal, as técnicas da voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) são as mais utilizadas. A configuração do biossensor eletroquímico consiste no uso de três eletrodos, como seguem: eletrodo de trabalho (ET), responsável pela interação com o analito-alvo, eletrodo de referência (ER), com papel de manter um potencial estável e reproduzível e contra-eletrodo (CE) cujo objetivo é fornecer uma corrente através da célula eletroquímica (Bănică, 2012). A interação do analito com o biossensor eletroquímico produzirá um sinal elétrico proporcional à concentração do analito, destacando, portanto, sua sensibilidade (Gulaboski; Pereira, 2008).

Com o aumento da relevância do estudo de biossensores eletroquímicos, muitos grupos passaram a tentar incorporar nanotecnologia à sua construção. Percebeu-se que a modificação de superfícies sensoras com nanomateriais conferia importantes características ao biossensor, como maior especificidade e rápida transferência de elétrons. As nanopartículas (Nps) vêm atraindo atenção dos pesquisadores por possuírem características como excelente condutividade, atividade eletrocatalítica, boa relação superfície/volume e, especialmente, por poderem ser funcionalizadas (Pérez-López & Merkoçi, 2011).

As nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) ganharam relevância por possuírem características físico-químicas bastante vantajosas para a construção destes, como ótima estabilidade química, alta área de superfície, alta eficiência catalítica e não toxicidade (Khan *et al.*, 2008). Dessa forma, tais características auxiliam consideravelmente na interface onde ocorre o reconhecimento biológico do analito com um sinal de transdução eletrônico (Kumar *et al.*, 2015; Tereshchenko *et al.*, 2016).

Portanto, o presente estudo objetiva o desenvolvimento de uma plataforma biossensora nanoestruturada para a biodetecção de *L. chagasi* de maneira rápida e sensível por meio da avaliação eletroquímica da plataforma e seu desempenho frente a diversas concentrações de amostras contaminadas por leishmaniose. O projeto representa uma proposta de competência multidisciplinar e uma inovadora alternativa de diagnóstico presuntivo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

As análises de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foram registradas na faixa

de frequência de 100 mHz a 100 kHz. A amplitude do potencial de onda senoidal aplicada é estudada a partir de 10 mV, enquanto o potencial de corrente contínua (dc) é limitado pelo potencial de circuito aberto. A voltametria cíclica (VC) é realizada com potencial de varredura de entre +0.7 a -0.2V com uma taxa de varredura de 50 mV s⁻¹. As medidas de VC e EIE são realizadas na presença de uma solução 10 mM K₄[Fe(CN)₆] / K₃[Fe(CN)₆] (1:1), usada como sonda redox em solução tampão fosfato-salina (PBS) pH 7,0.

A montagem da plataforma é iniciada após limpeza da superfície do ET com disco de ouro (Ø = 2 mm). O procedimento de montagem começa com a aplicação de 3 µL de uma solução de ácido 4-mercaptobenzóico (MBA) (5 mM) até a sua completa adsorção. Em seguida, 3 µL de uma solução contendo N-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS) (1:1, v/v) é adicionado ao eletrodo modificado por MBA. Posteriormente, nanopartículas de óxido de zinco modificadas por 3-aminopropil-trietoxissilano (NpsZnO-NH₂), para obter grupos químicos amina na superfície, suspensas em metanol (1mg/mL⁻¹), são aplicadas no eletrodo por 2 min. A montagem da plataforma nanossensora é finalizada com a aplicação de 2 µL do *primer leishmania R332* (GGCCGGTAAAGGCCGAATAG) (30 min) específico para o genoma de *L. chagasi*, resultando na obtenção do sistema sensor.

A análise estrutural foi realizada por um microscópio de força atômica (SPM-9500 *atomic force microscope*, Shumadzu, Tokyo, Japan) sobre mica clivada. As medidas foram realizadas em modo não-contato com cantilevers com sonda de silicone (Nanoworld, Japan, frequência de ressonância = 75 kHz, constante da mola = 3 N.m) à temperatura ambiente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após confirmação da montagem do sistema sensor, é avaliada a sua eficácia frente a diferentes concentrações da sequência alvo do DNA genômico complementar de *L. chagasi*. As concentrações utilizadas foram de 5 pg mL⁻¹, 1 pg mL⁻¹ e 0.5 pg mL⁻¹. O tempo de hibridização escolhido foi o mesmo tempo de incubação do primer, ou seja, trinta minutos. É possível observar, na voltametria cíclica, a redução das correntes de pico anódica e catódica à medida que as amostras de sequência alvo são depositadas no sistema sensor (Fig. 1a). Na análise impedimétrica (Fig. 1b), houve aumento do semicírculo de Cole-Cole de acordo com a concentração avaliada, indicando o real processo de interação e hibridização.

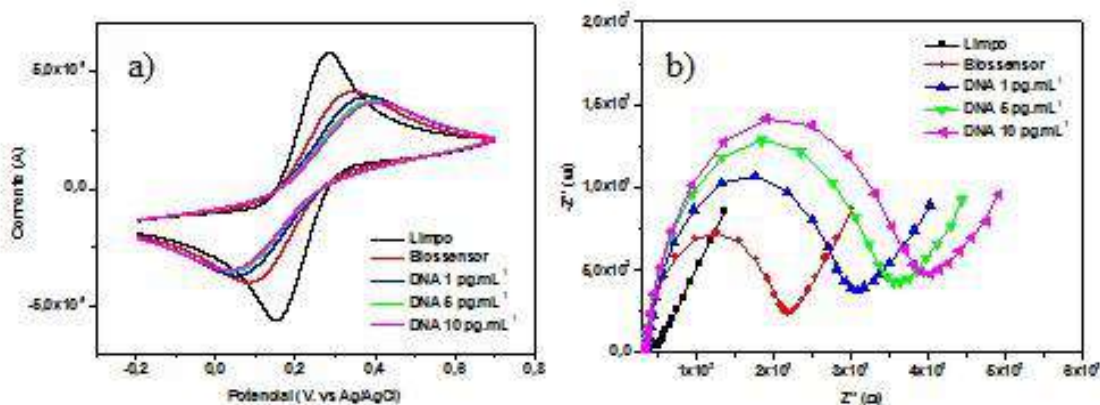


Figura 1 – Análise voltamétrica (a) e impedimétrica (b) da bioatividade do sistema sensor frente ao genoma de *L. chagasi* em diferentes concentrações (10 pg.mL⁻¹, 5 pg.mL⁻¹ e 1 pg.mL⁻¹).

Por fim, foram testadas amostras de soros de cães contaminados com *L. chagasi*. Mais uma vez, o procedimento tomado como padrão para montagem da plataforma foi repetido, com o tempo de hibridização de tinta minutos. O reconhecimento a partir da hibridização da plataforma sensora com o genoma de *L. chagasi* presente no soro foi provado eletroquimicamente com a redução das correntes de pico anódica e catódica como observado no voltamograma cíclico e o aumento do semicírculo de Cole-Cole, como representado no diagrama de Nyquist.

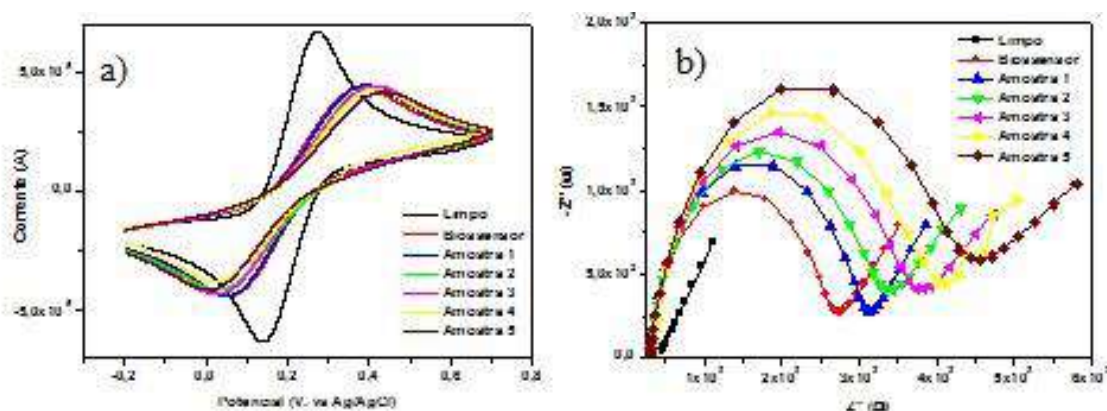


Figura 2 – Análise voltamétrica (a) e impedimétrica (b) do sistema sensor nanoestruturado frente a amostras de soro de cães contaminados.

Na Figura 3 temos a análise morfológica e topográfica realizada pela AFM, utilizada para atestar a montagem adequada de cada componente do biossensor e investigar as mudanças estruturais do sistema, antes e após a interação do biorreceptor com as amostras de DNA. Uma camada bem distribuída e uniforme de MBA na superfície de ouro do ET foi observada na Fig. 3a. O valor obtido de 72 nm confirma a formação da monocamada automontada. A deposição das nanopartículas modificadas e associadas ao primer resultou no aumento da rugosidade do sistema com a altura obtida de 0,22 μm (Fig. 3b).

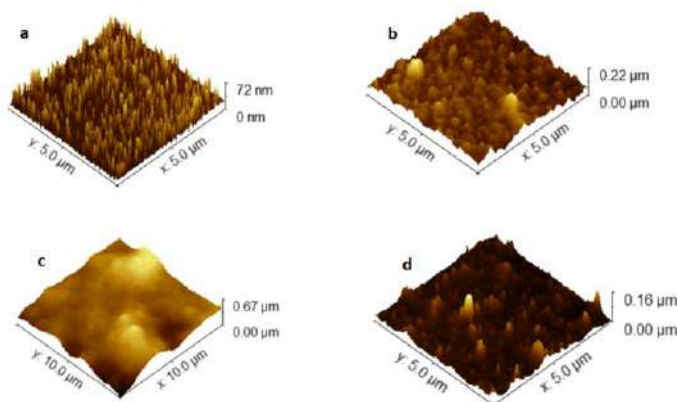
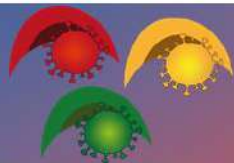


Figura 3 – Análise topográfica dos componentes do sistema genossensor, como segue: ácido 4-mercaptopbenzólico (a), Adição da nanopartícula de óxido de zinco (b), Plataforma montada + controle positivo (c), Plataforma montada + controle negativo (d).



A interação específica com soros de cães contaminados com *L. chagasi* resultou em uma mudança na morfologia da superfície, com uma altura de 0,67 μm (Fig. 3c), indicando o reconhecimento da amostra pelo sistema sensor. A Fig. 3d mostra a morfologia do sistema quando frente a amostras não-complementares, onde não houve mudanças significantes na superfície, confirmando a especificidade do biossensor

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram a eficiente resposta eletroquímica do processo de montagem da plataforma biossensora nanoestruturada e detecção do genoma de *L. chagasi* presentes em amostras de soro de cães contaminados. Em adição, a análise morfológica do eletrodo de ouro comprova a montagem eficaz do sistema, bem como a identificação bem-sucedida da amostra positiva e a não-detecção da amostra não específica. O sistema nanoestruturado desenvolvido, associado à análise eletroquímica e morfológica, possibilita a miniaturização e portabilidade do dispositivo sensor, caracterizando-o como uma alternativa inovadora para detecção de *L. chagasi*.

5. REFERÊNCIAS

- BĂNICĂ, F. G. Electrical Impedance-Based Sensors. In: *Chemical Sensors and Biosensors: Fundamentals and Applications*. JOHN WILEY & SONS, INC., 2012. p. 367–403.
- CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R. W.; BOELAERT, M. (2007). Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology*, 5(11), 873–882. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1748>
- CURI, N. H. de A.; MIRANDA, I.; & TALAMONI, S. A. (2006). Serologic evidence of Leishmania infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(1), 99–101. <https://doi.org/10.1590/s0074-027620060001000192002>
- GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VÖRÖS, J.; & REIMHULT, E. (2008). Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors*, 8(3), 1400–1458. <https://doi.org/10.3390/s80314000>
- GULABOSKI, R.; PEREIRA, C. M. Electrochemical Techniques and Instrumentation in Food Analysis. In: *Handbook of Food Analysis Instruments*.
- HAMMOND, J. L.; FORMISANO, N.; ESTRELA, P.; CARRARA, S.; & TKAC, J. (2016). *Electrochemical biosensors and nanobiosensors*. *Essays in Biochemistry*, 60(1), 69–80. <https://doi.org/10.1042/EBC20150008>
- KHAN, R.; KAUSHIK, A.; SOLANKI, P. R.; ANSARI, A. A.; PANDEY, M. K.; & MALHOTRA, B. D. (2008). Zinc oxide nanoparticles-chitosan composite film for cholesterol biosensor. *Analytica Chimica Acta*, 616(2), 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.04.010>
- KHATUN, M.; ALAM, S. M. S.; KHAN, A. H.; HOSSAIN, M. A.; HAQ, J. A.; ALAM JILANI, M. S.; KARIM, M. M. (2017). Novel PCR primers to diagnose visceral leishmaniasis using peripheral blood, spleen or bone marrow aspirates. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(8), 753–759. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.08.002>
- KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; & KEELING, J. H. (2015). New World and Old World Leishmania Infections. *Dermatologic Clinics*, 33(3), 579–593. <https://doi.org/10.1016/j.det.2015.03.018>



KUMAR, S.; AHLAWAT, W.; KUMAR, R.; & DILBAGHI, N. (2015). Graphene, carbon nanotubes, zinc oxide and gold as elite nanomaterials for fabrication of biosensors for healthcare. *Biosensors and Bioelectronics*, 70, 498–503. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.03.062>

LAURENTI, M. D. (2009). Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. *In Medicina* (Vol. 6).

LIMA, L. V. D. R.; CARNEIRO, L. A.; CAMPOS, M. B.; VASCONCELOS DOS SANTOS; T., RAMOS; P. K., LAURENTI; M. D.; SILVEIRA, F. T. (2017). Further evidence associating IgG1, but not IgG2, with susceptibility to canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) infantum chagasi* -infection. *Parasite*, 24. <https://doi.org/10.1051/parasite/2017039>

LUZ, R. A. S.; IOST, R. M.; CRESPILO, F. N. Nanomaterials for Biosensors and Implantable Biodevices. In: *Nanobioelectrochemistry: From Implantable Biosensors to Green Power Generation*. [s.l: s.n.]. p. 1–137.

MARQUES, N. T. A.; GONGALVES, V. M. N.; DE ALMEIDA, C. B.; FRANCO, M. L. & GALHARDO, J. A. (2017). Geoprocessamento Aplicado À Epidemiologia Da Leishmaniose Visceral. *Hygeia - Revista Brasileira de Geografia Médica e Da Saúde*, 13(26), 1980–1726. <https://doi.org/10.14393/hygeia132613>

NUNES, C. M.; DIAS, A. K. K.; GOTTARDI, F. P.; DE PAULA, H. B.; AZEVEDO, M. A. A.; LIMA, V. M. F. de; & GARCIA, J. F. (2007). Avaliação da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. *Brazil. J. Vet. Parasitol.*, 16(2), 67–71.

PÉREZ-LÓPEZ, B.; & MERKOÇI, A. (2011). Nanomaterials based biosensors for food analysis applications. *Trends in Food Science and Technology*, 22(11), 625–639. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.04.001>

PERUMAL, V.; HASHIM, U. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. *Journal of Applied Biomedicine*, v. 12, n. 1, p. 1–15, 2014.

TERESHCHENKO, A.; BECHELANY, M.; VITER, R.; KHRANOVSKY, V.; SMYNTYNA, V.; STARODUB, N.; & YAKIMOVA, R. (2016). Optical biosensors based on ZnO nanostructures: Advantages and perspectives. A review. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 229, 664–677. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.01.099>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2008). Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. The use of visceral leishmaniasis rapid diagnostic tests. *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data*. 2008. ISBN 978 92 4159735 7 (NLM Classification: WC 715).

6. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo fomento em pesquisa, à Prof.^a Maria Danielly pelo auxílio nos experimentos e ao Prof. Fábio Lopes Melo pela disponibilização das amostras-controle.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS METAL-ORGÂNICAS MEDIADORAS DA TERAPIA FOTOTÉRMICA

A. M. Q. FELIX¹, C. dos S. SILVA² e S. A. Jr²

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Fisiologia;

² Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Departamento de Química Fundamental.

E-mail para contato: aiany.a@hotmail.com.

RESUMO – Considerando as estruturas metal-orgânicas (MOFs) quanto a sua versatilidade, observa-se que elas podem ser modificadas e assim ter diversas propriedades incorporadas. Sendo assim este estudo teve como objetivo produzir uma estrutura zeolítica de imidazolato (ZIF-8) dopada com 25% de íons Cu^{2+} e avaliar sua eficácia para uma potencial aplicação na terapia fototérmica (TFT), além de realizar demais caracterizações de estabilidade. As características do sistema foram confirmadas por técnicas de caracterização, como análise por difração de raios-X (DRX), termogravimetria (TGA) e transdução fototérmica. Os resultados sugeriram a manutenção da rede cristalina e das propriedades típicas dos cristais da ZIF-8, além da elevada estabilidade térmica, associada a uma boa capacidade do sistema em absorver fótons na faixa do infravermelho (irradiação do laser 980 nm) e transforma-los em energia térmica. Este estudo permitiu verificar de modo preliminar que a nanoestrutura metal-orgânica ZIF-8, possui características que podem ser moduladas, e capazes de torna-la um agente promissor para aplicação em terapias fototérmicas.

Palavras-chave: Nanomateriais. MOFs. Hipertermia.

ABSTRACT – Considering the metal-organic structures (MOFs) regarding their versatility, it is observed that they can be modified and thus have several properties incorporated. Therefore, this study aimed to produce a zeolytic structure of imidazolate (ZIF-8) doped with 25% Cu^{2+} ions and evaluate its effectiveness for a potential application in photothermal therapy (TFT), in addition to performing other stability characterizations. The characteristics of the system were confirmed by characterization techniques, such as X-ray diffraction analysis (XRD), thermogravimetry (TGA) and photothermal transduction. The results suggested the maintenance of the crystalline network and the typical properties of the ZIF-8 crystals, in addition to the high thermal stability, associated with a good capacity of the system to absorb photons in the infrared range (laser irradiation 980 nm) and transform them in thermal energy. This study allowed us to



verify in a preliminary way that the metal-organic nanostructure ZIF-8, has characteristics that can be modulated, and capable of making it a promising agent for application in photothermal therapies.

Keywords: Nanomaterials. MOFs. Hyperthermia.

1. INTRODUÇÃO

Os materiais porosos despertam interesse a algum tempo por apresentarem um vasto número de aplicações, resultado das suas características morfológicas e estruturais. Dentre os materiais porosos, destaca-se uma classe formada por sólidos porosos ordenados e cristalinos, chamados de MOFs (*Metal-organic framework*), formados pela interação entre íons ou clusters metálicos e ligantes orgânicos (James, 2003; Férey, 2008). Dentre as subfamílias de MOFs, uma vem despertando interesse, as ZIFs (*Zeolitic imidazolate frameworks*), por combinar características de redes metal-orgânicas com a elevada estabilidade térmica e química das zeólitas, dentre essas estruturas algumas são bastante representativas, como é o caso da ZIF-8, formada por átomos de zinco (Zn) e íons imidazolato (Im) (Yan, 2012; Anh, 2010).

As diversas possibilidades estruturais da ZIF-8 são resultado de modificações que podem ser realizadas por incorporação de nanopartículas metálicas ou semicondutoras, como também pela introdução substitutiva de cátions metálicos na rede cristalina, esta última chamada de dopagem (Schejn, 2014; Luz, 2010).

Neste trabalho, a dopagem da ZIF-8 foi feita com íons Cu^{2+} , constituindo 25% da porção metálica do material, essa proporção tomou por base outros trabalhos que utilizaram tais proporções (Schejn, 2016; Silva, 2017). A dopagem com íons Cu^{2+} na ZIF-8 desloca sua absorção para a área do infravermelho, correspondendo assim a faixa da chamada janela biológica, com capacidade de induzir a hipertermia localizada e a morte celular, sendo uma ótima alternativa às terapias convencionais (Yurtsever, 2016; Schejn, 2016). Neste trabalho, os nanocristais de ZIF-8 dopados com Cu^{2+} foram obtidos de forma bem-sucedida e posteriormente caracterizados, mais pesquisas sobre esse sistema estão em andamento, dada sua potencial aplicação em sistemas biológicos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram sintetizados nanocristais de ZIF-8 segundo metodologia proposta por Tiwari (2017) e colaboradores, algumas modificações foram realizadas na proporção dos solutos, para conseguir a dopagem com 25% de íons Cu^{2+} . Duas soluções foram preparadas, uma solução foi preparada com nitrato de cobre e nitrato de zinco dissolvidos em água Mili-Q, e a outra solução foi preparada com 2-metilimidazol dissolvido em metanol.

Ambas as soluções foram agitadas separadamente até a completa dissolução dos solutos, a solução contendo metais foi misturada por gotejamento à solução contendo o soluto orgânico e a agitação foi mantida durante 15 minutos, sob temperatura ambiente (27-30°C). Em seguida, o produto obtido foi lavado com metanol e submetido a centrifugação (6000 rpm) por três ciclos, com duração de 30 minutos cada, o produto final foi colocado em uma estufa à vácuo com temperatura de 40°C até sua completa secagem, obtendo um pó.

Em seguida procederam-se as caracterizações, a difração de raios-x (DRX) foi realizada sob temperatura ambiente, em um difratômetro com parâmetros $2\theta = 5 - 50^\circ$, comprimento de onda



igual a $1,5406 \text{ \AA}$ e velocidade de 2 min^{-1} . Na análise termogravimétrica (TGA) foram utilizadas amostras de 10 mg de cada sistema em uma cápsula de platina, submetidas a atmosfera de ar (100 mL/min) com razão de aquecimento de 10°C/min , a uma faixa de temperatura de 10 a 900°C , para obtenção das curvas. Com relação a análise de transdução fototérmica, foi utilizada uma cubeta de quartzo (caminho óptico = 1 mm), contendo 1mL de suspensão de cada uma das amostras, a qual foi irradiada durante 3 minutos com um laser de diodo com comprimento de onda de 980nm, fibra óptica da *Ocean Optics*, tipo UV/SR, diâmetro de $600\mu\text{m}$ e densidade de potência de $1,0\text{W/cm}^2$, a temperatura foi registrada durante a irradiação e continuou a ser monitorada, nos 3,5 minutos posteriores ao desligamento do laser.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O material obtido utilizando íons Cu^{2+} apresenta a porcentagem de 25% desse reagente e os cristais produzidos foram nomeados como ZIF-8/ $\text{Cu}_{25\%}$, enquanto o material sem dopagem consistia apenas na ZIF-8.

Uma característica importante para o sistema em questão é a estabilidade térmica, por isso foi realizada a análise termogravimétrica (TGA), com a estabilidade e decomposição sendo avaliadas e apresentadas pela figura 1. As amostras

se mantiveram estáveis até cerca de 350°C , com pequenas perdas de massa relacionadas à perda de moléculas de água presentes nas suas cavidades ou superfície (An, 2009), após isso ocorreu um comportamento típico de decomposição, com 62-65% de perda de massa, interpretado como a perda do ligante orgânico metilimidazol (decomposição exotérmica) até cerca de 650°C . Esse perfil indicou uma alta estabilidade térmica para as redes tridimensionais das amostras, sugerindo viabilidade do sistema quanto a estabilidade térmica (Yin, 2015).

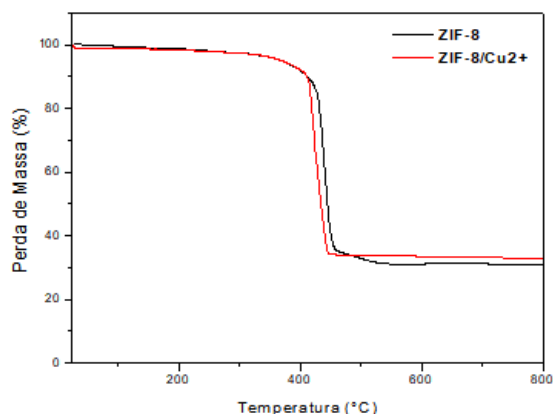


Figura 1 - Curvas TGA do sistema em atmosfera inerte de N_2 .

A técnica de difração de raios X é fundamental para caracterizar materiais cristalinos, permitindo elucidar suas estruturas, sendo esperado que, no caso dos materiais porosos, as ordens estruturais sejam relativamente altas e os planos de difração bem definidos. A Figura 2 apresenta esse perfil de difração dos cristais, com picos de difração bem definidos, indicando a ocorrência de alta cristalinidade. Os difratogramas possuem seus picos com valores de 2-theta e as intensidades



relativas, em concordância com o padrão teórico – definido como calculado - obtido da base de dados do *The Cambridge Crystallographic Data Center*, para a ZIF-8 (Tian et al., 2007).

Nesse difratograma, percebe-se que em todas as amostras, não houve a presença de picos de difração adicionais, indicando a manutenção da fase cristalina no material sintetizado mesmo com a inserção dos íons Cu^{2+} , e isso ocorreu porque estes íons possuem tamanho de raio iônico (0,71 Å), apenas um pouco menor que o raio iônico do íon Zn^{2+} (0,74 Å), não gerando grandes alterações na rede (Schejn, 2016).

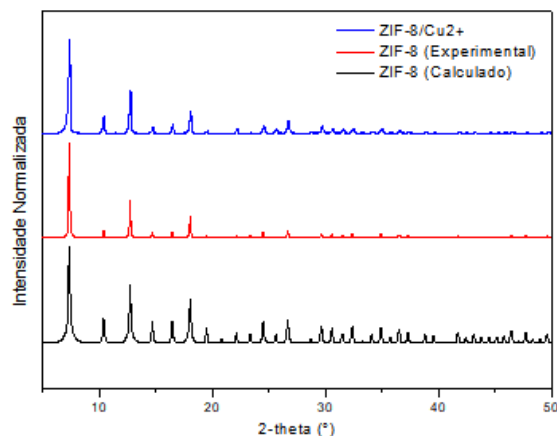


Figura 2 - Espectros de DRX obtidos a partir do pó dos cristais.

O desempenho fototérmico foi avaliado com os sistemas dispersos ($\sim 15 \text{ mg/ml}^{-1}$) em solução tampão PBS (pH 7,2) e mantidos sob emissão de um laser 980 nm, com densidade de potência $1,0 \text{ W cm}^{-2}$, por 3 minutos (180 segundos), a temperatura foi registrada em intervalos de 5 segundos e após isso foi acompanhado o resfriamento das dispersões por 3,5 minutos (210 segundos). Além dos sistemas, foram avaliados também, como controle, a ZIF-8 em suspensão e o PBS.

Como pode ser visualizado na figura 3, as temperaturas dos controles sofreram aumentos discretos de temperatura, em comparação com os sistemas em dispersão, a ZIF-8 aumentou cerca de $4,0^\circ\text{C}$ da sua temperatura inicial, enquanto o PBS apenas 1°C , temperaturas pronunciadamente baixas, enquanto o sistema com a presença dos íons Cu^{2+} , sofreu aumento de cerca de 12°C , uma temperatura significativamente mais alta. Estes resultados enfatizam a notável capacidade de transdução fototérmica da ZIF-8 dopada com íons Cu^{2+} , quanto ao resfriamento, foi possível observar que todos retornaram a temperatura inicial à medida que liberaram a energia térmica.

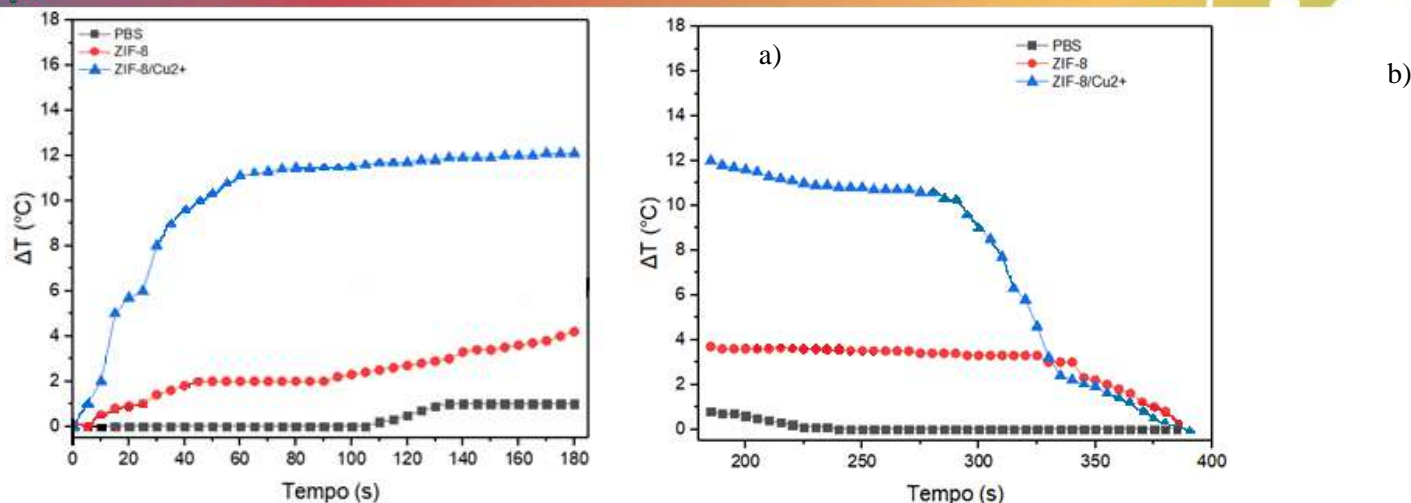


Figura 3 - Curvas de aquecimento (a) e resfriamento (b) dos sistemas em dispersão e do controle, por 380 segundos.

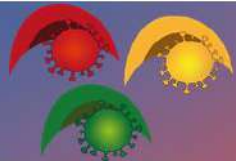
4. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram realizadas a síntese e caracterização estrutural e morfológica, a investigação principal ocorreu em torno do sistema dopado com íons Cu²⁺, foi demonstrada a manutenção da fase cristalina e conseqüentemente da estrutura típica da ZIF-8, o tamanho médio dos nanocristais se mantendo na faixa de 300-350 nm, por termogravimetria verificou-se uma alta estabilidade térmica, além disso por meio de um estudo de transdução fototérmica, demonstrou-se que a presença de íons Cu²⁺ tornam este material um forte candidato a agente de transdução, sendo esse mecanismo relacionado a transições eletrônicas d-d dos orbitais dos íons Cu²⁺.

Mais investigações estão sendo realizadas, a fim de se obter a eficiência da conversão fototérmica por meio de outros ensaios, como ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo*, demonstrando a eficiência do sistema frente às células neoplásicas de diversas linhagens.

5. REFERÊNCIAS

- ANH, P., CHRISTIAN J.D., FERNANDO, J.U.R., CAROLYN, B.K., MICHAEL, O'K.; OMAR M.Y. Synthesis, structure, and carbon dioxide capture properties of zeolitic imidazolate frameworks. *Acc Chem. Res.*, v. 43, p. 58-67, 2010.
- FÉREY, G. Hybrid porous solids: past, present, future. *Chem. Soc. Rev.*, v. 37, p. 191, 2008.
- FU, H. et al. Polyoxometalate-Based Metal–Organic Frameworks Assembled under the Ionothermal Conditions. *Cryst. Growth Des.*, v. 11, p. 458-465, 2011.
- JAMES, S.L. Metal-organic frameworks. *Chem. Soc. Ver.*, v. 32, p. 276-288, 2003.
- YAN, M. P. *Crystal growth of the metal-organic framework ZIF-8*. The University of Manchester, Manchester, 2012.
- LUZ, I.; LLABRÉS I XAMENA, F. X.; CORMA, A. Bridging homogeneous and heterogeneous catalysis with MOFs: “Click” reactions with Cu-MOF catalysts. *J. Catal.*, v. 276, p. 134–140, 2010.
- SILVA, C.S. *Explorando a transdução fototérmica de MOFs contendo íons Cu²⁺ e do híbrido HKUST-1/FA*. Tese – Programa de pós graduação em química, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.



SCHEJN, A.; ABOULAICH, A.; BALAN, L.; et al. Cu 2+-doped zeolitic imidazolate frameworks (ZIF-8): efficient and stable catalysts for cycloadditions and condensation reactions. *Catal. Sci. Technol.*, v. 5, p. 1829–1839, 2016.

SCHEJN, A. et al. Controlling ZIF-8 nano- and microcrystal formation and reactivity through zinc salt variations. *Cryst. Eng. Comm.*, v. 16, p. 4493, 2014.

TIAN, Y.Q. et al. Design and generation of extended zeolitic metal-organic frameworks (ZMOFs): Synthesis and crystal structures of zinc(II) imidazolate polymers with zeolitic topologies. *Chem. Eur. J.*, v. 13, p. 4146–4154, 2007.

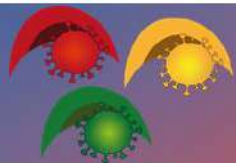
TIWARI, A., SINGH, A., GARG, N. et al. Curcumin encapsulated zeolitic imidazolate frameworks as stimuli responsive drug delivery system and their interaction with biomimetic environment. *Scientific Reports*, v. 7, p. 1-11, 2017.

YIN, H.; KIM, H.; CHOI, J.; YIP, A.C.K. Thermal stability of ZIF-8 under oxidative and inert environments: a practical perspective on using ZIF-8 as a catalyst support, *Chem. Eng. J.*, v. 278, p. 293-300, 2015.

YURTSEVER, H.A.; AKGÜNLÜ, M.Y.; KURT, T.; YURTTAS, A.S.; TOPUZ, B. Photocatalytic Activities of Ag+ Doped ZIF-8 and ZIF-L Crystals. *JOTCSA*, v. 3, p. 265-280, 2016.

6. AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, prof. Severino Júnior, pelo seu apoio científico e humano;
À minha co-orientadora, Cecília, pelas importantes contribuições e apoio;
À instituição que apoiou estruturalmente o trabalho: UFPE;
Às agências de fomento: CNPq e Capes.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

PLATAFORMA FLEXÍVEL NANOESTRUTURADA BASEADA EM POLÍMERO CONDUTOR CONJUGADO COM NANOPARTÍCULAS METÁLICAS PARA A DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO

K. Y. P. S. AVELINO^{1,2}, L. S. OLIVEIRA¹, N. LUCENA-SILVA³, C. A. S. ANDRADE^{1,2} e M. D. L. OLIVEIRA^{1,2}.

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica, Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados;

² Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica;

³ Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

E-mail para contato: kareniasmim@hotmail.com

RESUMO – O papilomavírus humano (HPV) é um dos principais patógenos sexualmente transmissíveis que infecta o epitélio anogenital e as membranas mucosas. Em vista dos problemas relacionados ao diagnóstico clínico de papilomavírus, um biossensor eletroquímico flexível para detecção de diferentes genótipos de HPV foi desenvolvido. Uma plataforma nanoestruturada baseada em filme eletropolimerizado de polipirrol (PPy), nanopartículas metálicas e moléculas organossulfuradas foi construída para imobilização covalente de moléculas receptoras de DNA (sonda BSH16). A sequência de oligonucleotídeo foi projetada para reconhecer estritamente genótipos virais pertencentes à família BSH16 (HPV16, 31, 33, 35, 52 e 58). A voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foram utilizadas para a análise da modificação do eletrodo e monitoramento da hibridação molecular. Alterações eletroquímicas foram observadas após a exposição do biossensor a plasmídeos contendo o gene L1 de HPV. O biossensor proposto mostrou uma faixa de concentração linear para detecção do HPV16 de 100 pg μL^{-1} a 1 fg μL^{-1} . Um limite de detecção de 0,89 pg μL^{-1} e um limite de quantificação de 2,70 pg μL^{-1} foram obtidos, com um coeficiente de regressão de 0,98. Portanto, conclui-se que um sistema flexível inovador foi desenvolvido com sucesso para a pesquisa eletroquímica de genótipos de HPV de alto risco oncogênico com alta especificidade, seletividade e sensibilidade.

Palavras-chave: Biossensor. Espectroscopia de impedância. HPV. Nanotecnologia. Polipirrol. Voltametria cíclica.

ABSTRACT – The human papilloma virus (HPV) is one of the main sexually transmitted pathogens that infect the anogenital epithelium and mucous membranes. In view of the problems



regarding the clinical diagnosis of papillomavirus, an electrochemical flexible biosensor for detection of different HPV genotypes was developed. A nanostructured platform based on electropolymerized polypyrrole film (PPy), metallic nanoparticles and organosulfur molecules was built for covalent immobilization of DNA receptor molecules (BSH16 probe). The oligonucleotide sequence was designed to strictly recognize viral genotypes belonging to the BSH16 family (HPV16, 31, 33, 35, 52 and 58). Cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) were used for the analysis of the electrode modification and monitoring of molecular hybridization. Electrochemical changes were observed after exposure of the biosensor to plasmids containing the L1 HPV gene. The proposed biosensor showed a linear concentration range for HPV16 detection from 100 pg μL^{-1} to 1 fg μL^{-1} . A limit of detection of 0.89 pg μL^{-1} and limit of quantification of 2.70 pg μL^{-1} were obtained, with a regression coefficient of 0.98. Therefore, it is concluded that an innovative flexible system has been successfully developed for electrochemical research of high-risk oncogenic HPV genotypes with high specificity, selectivity, and sensitivity.

Keywords: Biosensor. Cyclic voltammetry. Impedance spectroscopy. HPV. Nanotechnology. Polypyrrole.

1. INTRODUÇÃO

Considerando-se os estudos clínicos e dados epidemiológicos que demonstram os impactos das infecções por HPV na saúde pública, o desenvolvimento de novos testes de diagnóstico torna-se essencial. O HPV, um vírus de DNA não envelopado, é um agente infeccioso oncogênico responsável por causar infecções nas mucosas e no epitélio anogenital. Este patógeno pode acarretar uma variedade de condições clínicas, incluindo verrugas, causadas por tipos virais de baixo risco oncogênico (HPV6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 61, 72, 73 e 81), e neoplasias, resultantes de alterações citogenéticas ocasionadas por tipos virais de alto risco oncogênico (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68) (HUTTER; DECKER, 2016). Entre os mais de 200 genótipos de HPV descritos na literatura, os tipos 16 e 18 destacam-se por estarem relacionados a maioria dos casos mundiais de carcinoma cervical (HUANG et al., 2015).

A identificação do tipo de HPV em amostras clínicas possibilita um melhor prognóstico para o paciente, um diagnóstico de câncer em estágio inicial e a implementação de estratégias terapêuticas dirigidas para a obtenção de resultados mais satisfatórios. Além disso, permite o rastreamento de genótipos virais mais frequentes em uma população. As principais técnicas moleculares utilizadas para a pesquisa de HPV compreendem a reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) e os ensaios de captura híbrida (CIVIT et al., 2012; HUANG et al., 2015). Apesar de serem específicos, estes métodos apresentam alguns obstáculos que limitam seu amplo uso em áreas hospitalares e laboratoriais, como os altos custos para a aquisição de equipamentos e protocolos experimentais complexos e demorados (CAMPOS-FERREIRA et al., 2016). Logo, o desenvolvimento de novos ensaios moleculares para a detecção de HPV com elevada acurácia e performance bioanalítica é de grande interesse para a promoção da saúde de pacientes infectados.

O progresso da pesquisa biotecnológica contribuiu para o desenvolvimento de dispositivos eletrônicos aplicáveis ao setor de diagnósticos clínicos. Os dispositivos sensoriais representam uma tendência emergente e tecnológica nas ciências biomédicas, contribuindo para a identificação, quantificação e monitoramento de espécies químicas específicas. Em especial, ressaltam-se os



biossensores eletroquímicos de DNA por serem sistemas de detecção que apresentam como agente de reconhecimento uma sequência oligonucleotídica imobilizada sobre a superfície de um transdutor eletroquímico. Nestes sistemas, o processo de biorreconhecimento é convertido em um sinal analítico mensurável e proporcional ao alvo detectado através de hibridação molecular (HUANG et al., 2017).

Com o advento da nanotecnologia e síntese de novos materiais em nanoescala, foi possível reduzir significativamente as limitações inerentes ao processo de construção dos biossensores de DNA, tais como, perda de estabilidade após ancoragem do biorreceptor e reprodutibilidade do sinal analítico. Entre os nanomateriais, destacam-se as nanopartículas de ouro (AuNPs) por possuírem características essenciais e aplicáveis ao desenvolvimento de sistemas biossensíveis. Estas apresentam elevada área de contato, elevada atividade catalítica, compatibilidade biológica, elevada condutividade, não-toxicidade e habilidade de adsorção molecular. Logo, em virtude destas propriedades físicas e químicas, a incorporação de AuNPs em sistemas de biodetecção pode aumentar a eficácia analítica e a robustez dos dispositivos sensores (WANG et al., 2016).

Os polímeros condutores também são considerados componentes funcionais para a nanoestruturação de plataformas sensoras, viabilizando novas possibilidades tecnológicas no design de biodispositivos. Esses materiais têm ampliado a possibilidade de modificação da superfície de eletrodos para o desenvolvimento de sensores com propriedades eletroquímicas aprimoradas, tais como elevada condutividade elétrica, capacidade de armazenamento de carga e elevada cinética de transporte de elétrons na interface eletrodo/solução. Dentre os polímeros condutores, filmes de PPy têm sido investigados devido ao potencial para a fabricação de sensores bioquímicos ultrasensíveis. Esta aplicação é devido a sua biocompatibilidade, estabilidade ambiental, presença de grupos químicos funcionais e elevada taxa de transferência de elétrons que contribui significativamente para a melhoria da sensibilidade dos sistemas de biodetecção (GERARD; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002).

O presente trabalho relata a construção de um biossensor eletroquímico flexível livre de marcadores utilizado na identificação de genótipos de HPV de alto risco oncogênico. O sistema de detecção foi baseado no uso de tiras flexíveis de ITO, sob as quais foram estruturadas nanoplataformas para a amplificação do sinal analítico. A modificação de superfície foi fundamentada em princípios de imobilização química entre os constituintes PPy, AuNPs e cisteamina (Cys). Além disso, uma nova sequência de oligonucleotídeo específica para o reconhecimento de genótipos virais pertencentes a família BSH16 (HPV16, 31, 33, 35, 52 e 58) foi usada como molécula biorreceptora.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 FABRICAÇÃO DE ELETRODOS MINIATURIZADOS FLEXÍVEIS

Em primeiro momento, consegue-se chegar ao dispositivo de diagnóstico através da construção de eletrodos de trabalho miniaturizados baseados em ITO, que serão utilizados como transdutores para o sistema de detecção de papilomavírus. O sistema foi baseado em tiras flexíveis de ITO com dimensões de 3 cm de altura por 8 mm de largura. Para padronizar a área eletroativa, uma folha adesiva de policloreto de vinila (PVC) com orifício circular (diâmetro de 5 mm) foi sobreposta sobre a superfície de ITO. Assim, foi possível obter um efeito de blindagem em regiões específicas do substrato de ITO condutor. Como resultado, uma área específica para a montagem do biossensor de DNA (0,2 cm²) e uma área disponível para o contato elétrico (0,8 cm²) foram



delineadas.

2.2 MODIFICAÇÃO BIOMOLECULAR DE SUPERFÍCIE TRANSDUTORA E IMOBILIZAÇÃO DE SEGMENTOS OLIGONUCLEOTÍDICOS

A primeira etapa de montagem do biossensor eletroquímico miniaturizado consiste na eletropolimerização de filme condutor de PPy. Para tal, os eletrodos de trabalho foram imersos em uma solução de ácido clorídrico a 0,5 M contendo o monômero pirrol a uma concentração de 30 mM. Através de medidas voltamétricas, foram aplicados seis ciclos de polimerização em uma faixa de potencial de -0,2 a +0,7 V com uma velocidade de varredura de 100 mV.s⁻¹. A segunda etapa compreende a síntese e deposição eletroquímica de AuNPs sobre o substrato orgânico polimérico. Utilizando uma solução de ácido tetracloroáurico a 0,25 mM, foram realizados dez ciclos de VC com uma faixa de potencial de +0,2 a -1 V e velocidade de varredura de 50 mV.s⁻¹. A terceira etapa refere-se a quimissorção de Cys sobre as estruturas nanométricas. Este processo fundamenta-se em interações covalentes estabelecidas entre os grupos tióis (-SH) das moléculas organossulfuradas e os átomos metálicos. Nesta etapa, foram adicionados 5 µL de uma solução de Cys a 2 mg/mL (proporção volumétrica de etanol:água igual a 3:1) por 30 minutos. Após obter a plataforma nanoestruturada de PPy-AuNPs-Cys, foi realizada a quarta etapa que se reporta a ancoragem da sonda aminada BSH16. A referida sequência oligonucleotídica foi projetada especificamente para reconhecer genótipos de alto risco oncogênico (HPV16, 31, 33, 35, 52 e 58). Primeiramente, 5 µL de glutaraldeído a 0,5% foram adicionados sobre a plataforma nanoestruturada por 10 minutos. Posteriormente, 2 µL de uma solução de oligonucleotídeos a 10 mM foram acrescentados por 15 minutos para a construção dos biodispositivos flexíveis. Por fim, a quinta etapa compreende o bloqueio dos sítios inespecíficos do sistema sensor com moléculas de albumina do soro bovino (BSA). Nesta etapa, foram acrescentados 2 µL de uma solução de BSA a 1% (pH 7,4) sobre a superfície dos eletrodos modificados por 30 segundos. Logo, através deste processo metodológico, um biossensor eletroquímico miniaturizado baseado em PPy-AuNPs-Cys-Sonda-BSA foi desenvolvido.

2.3 ENSAIOS DE BIOATIVIDADE

Com a finalidade de avaliar a especificidade, sensibilidade e seletividade do biossensor de DNA, foram realizados estudos de hibridação com a) plasmídeos recombinantes contendo a sequência de nucleotídeos do gene L1 de diferentes tipos de HPV e b) amostra contendo uma mistura de diferentes tipos de plasmídeos contendo o gene L1 de HPV's não pertencentes à família de reconhecimento da sonda (controle negativo). Em cada ensaio, o sistema de detecção foi exposto a 2 µL da amostra a ser testada por 15 minutos para promover o processo de biorreconhecimento. As diluições de todas as amostras biológicas foram preparadas com solução salina de tampão fosfato (PBS; pH 7,4) e mantidas congeladas.

2.4 MENSURAÇÃO ELETROQUÍMICA

O processo de desenvolvimento do biossensor de DNA e sua bioatividade foram monitorados por meio das técnicas de VC e EIE. As medidas eletroquímicas foram realizadas em um Potenciostato/Galvanostato Autolab PGSTAT 128N controlado por um computador através de um software de interfaceamento NOVA 1.11 (MetrohmAutolab, The Netherlands). Em adição, foi utilizada uma célula eletroquímica convencional contendo três eletrodos imersos em 20 mL de solução de ferro-ferricianeto de potássio K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] (1:1) a 10mM em PBS (pH



7,4), atuando como sonda redox. O protótipo flexível de ITO atuou como eletrodo de trabalho, o eletrodo de Ag/AgCl saturado com KCl a 3M e o eletrodo de platina foram usados, respectivamente, como eletrodo de referência e contra-referência. Os voltamogramas cíclicos foram registrados em uma faixa de potencial de -0,2 a +0,7 V com velocidade de varredura de 50 mV.s⁻¹. Os espectros de impedância foram registrados em uma faixa de frequência de 100 mHz a 100 KHz com um potencial de amplitude alternada de 10 mV. Todas as análises eletroquímicas foram realizadas em triplicatas, a temperatura ambiente e no interior de uma gaiola de Faraday.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 demonstra a caracterização eletroquímica das etapas de construção da plataforma flexível nanoestruturada. Verifica-se que o voltamograma cíclico para o eletrodo de ITO após a eletropolimerização do monômero pirrol apresenta uma elevada densidade de corrente com uma expressiva resposta amperométrica. Em concordância, o filme de PPy apresentou uma baixa resistência à transferência de carga ($R_{CT} = 0.02 \pm 0.007 \text{ k}\Omega$). É importante ressaltar que o processo de oxidação na superfície do eletrodo de trabalho leva à formação de um filme polimérico estável com elevada condutividade elétrica. Devido estas propriedades, o PPy é capaz de aumentar a sensibilidade e seletividade de sistemas bioanalíticos (GERARD; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002; MAHMOUDIAN, et al., 2011).

Verifica-se que após a eletrossíntese das AuNPs houve um decréscimo dos picos anódico e catódico e um aumento das propriedades resistivas ($R_{CT} = 0.05 \pm 0.003 \text{ k}\Omega$). Este resultado está relacionado às condições de síntese eletroquímica e às propriedades do filme de PPy, sobre o qual as AuNPs foram depositadas. Em razão do filme polimérico ser aderente à superfície de ITO e possuir uma fina espessura, espera-se que o PPy proporcione um maior número de sítios de nucleação para a formação de nanoestruturas. De acordo com Li e Shi (2005), essas características do filme polimérico conduz à fabricação de AuNPs com dimensões nanométricas reduzidas, presentes em um estado de não-agregação, que ocasiona uma diminuição de sua condutividade e aumento da área superficial.

Ao realizar a quimissorção de moléculas de Cys sobre as AuNPs pode-se observar uma maior resposta condutimétrica e uma maior taxa de transferência de elétrons ($R_{CT} = 0.03 \pm 0.01 \text{ k}\Omega$). Sabe-se que a molécula de Cys possui grupos funcionais tiol e amino que direcionam a formação de ligações covalentes entre nanoestruturas metálicas e biomoléculas. Em especial, o grupo amino pode ser protonado, passando a apresentar carga elétrica positiva que atrai eletrólitos carregados negativamente, como o ferricianeto $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ e ferrocianeto $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Este processo favorece a ocorrência de reações de oxido-redução em regiões adjacentes à superfície do eletrodo. Logo, constata-se que a Cys é um composto orgânico que atua como um espaçador molecular e contribui para o aumento da sensibilidade de sistemas eletroquímicos (WANG et al., 2016).

Em seguida, foi observado que a ancoragem das sondas sobre o eletrodo modificado com PPy-AuNs-Cys causou uma redução do sinal de corrente. Além disso, um maior registro impedimétrico foi constatado ($R_{CT} = 0.66 \pm 0.07 \text{ k}\Omega$). Este resultado está relacionado a uma baixa penetração do par redox no sistema sensor. Isto ocorre devido à repulsão eletrostática entre os grupos fosfato das sondas de DNA e as cargas negativas dos eletrólitos $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, contribuindo assim, para o bloqueio do processo redox na dupla camada elétrica (AVELINO et al., 2020). Como presumido, o bloqueio dos sítios inespecíficos do nanossistema de DNA com moléculas de BSA resultou em um decréscimo da medida voltamétrica e um aumento da

resistividade. Portanto, através destas caracterizações físico-químicas, foi possível comprovar a adequada montagem do biossensor eletroquímico em superfície de ITO.

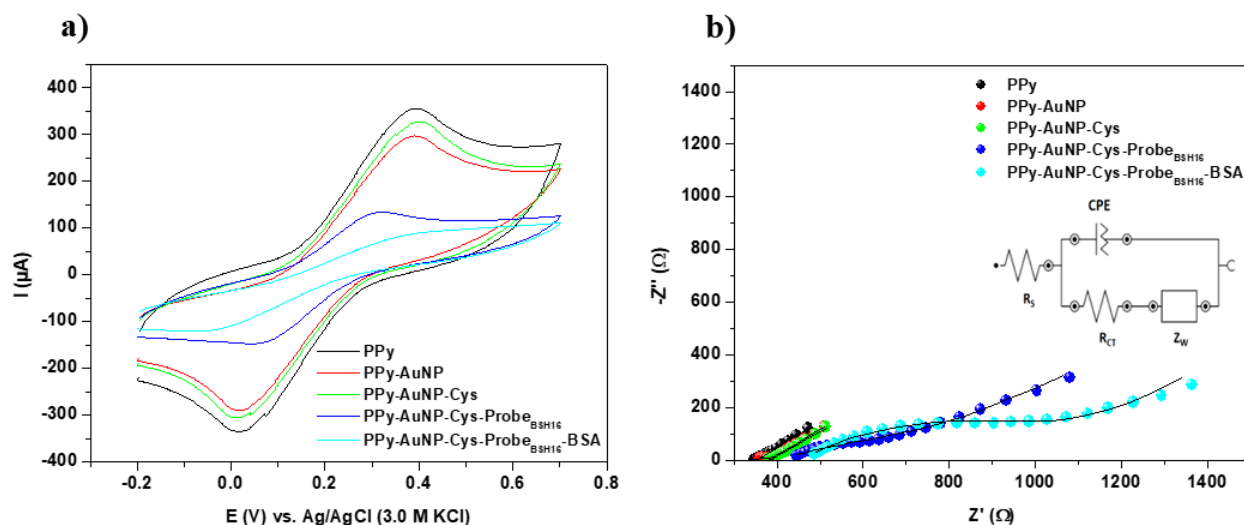


Figura 1 – Caracterização voltamétrica (a) e impedimétrica (b) de cada etapa de montagem do biossensor flexível. Inserção: circuito de Randles usado para a simulação teórica dos resultados impedimétricos (b)

Os voltamogramas cíclicos para o biossensor exposto a diferentes concentrações de plasmídeos recombinantes contendo o gene L1 de HPV16 foram exibidos na Figura 2a. As concentrações avaliadas de DNA alvo foram 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 e 100 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$. O processo de biorreconhecimento resultou em um decréscimo dos picos de oxidação e redução devido a menor cinética de transferência de elétrons. O limite de detecção, limite de quantificação e a sensibilidade do biossensor foram calculados como $3,3\sigma/slope$, $10\sigma/slope$, e $slope/(área \text{ do eletrodo})$, respectivamente. Onde σ é o desvio padrão do mensuramento branco e $slope$ corresponde à inclinação da reta (SUPRAJA et al., 2019). O sistema nanotecnológico apresentou uma sensibilidade de $1,93 \mu\text{A}/\text{pg } \mu\text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^2$ com uma faixa de detecção linear entre 100 $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$ e 1 $\text{fg } \mu\text{L}^{-1}$. O limite de detecção e o limite de quantificação foram estimados em 0,89 $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$ and 2,70 $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$, respectivamente.

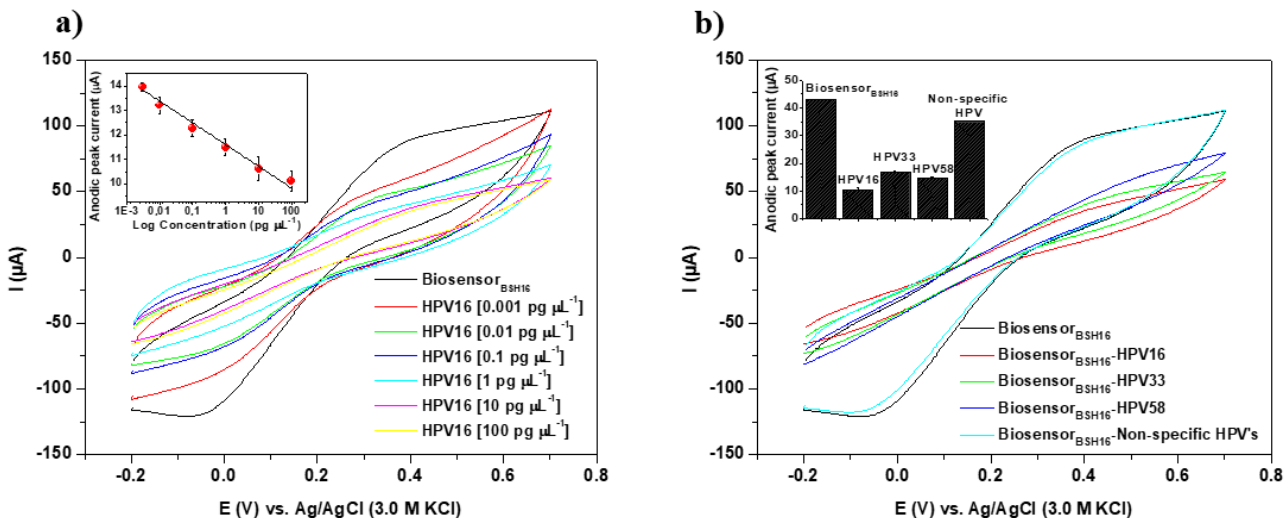


Figura 2 – Voltamogramas cíclicos para o biossensor flexível exposto a diferentes concentrações de plasmídeos recombinantes contendo o gene L1 de HPV16 (DNA alvo a 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 e 100 pg μL⁻¹) (a). Voltamogramas cíclicos para o ensaio de bioatividade com amostras plasmidiais contendo o genoma de tipos HPV pertencentes à família de biorreconhecimento da sonda (HPV16, 33 e 58) (b). Inserção: gráfico de calibração do sistema de biodeteção (a) e histogramas para a corrente de pico anódica (b).

Como evidenciado na Figura 2b, após a exposição do sistema de biodeteção à plasmídeos contendo o gene L1 de HPV pertencente à família de reconhecimento da sonda, houve uma redução da resposta amperométrica e um bloqueio parcial dos processos de oxido-redução na dupla camada elétrica. Desta forma, foi evidenciada a capacidade do biossensor nanoestruturado flexível em identificar tipos específicos de papilomavírus em concentrações mínimas na ordem de picomolar. Ademais, foi realizado ensaio de seletividade com uma amostra composta por plasmídeos recombinantes com o genoma de tipos de HPV não pertencentes à família de reconhecimento (HPV6, 11, 18, 45, 51, 53, 54, 61, 62, 66, 72, 81 e 84). Verifica-se que após a exposição do biodispositivo de DNA às amostras supracitadas não houve alterações significativas no perfil voltamétrico do nanossistema, indicando assim, a seletividade do biossensor proposto.

4. CONCLUSÃO

Um protótipo flexível miniaturizado foi elaborado para o biossensoriamento eletroquímico de genótipos de HPV de alto risco oncogênico. A plataforma nanoestruturada baseada em polímero condutor e nanopartículas metálicas apresentou atraentes propriedades para a construção de sistemas de biodeteção mais sensíveis, específicos e reprodutíveis. O biodispositivo nanoestruturado demonstrou a capacidade de reconhecer o gene L1 de HPV com elevada seletividade, sensibilidade e baixo limite de detecção. Em particular, o sistema flexível proposto exibe um modelo economicamente viável com simplicidade de construção e passível de aplicação a distintas morbidades. Assim, o biossensor de DNA descrito pode ser considerado uma ferramenta promissora para o diagnóstico clínico e laboratorial.



5. REFERÊNCIAS

- AVELINO, K. Y. P. S. et al. Metal-polymer hybrid nanomaterial for impedimetric detection of human papillomavirus in cervical specimens. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, p. 113249, 2020.
- CAMPOS-FERREIRA, D. S. et al. Electrochemical DNA biosensor for the detection of human papillomavirus E6 gene inserted in recombinant plasmid. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 9, n. 3, p. 443-450, 2016.
- CIVIT, L. et al. Electrochemical genosensor array for the simultaneous detection of multiple high-risk human papillomavirus sequences in clinical samples. *Analytica chimica acta*, v. 715, p. 93-98, 2012.
- GERARD, M.; CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Application of conducting polymers to biosensors. *Biosensors and bioelectronics*, v. 17, n. 5, p. 345-359, 2002.
- HUANG, H. et al. An ultrasensitive electrochemical DNA biosensor based on graphene/Au nanorod/polythionine for human papillomavirus DNA detection. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 68, p. 442-446, 2015.
- HUANG, Y. et al. Disease-Related Detection with Electrochemical Biosensors: A Review. *Sensors*, v. 17, n. 10, p. 2375, 2017.
- HUTTER, J. N.; DECKER, C. F. Human papillomavirus infection. *Disease-a-Month*, v. 62, n. 8, p. 294-300, 2016.
- LI, Y.; SHI, G. Electrochemical growth of two-dimensional gold nanostructures on a thin polypyrrole film modified ITO electrode. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 109, n. 50, p. 23787-23793, 2005.
- MAHMOUDIAN, M. R. et al. Electrochemical characteristics of coated steel with poly (N-methyl pyrrole) synthesized in presence of ZnO nanoparticles. *Thin Solid Films*, v. 520, n. 1, p. 258-265, 2011.
- SUPRAJA, P. et al. Electrospun tin (IV) oxide nanofiber based electrochemical sensor for ultra-sensitive and selective detection of atrazine in water at trace levels. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 141, p. 111441, 2019.
- WANG, N. et al. Functionalized gold nanoparticles/reduced graphene oxide nanocomposites for ultrasensitive electrochemical sensing of mercury ions based on thymine-mercury-thymine structure. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 79, p. 320-326, 2016.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES, FINEP, FACEPE, UFPE e Propesq pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

NANOTECNOLOGIA: UMA ALTERNATIVA PROMISSORA PARA O TRATAMENTO DA OSTEOARTRITE

H. I. LEÃO¹, M. E. de O. GONÇALVES¹, J. V. de M. GOMES², S. K. S. de PAULA², M. J. B. de M. RÊGO², M. C. PEREIRA², M. M. da ROSA², M. G. da R. PITTA².

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia;

² Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica.

E-mail para contato: heloisaleao1183@gmail.com

RESUMO – A osteoartrite (OA) é o distúrbio articular pró-inflamatório e degenerativo mais comum que afeta uma ou várias articulações sinoviais. O tratamento é baseado no combate dos sintomas e na reversão da destruição progressiva da cartilagem, através de componentes farmacológicos e não-farmacológicos. Entretanto, esta terapêutica apresenta efeitos colaterais indesejáveis e farmacocinética questionável. A nanotecnologia pode ser uma alternativa para melhorar a entrega de medicamentos no tecido cartilaginoso, pois fornece as intervenções ideais para a entrega intra-articular direcionada. Tem-se como objetivo elucidar que a nanotecnologia se mostra como uma opção terapêutica promissora para a OA. Se trata de uma revisão sistemática, que apresenta uma busca de artigos realizada em bases de dados, em que foram selecionados 21 estudos para serem analisados. Os principais resultados encontrados mostram que nanofibras de ácido hialurônico apresentaram menor degeneração articular e proteção eficiente à articulação, com desempenho significativamente melhor do que medicamentos disponíveis. Também foi relatado que nano-microesferas com GDF-5 promoveu significativamente a expressão de MEC em condrócitos in vivo ($p < 0,05$). Além de ter sido descrito uma liberação controlada de peptídeos anti-inflamatórios de nanopartículas, que suprime a inflamação da cartilagem. Portanto, a nanotecnologia apresenta ser uma alternativa terapêutica promissora, eficaz e segura para o tratamento da Osteoartrite.

Palavras chave: nanomedicina, doença reumatológica, inflamação, imunologia.

ABSTRACT – Osteoarthritis (OA) is the most common pro-inflammatory and degenerative joint disorder that affects one or more synovial joints. Treatment is based on combating symptoms and reversing the progressive destruction of cartilage, through pharmacological and non-pharmacological components. However, this therapy has undesirable side effects and questionable pharmacokinetics. Nanotechnology can be an alternative to improve drug delivery in cartilage



tissue, cause it provides the ideal interventions for targeted intra-articular delivery. The aim is to elucidate that nanotechnology is a promising therapeutic option for OA. It is a systematic review, that presents a search for articles in databases, in which 21 studies were selected to be analyzed. The main results shows that hyaluronic acid nanofibers demonstrated less joint degeneration and efficient joint protection, with significantly better performance than available drugs. It has also been reported that nano-microspheres with GDF-5 significantly promoted the expression of MEC in chondrocytes in vivo ($p < 0.05$). In addition to having been described a controlled release of anti-inflammatory peptides from nanoparticles, which suppresses cartilage inflammation. Therefore, nanotechnology is a promising, effective and safe therapeutic alternative for the treatment of osteoarthritis.

Keywords: nanomedicine, reumatologic disease, inflammation, immunology.

1. INTRODUÇÃO

A osteoartrite (OA) é o distúrbio articular degenerativo mais comum que afeta uma ou várias articulações sinoviais, incluindo pequenas articulações (como as da mão) e grandes articulações (como as articulações do joelho e do quadril). Os sinais cardinais incluem dor, rigidez matinal transitória e crepitação no movimento articular (um som desagradável ou sensação produzida na articulação) que levam à instabilidade e incapacidade física, prejudicando a qualidade de vida proeminente (Martel-Pelletier et al., 2016). A OA resulta de uma combinação de fatores de risco, com o aumento da idade e obesidade, sendo esses os mais proeminentes (Sellam et al., 2013). A doença geralmente se desenvolve progressivamente ao longo de vários anos antes de se tornar “um problema doloroso”, potencialmente levando à incapacidade e isolamento social. Tem alta prevalência na população acima de 65 anos, e a prevalência em faixas etárias mais jovens parece estar aumentando. Casos graves são cada vez mais encaminhados para substituição total da articulação (Hiligsmann et al., 2013).

A contribuição direta dos mediadores inflamatórios para a patogênese da osteoartrite é bem conhecida atualmente. Entre esses mediadores destacam-se a IL-1 β e TNF, que nas células articulares, amplificam e perpetuam o processo da doença induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e quimiocinas, como IL-8 (Laadhar et al., 2007). A IL-1 β e o TNF também estimulam a produção de vários outros mediadores inflamatórios implicados na patologia da OA, como o óxido nítrico (NO) e prostaglandina E2 (PGE2). O NO e a PGE2 contribuem para a inflamação e a destruição articular, aumentando a ativação e a produção de MMPs (metaloproteinases), inibindo a síntese de macromoléculas anabólicas, como colágeno tipo II e proteoglicanos, estimulando a degradação da cartilagem, e, promovendo a apoptose de condrócitos (Kapoor et al., 2010). A matriz cartilaginosa é avascular e aneural e é preenchida por um único tipo de célula: o condrócito. Ele está envolvido em justamente sintetizar a matriz cartilaginosa, no entanto, a capacidade de síntese e realizar reparos diminui com a idade e com a OA, fazendo com que a articulação perca força tênsil e flexibilidade para suportar as cargas (Martel-Pelletier et al., 2016).

O tratamento da osteoartrite é baseado no combate dos sintomas e na reversão da destruição progressiva da cartilagem, através da associação entre componentes farmacológicos e não-farmacológicos (Vasiliadis et al., 2017). Esses incluem fisioterapia, acupuntura e programas de



manutenção da qualidade de vida. Os componentes farmacológicos incluem analgésicos, anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES), glicorticoides e drogas modificadoras da doença, representadas por sulfato de condroitina, derivados do colágeno, ácido hialurônico e glicosamina (Yu & Hunter, 2015).

Os AINEs orais e os inibidores seletivos da ciclooxigenase 2 (COX2) são os agentes farmacológicos orais mais utilizados no tratamento da OA. Estão associados a toxicidades consideráveis (em particular, complicações gastrointestinais e cardiovasculares), especialmente com o aumento da idade e comorbidades (Martel-Pelletier et al., 2016). As chamadas drogas modificadoras da doença, uma alternativa terapêutica de segunda escolha, a condroitina (CH) e a glucosamina (GL) apresentam propriedades anti-inflamatórias e anticatabólicas *in vitro*, e sua capacidade de aliviar os sintomas ou retardar a progressão estrutural da osteoartrite tem sido muito investigada em ensaios clínicos (Glyn-Jones et al., 2015). No entanto, embora muitos estudos tenham mostrado um efeito significativo no tratamento, acompanhado de notável segurança, ainda há controvérsias em relação à sua relativa eficácia em comparação com placebo ou outros tratamentos. A farmacocinética e biodisponibilidade destes suplementos nas articulações humanas após a administração oral é certamente uma questão que tem de ser mais investigada. Há evidências que confirmam que tanto o GL quanto o CH alcançam e retêm certa concentração no plasma e também no líquido articular e cartilagem, após doses normais administradas, porém, não há evidências sólidas para provar diretamente a síntese ou regeneração de cartilagem em humanos, como resultado dessa concentração (Vasiliadis et al., 2017), além da dificuldade de atingir o tecido cartilaginoso, pois o mesmo, como já citado anteriormente, é avascular.

A nanotecnologia pode ser uma alternativa para melhorar a entrega de medicamentos no tecido cartilaginoso. As nanodrogas são fabricadas carregando cargas úteis terapêuticas para nanopartículas multifuncionais modificadas com porções destinadas a aumentar a acumulação de nanodrogas em tecidos/células doentes (Bottini et al., 2016).

Os sistemas de administração nanoencapsulados, fornecem as intervenções ideais para a entrega intra-articular direcionada, que permitem retenção prolongada nas articulações e promovem a liberação sustentada de medicamentos (Sarkar et al., 2019). A escala nanométrica das partículas impede a captação fagocítica e a inflamação em cascata relacionada, ao contrário das micropartículas. Vários sistemas de nanocarreadores como lipossomas, nanopartículas poliméricas, hidrogéis, foram relatados como veículos de entrega intra-articulares (Sarkar et al., 2019).

Diante disto, esta revisão sistemática de literatura busca elucidar que a nanotecnologia se mostra como uma alternativa promissora para melhorar a farmacocinética e a farmacodinâmica dos medicamentos para OA, incluindo o fornecimento de meios para ação terapêutica sustentada com menos efeitos colaterais e benefícios a longo prazo. Portanto, considerando todos os aspectos citados, este trabalho procurou compilar os principais resultados relacionando a nanomedicina e a osteoartrite, mostrando assim, que a nanotecnologia pode ser uma opção terapêutica para a doença em estudo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo é uma revisão sistemática de literatura, que apresenta uma busca de artigos



realizada nas bases de dados Pubmed, Google Scholar, Scielo e Science Direct, utilizando os descritores “nanomedicine”, “nanotechnology” e “osteoarthritis”. Foram considerados apenas os artigos dos últimos 5 anos, totalizando 65 trabalhos, após ler os resumos de cada um, 21 estudos foram escolhidos para esta revisão.

Como os principais critérios de inclusão, foram selecionados os artigos que correlacionam sistemas de entrega de drogas com nanotecnologia e a Osteoartrite, e estudos que continham dados disponíveis para avaliar estes artigos. Para os critérios de exclusão adotados foram excluídos artigos que não obtinham dados suficientes para a análise e aqueles fora da área central da revisão. Também foram examinados e escolhidos alguns artigos provenientes das referências destes estudos, buscando aumentar o referencial teórico da revisão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No início patológico da OA, ocorrem mudanças que aumentam o conteúdo de água e degradação da matriz cartilaginosa. Danos a rede de colágeno altera o ambiente fisiológico e características mecânicas das articulações, que são seguidas por alterações osteocondrais sequenciais na articulação (Robinson et al., 2016). Diante disto, Dasa *et al.* (2016), descreveu um sistema de membrana de nanofibras-ácido hialurônico, que foi preparado usando um quarto da concentração de produtos comercialmente disponíveis suplementados de ácido hialurônico, como o Hyalgan®, para o tratamento de um modelo de OA e o Synvisc®, outro ácido hialurônico disponível no comércio, contendo suplemento viscoelástico, foi utilizado como controle. Para avaliar o efeito de proteção no tecido cartilaginoso, todos os tecidos foram extraídos 6 semanas após as injeções. A membrana híbrida de nanofibras apresentou menor pontuação de degeneração articular em comparação com outros grupos experimentais e proteção eficiente à junta, com desempenho significativamente melhor do que o gel Hyalgan® disponível no mercado e o controle sham. Além disso, a membrana híbrida de nanofibras forneceu efeito protetor comparável ao Synvisc®, que é uma versão do ácido hialurônico, com peso molecular alto, mais caro e demonstrou exibir imunogenicidade. Arslan *et al.* (2018) complementa, trazendo que imunocoloração de colágeno II demonstrou que as células nos tecidos injetados na membrana de nanofibras híbridas tinham a maior deposição de colágeno II, enquanto que o colágeno II quase inexistente foi observado nos demais grupos. Os resultados mostram que este sistema fornece proteção eficiente do tecido da cartilagem artrítica através da preservação da morfologia da cartilagem, com formação reduzida de osteófitos, proteção da região subcondral, deterioração e manutenção de proteínas específicas da matriz da cartilagem *in vivo*. Além disso, a membrana de nanofibra híbrida permitiu o encapsulamento de condrócitos e forneceu um ambiente de cultura para o crescimento de células-tronco *in vitro*.

Outros estudos obtiveram resultados semelhantes. Chen *et al.* (2020), diante da falta de hidratação do tecido cartilaginoso, desenvolveu nanoesferas super-lubrificadas, nomeadas de nanoesferas de sílica mesoporosa enxertadas com poli (2-metacrilóiloxietil fosforilcolina) (MSNs-NH₂ @ PMPC), via fotopolimerização. Através de testes tribológicos e de liberação de drogas, as nanoesferas biométricas melhoraram a lubrificação devido à formação de uma camada de hidratação tenaz ao redor das cargas zwitteriônicas das escovas de polímero (PMPC), e conseguiram a entrega local de um medicamento anti-inflamatório, diclofenaco sódico, empregando os nanocarreadores (MSNs). Além disso, os testes *in vitro* e *in vivo* revelaram que as nanoesferas super-lubrificadas e carregadas de drogas inibiam o desenvolvimento de osteoartrite por componentes anabólicos da cartilagem reguladora positiva e proteases catabólicas negativas e



gene relacionado à dor. Este estudo também utilizou a injeção intra-articular destas nanoesferas, portanto, não se conhece muito bem a farmacocinética e farmacodinâmica destes nanomateriais.

O sistema de entrega de medicamentos é o principal uso da nanotecnologia na OA. Ela possui vantagens por utilizar doses menores destes fármacos e diminuir, assim, sua toxicidade. Estudos de Maudens *et al.* (2018) descreveram nanopartículas de polímero com 320 nm embutidos com nanocristais de kartogenina (KGN-NPPs), conhecida por promover a condrogênese e condroproteção. Estas partículas demonstraram uma alta carga 31,5% (p/p) e liberação prolongada de 62% de medicamentos em 3 meses. KGN-NPPs pareceu ter um efeito protetor na cartilagem e epífise medial da tíbia e reduziu significativamente o VEGF e expressão de Adamts5. Testes de imuno-histoquímica (IHC) foram conduzidos para avaliar qualitativamente a presença de biomarcadores, colágeno tipo 2 (Col2), Aggrecan, matriz metalopeptidase 13 (MMP13) e uma desintegrina e metaloproteinase com motivos de trombospondina 5 (Adamts5) na cartilagem medial tibial. Os níveis de coloração de Col2 e Aggrecan nos condrocitos foram maiores nas seções de tecido de cartilagem saudável e grupos tratados com KGN-NPPs do que nos grupos OA e NPP em branco. Além do que, MMP13, uma colagenase com especificidade de substrato que visa o colágeno para degradação, não foi inibido pelo KGN. Adamts5 foi menos expressa no grupo KGN-NPP em comparação com a simulação e grupos de soluções KGN. O mesmo autor declara que, de fato, Col2 e Aggrecan são dois componentes principais da matriz extracelular da cartilagem que fornecem resistência à tração e resiliência compressiva, respectivamente. MMP13 é uma colagenase envolvida na degradação do colágeno e Adamts5 é uma das proenzimas mais ativas envolvido no decote da Aggrecan.

No trabalho de Kang *et al.* (2019), ele tem objetivo de aumentar a eficácia terapêutica da curcumina, um elemento ativo primário do açafrão, possui potente atividade antioxidante e anti-inflamatória, mas sua baixa biodisponibilidade é um grande obstáculo em suas aplicações farmacêuticas. Diante disto, o autor explorou a estratégia de pró-droga polimérica, e relatou um polímero de curcumina ativável por ácido (ACP) projetado racionalmente, como um pró-fármaco terapêutico de curcumina, no qual a curcumina foi incorporada covalentemente na espinha dorsal do polímero anfifílico. O ACP pode se auto montar para formar micelas que liberam rapidamente a curcumina sob a condição ácida. O potencial das micelas ACP como terapêutica para osteoartrite foi avaliado usando um modelo de camundongo de osteoartrite do joelho induzida por ácido monoicoacético (MIA). As micelas de ACP protegeram drasticamente as estruturas articulares da artrite através da supressão do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1 β (IL-1 β). Um dos obstáculos desse estudo é a estrutura na micela, pois, é um desafio primário na pesquisa de micelas reduzir a suscetibilidade à desmontagem prematura *in vivo* sob condições diluídas e/ou devido a interações concorrentes com proteínas séricas e colesterol endogenamente presentes (Kavanaugh *et al.*, 2016). Um tratamento eficiente para osteoartrite (OA) pode se beneficiar da liberação de uma dose terapêutica alta por um período prolongado de tempo. Esse tratamento minimizará os efeitos colaterais sistêmicos e evitará a inconveniência de injeções frequentes (Maudens *et al.*, 2018). Foram obtidos outros resultados semelhantes, associando nanotecnologia e componentes anti-inflamatórios, como fulereno, rapamicina e ibuprofeno. Estes trabalhos destacaram a nanomedicina como uma promissora alternativa terapêutica para osteoartrite, pois diminuíram os danos estruturais na cartilagem articular, e, apresentaram efeitos anti-inflamatórios satisfatórios.

Também foram descritos trabalhos correlacionando nanotecnologia e proteínas. O trabalho de Lin *et al.* (2016), descreveu uma liberação controlada de peptídeos anti-inflamatórios de



nanopartículas termossensíveis reduzíveis, que suprime a inflamação da cartilagem. O autor descreve que o peptídeo poli (N-isopropilacrilamida) (pNIPAM) podem prolongar o alívio e minimizar efeitos colaterais. Se trata de um estudo *ex vivo* que destaca um sistema de nanopartículas que fornece tratamento intracelularmente, com eficácia melhorada por degradação desencadeada e suprime a inflamação em vários tipos de células dentro de uma articulação inflamada. Outros resultados semelhantes foram descritos, apontando estes serem um potencial tratamento para a Osteoartrite.

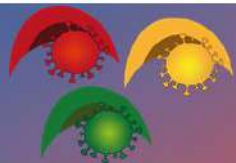
Chen Z *et al.*, (2018) construíram um novo vetor não viral carregado, para terapia genética de OA. As nano-microesferas (NMPs) foram preparadas misturando quitosana, ácido hialurônico e sulfato de condroitina. O plasmídeo GDF-5 (fator de crescimento e diferenciação-5) foi encapsulado nas NMPs por adsorção eletrostática. As características básicas das NMPs foram observadas e depois foram co-cultivadas com condrócitos para observar seus efeitos na expressão de proteínas da matriz extracelular (MEC) e injetadas na cavidade articular de coelhos para observar os efeitos terapêuticos na OA *in vivo*. A viabilidade celular relativa foi de 75% a 99% quando o peso total de NMPs foi inferior a 560 µg. Os resultados da imuno-histoquímica sugeriram que as NMPs podem transfectar condrócitos com sucesso e estimulam a expressão de proteínas da MEC *in vitro*. Quando comparado ao grupo de controle, o grupo de NMPs promoveu significativamente a expressão de MEC em condrócitos *in vivo* ($p < 0,05$), como mostra a análise de composição bioquímica dos condrócitos. Quando as NMPs foram injetadas em coelhos modelo OA as proteínas da MEC nos condrócitos foram significativamente promovidas e a progressão da OA foi desacelerada.

Os vetores recombinantes do vírus adeno-associado (rAAV) são vetores clinicamente adaptados para tratar de forma duradoura a OA. Rey-Rico A *et al.*, (2017) testaram a viabilidade de fornecer vetores rAAV via micelas poliméricas de poli (óxido de etileno) (PEO) e poli (óxido de propileno) (PPO) (poloxâmero e poloxamina), como um meio de superexpressar o fator de crescimento transformador beta (TGF- β), agente altamente potente capaz de promover reparo da cartilagem, melhorando a proliferação de condrócitos e produção de componentes da matriz extracelular, prevenindo a degradação da cartilagem. O estudo relata que a superexpressão de TGF- β mediada por rAAV promoveu deposição significativamente sustentada de MEC rica em proteoglicanos nas células tratadas (condrócitos humanos OA), níveis superiores aos observados nas condições de controle, especialmente na entrega via micelas poliméricas (diferença de até 1,5 vezes, $p \leq 0,0001$).

Algumas limitações podem ser apresentadas, como estudos apenas apresentando resultados *in vivo* ou *ex vivo*, mas nenhuma parte clínica. Apesar disto, os resultados apontados promovem uma alta expectativa para a nanomedicina ser uma promissora alternativa de tratamento para a Osteoartrite.

4. CONCLUSÃO

Desta forma, a nanotecnologia apresenta ser uma alternativa terapêutica promissora, eficaz e segura para o tratamento da Osteoartrite. Diante dos dados citados, é possível afirmar que seus efeitos são benéficos, e modificam fatores essenciais para uma melhora da qualidade de vida do paciente, como diminuição da toxicidade e a quantidade de vezes que um medicamento precisa ser administrado. A nanomedicina, com seu sistema de entrega de fármacos, promove uma opção de



tratamento pensando na adesão do paciente ao mesmo, entretanto, ainda possui obstáculos, por ser uma alternativa cara, além de não possuir estudos clínicos suficientes. Ainda assim, pode ser considerada uma resposta positiva para os problemas apresentados no tratamento da Osteoartrite atualmente.

5. REFERÊNCIAS

Arslan E, Sardan Ekiz M, Eren Cimenci C, et al. Efeitos terapêuticos protetores da membrana híbrida de nanofibras peptídicas e ácido hialurônico no modelo de osteoartrite in vivo. *Acta Biomater.*, v. 73, p. 263-274, 2018.

BOTTINI, MASSIMO; BHATTACHARYA, KUNAL; FADEEL, BENGT; MAGRINI, ANDREA; BOTTINI, NUNZIO; ROSATO, NICOLA. Nanodrugs to target articular cartilage: an emerging platform for osteoarthritis therapy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.*, v. 12, n. 2, p. 255-268, fev. 2016.

Chen Z, Deng S, Yuan DC, et al. Novel nano-microspheres containing chitosan, hyaluronic acid, and chondroitin sulfate deliver growth and differentiation factor-5 plasmid for osteoarthritis gene therapy. *J Zhejiang Univ Sci B.*, v. 19(12), p. 910-923, 2018

CHEN, HAO; SUN, TAO; YAN, YUFEI; JI, XIULING; SUN, YULONG; ZHAO, XIN; QI, JIN; CUI, WENGUO; DENG, LIANFU; ZHANG, HONGYU. Cartilage matrix-inspired biomimetic superlubricated nanospheres for treatment of osteoarthritis. *Biomaterials*, v. 242, p. 119931, jun. 2020.

CSÁNYI, ERZSÉBET; SÜTŐ, BLANKA; BERKÓ, SZILVIA; KOZMA, GÁBOR; KUKOVECZ, ÁKOS; BUDAI-SZÖCS, MÁRIA; ERŐS, GÁBOR; KEMÉNY, LAJOS; SZTOJKOV-IVANOV, ANITA; GASPARG, ROBERT. Development of ibuprofen-loaded nanostructured lipid carrier-based gels: characterization and investigation of in vitro and in vivo penetration through the skin. *International Journal Of Nanomedicine*, p. 1201, 2016.

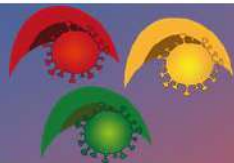
Dasa V, DeKoven M, Sun K, Scott A, Lim S. Clinical and cost outcomes from different hyaluronic acid treatments in patients with knee osteoarthritis: evidence from a US health plan claims database. *Drugs Context*. 2016;5:212296.

GLYN-JONES, S.; PALMER, AJR; AGRICOLA, R.; PRICE, AJ; VINCENT, TL; WEINANS, H.; & CARR, AJ. Osteoartrite. *The Lancet*, v. 386, n. 9991, p. 376-387, 2015.

HILIGSMANN, M., COOPER, C., ARDEN, N., BOERS, M., BRANCO, JC, BRANDI, ML, ... e KANIS, JA. Economia da saúde no campo da osteoartrite: artigo de consenso de um especialista da Sociedade Europeia para Aspectos Clínicos e Econômicos de Osteoporose e Osteoartrite (ESCEO). Nos *Seminários sobre artrite e reumatismo*, v. 43, n. 3, pp. 303-313, 2013.

KANG, CHANGSUN; JUNG, EUNKYEONG; HYEON, HYEJIN; SEON, SEMEE; LEE, DONGWON. Acid-activatable polymeric curcumin nanoparticles as therapeutic agents for osteoarthritis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 23, p. 102104, jan. 2020.

KAVANAUGH, TAYLOR E.; WERFEL, THOMAS A.; CHO, HONGSIK; HASTY, KAREN A.; DUVALL, CRAIG L.. Particle-based technologies for osteoarthritis detection and therapy. *Drug Delivery And Translational Research*, v. 6, n. 2, p. 132-147, 20 maio 2015.



LAADHAR, L.; ZITOUNI, M.; KALLE-SELLAMI, M.; MAHJOUB, M.; SELLAMI, S.; MAKNI, S. Physiopathologie de l'arthrose. Du cartilage normal au cartilage arthrosique: facteurs de prédisposition et mécanismes inflammatoires. *La Revue de médecine interne.*, v. 28, n. 8, p. 531-536, 2007.

LIN, JENNY B.; POH, SCOTT; PANITCH, ALYSSA. Controlled release of anti-inflammatory peptides from reducible thermosensitive nanoparticles suppresses cartilage inflammation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 12, n. 7, p. 2095-2100, 2016.

MARTEL-PELLETIER, JOHANNE; BARR, ANDREW J.; CICUTTINI, FLAVIA M.; CONAGHAN, PHILIP G.; COOPER, CYRUS; GOLDRING, MARY B.; GOLDRING, STEVEN R.; JONES, GRAEME; TEICHTAHL, ANDREW J.; PELLETIER, JEAN-PIERRE. Osteoarthritis. *Nature Reviews Disease Primers.*, v. 2, n. 1, p. 16072-16090, 2016.

Maudens P, Seemayer CA, Thauvin C, Gabay C, Jordan O, Allémann E. Nanocrystal-Polymer Particles: Extended Delivery Carriers for Osteoarthritis Treatment. *Small.*,v. 14(8), p. 10.1002/smll.201703108, 2018.

Rey-Rico A, Venkatesan JK, Schmitt G, et al. rAAV-mediated overexpression of TGF- β via vector delivery in polymeric micelles stimulates the biological and reparative activities of human articular chondrocytes in vitro and in a human osteochondral defect model. *Int J Nanomedicine.*, v. 12, p. 6985-6996, 2017.

Robinson WH, Lepus CM, Wang Q, et al., 2016. Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*, v. 12(10), p. 580-592, 2016.

SARKAR, AMRITA; CARVALHO, EDMUND; A D'SOUZA, ANISHA; BANERJEE, RINTI. Liposome-encapsulated fish oil protein-tagged gold nanoparticles for intra-articular therapy in osteoarthritis. *Nanomedicine*, v. 14, n. 7, p. 871-887, abr. 2019.

SHIRLEY, P. YU; HUNTER, DAVID J. Gerenciando osteoartrite. *Australian prescriber*, v. 38, n. 4, p. 115, 2015.

VASILIADIS, HARIS S; TSIKOPOULOS, KONSTANTINOS. Glucosamine and chondroitin for the treatment of osteoarthritis. *World Journal Of Orthopedics.*, v. 8, n. 1, p. 1, 2017.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em saúde

PLATAFORMA IMPEDIMÉTRICA BASEADA EM NANOPARTÍCULAS DE OURO E LECTINA PARA BIODETECÇÃO DE FETUÍNA

G. S. SOARES¹, C. A. S. ANDRADE¹ e M. D. L. OLIVEIRA¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica
E-mail para contato: giselless84@yahoo.com.br

RESUMO – A fetuína humana-A (HFA) é uma glicoproteína sintetizada no fígado que desempenha um papel importante em vários processos fisiológicos e fisiopatológicos. As lectinas são proteínas de origem não imune, capazes de reconhecer os açúcares ou glicanos ligados a biomoléculas ou presentes na superfície das células. Os biossensores destinados à detecção de antígenos glicanos são, frequentemente, baseados em lectinas, que atuam como agente de bioreconhecimento. Neste trabalho, foi desenvolvida uma plataforma voltamétrica e impedimétrica com sensibilidade capaz de detectar fetuína-A. A plataforma foi baseada em reconhecimento da lectina *Pisum sativum* agglutinin (PSA). Técnicas eletroquímicas como a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e voltametria cíclica (VC) foram ferramentas utilizadas para o desenvolvimento destes dispositivos. A partir da análise dos resultados foi possível verificar que o compósito manteve a capacidade de estabelecer uma imobilização estável da molécula proteica. A plataforma desenvolvida foi capaz de detectar fetuína em diferentes concentrações apresentando um limite de detecção de $1\mu\text{L}^{-1}$.

Palavras chave: Nanopartículas, *Pisum sativum*, Biossensor.

ABSTRACT – Human fetuin-A (HFA) is a glycoprotein synthesized in the liver that plays an important role in various physiological and pathophysiological processes. Lectins are proteins of non-immune origin, capable of recognizing sugars or glycans linked to biomolecules or present on the surface of cells. Biosensors designed to detect glycan antigens are often based on lectins, which act as a bio-recognition agent. In this work, a voltammetric and impedimetric biosensitivity platform was developed capable of detecting fetuin-A. The platform was based on recognition of the lectin *Pisum sativum* agglutinin (PSA). Electrochemical techniques such as electrochemical impedance spectroscopy (EIE) and cyclic voltammetry (VC) are useful tools for the development of these devices. From the analysis of the results it was possible to verify that the composite maintained the ability to establish a stable immobilization of the protein molecule. The developed platform presented a limit of detection of $1\mu\text{L}^{-1}$.



Keywords: Nanoparticle, Pisum sativum, Biosensor.

1. INTRODUÇÃO

A fetuína humana-A (HFA) é uma glicoproteína sintetizada no fígado que desempenha um papel importante em vários processos fisiológicos e fisiopatológicos (Sanchez-Tirado et al., 2018). A HFA é um potencial biomarcador de diversos distúrbios patológicos como: obesidade, resistência à insulina e diabetes tipo 2, carcinoma hepatocelular, aterosclerose, doenças cardiovasculares, síndrome metabólica, esclerose múltipla e artrite entre outras. Os dados indicam que as concentrações de fetuína-A são independentes do gênero (Jensen et al., 2013).

As lectinas compreendem uma família especial de proteínas de ligação a carboidratos distribuídas amplamente no reino vegetal e animal. São proteínas de origem não imune, capazes de reconhecer os açúcares ou glicanos ligados a biomoléculas ou presentes na superfície das células. As lectinas têm especificidades complexas e podem reconhecer não apenas diferentes monossacarídeos dentro da cadeia glicana, como manose, N-acetilglucosamina, ácido siálico (SA) ou galactose, mas também diferentes ligações entre monômeros de sacarídeos ou ramificação de glicano (Belicky et al., 2016). Os biossensores destinados à detecção de antígenos glicanos são, frequentemente, baseados em lectinas, que atuam como agente de bioreconhecimento (Pihíkova et al., 2015).

Os biossensores podem ser desenvolvidos de diferentes maneiras, no entanto, as técnicas eletroquímicas são as mais utilizadas, devido à fácil aplicabilidade, baixo custo e menos efeitos de ruído. Os biossensores eletroquímicos que são baseados na lei de ohm podem ser projetados em fundamentos de determinação amperométrica, voltamétrica ou impedimétrica (Uygun et al., 2018). A associação com nanomateriais no seu desenvolvimento confere ainda mais eficiência a estes dispositivos. As nanopartículas de ouro (NPsAu) são amplamente utilizadas como componentes de biossensores ou em dispositivos bioanalíticos, sendo a plataforma de detecção eletroquímica mais dominante (Bertok et al., 2013).

Neste estudo, foi desenvolvida uma plataforma voltamétrica e impedimétrica com boa seletividade capaz de detectar fetuína-A, um marcador associado a várias condições patológicas. A plataforma foi baseada em reconhecimento da lectina *Pisum sativum* agglutinin (PSA).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A lectina PSA, alubina de soro bovino (BSA), cisteína (cys), 3-mercaptopropitrimetosisilano (MPTS), glutaraldeído (Glut) e as nanopartículas de ouro foram adquiridas da Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Ferro-ferrocianeto de potássio foram adquiridos da VETEC (Brasil). Água deionizada foi obtida do sistema millipore mili-Q.

A superfície do eletrodo de trabalho foi primeiramente funcionalizada com o silano MPTS, para prepará-la para o recebimento das nanopartículas de ouro. O MPTS tem papel relevante neste processo, pois ele funciona como uma rede de fixação para as nanopartículas de ouro. As nanopartículas foram então adicionadas pela técnica de gotejamento à superfície modificada do eletrodo de trabalho. Posteriormente, a lectina foi adicionada como elemento de bioreconhecimento formando o sistema MPTS_NPsAu_Lectina. O sistema foi por fim avaliado

frente a amostras de diferentes concentrações de fetuína-A.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso de métodos eletroquímicos para obtenção de nanopartículas tem se mostrado vantajoso por: aumentar a condutividade do eletrodo, facilitar a transferências de elétrons além de melhorar a sensibilidade analítica e seletividade (Kim et al., 2008). Neste sentido, o comportamento eletroquímico do eletrodo modificado com MPTS_AuNPs foi caracterizado por VC e EIE.

A figura 1a mostra a resposta voltamétrica do processo de fabricação em etapas do sensor. Inicialmente, a curva voltamétrica do eletrodo limpo mostrou um comportamento quase reversível, que é típico de um processo limitado pela difusão da sonda redox. Com a adição do MPTS, que contém um grupo tiol em sua estrutura, foi possível realizar a adsorção na superfície do metal, sendo observada uma diminuição dos picos anódicos e catódicos devido formação da primeira camada auto-montada na superfície do eletrodo. Após imobilização das NPsAu no eletrodo modificado por MPTS, observou-se um aumento na resposta amperométrica devido a característica condutora das nanopartículas de ouro. Uma diminuição adicional na resposta do eletrodo amperométrico é observada com a adição de moléculas de cisteína à superfície do eletrodo de ouro. Esse comportamento é devido à interação química entre Cys e nanopartículas de ouro através do grupo tiol (-SH). Após este processo, uma nova camada auto-organizada foi formada na superfície do eletrodo através da adição de glutaraldeído refletindo e uma nova diminuição das correntes de pico catódicas e anódicas. Por fim mais um decréscimo é observado quando o sistema de biossensoriamento é formado pela adição de lectina PSA. A ligação entre a lectina e o glutaraldeído se dá por meio da interação entre o grupo amina, presente na lectina e o grupo aldeído presente no glutaraldeído.

A figura 1b mostra o espectro de impedância das etapas de montagem da plataforma sensora. A técnica EIS fornece uma visão completa e detalhada das características elétricas da interface eletrodo / solução.

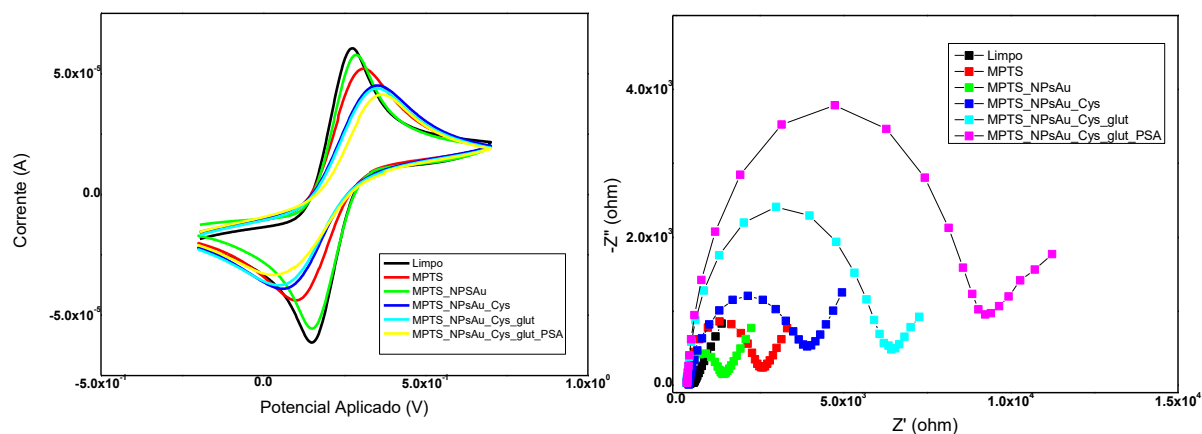


Figura 1. a) – Voltamograma cíclico das etapas de montagem do biossensor realizado em ferro-ferricianeto de potássio pH 7,4 entre -0,2 e 0,7 V. b) – Diagramas de Nyquist das etapas de

montagem do biossensor em ferro-ferricianeto de potássio.

As respostas eletroquímicas do sensor baseado em PSA são mostradas na figura 2. O sensor desenvolvido foi exposto a diferentes concentrações de Fetuína –A que variou de 1 a 200 $\mu\text{g/mL}$. Um aumento sucessivo no semicírculo Cole-Cole é claramente visualizado e proporcional ao incremento da concentração de Fetuína-A, sugerindo uma interação específica entre o sensor e o a glicoproteína, pois, a formação do complexo de caráter não condutor ocorre após o reconhecimento das amostras contaminadas que dificultam a passagem da corrente faradáica para o transdutor. Os dados voltamétricos confirmam este resultado.

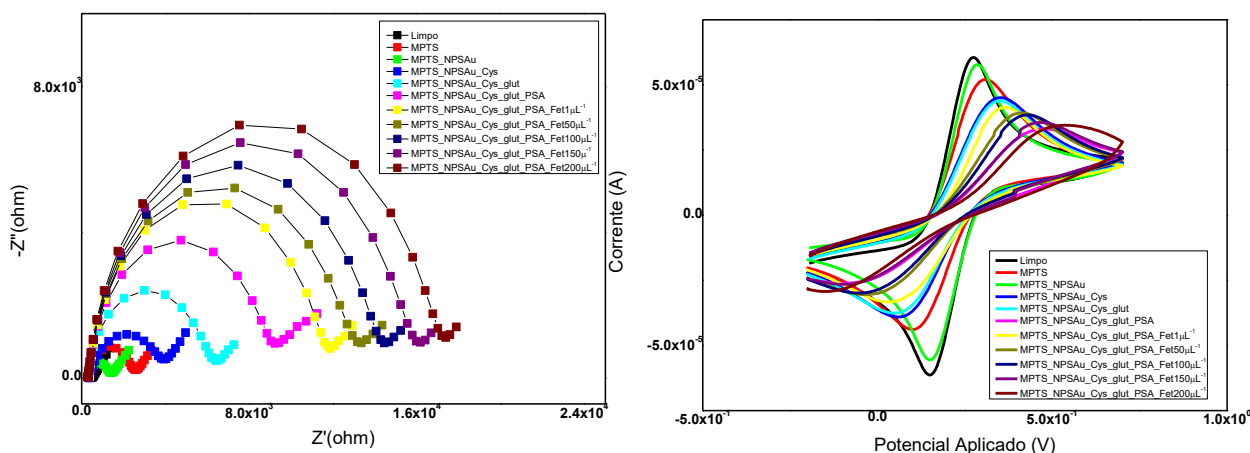


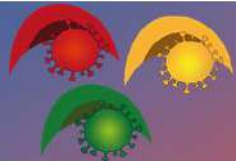
Figura 2 – Resposta impedimétrica e voltamétrica do Biossensor frente a diferentes concentrações de Fetuína-A.

4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que o sistema desenvolvido manteve a bioatividade da lectina. A lectina PSA mostrou-se eficiente na detecção de Fetuína-A em diferentes concentrações. Assim, o biossensor desenvolvido demonstrou ser um método de detecção sensível, rápido e de baixo custo que poderá ser utilizada da detecção de Fetuína no monitoramento de diversas patologias.

5. REFERÊNCIAS

- BELICKY, S; KATRLIK, J; TKAC, J. Glycan and lectin biosensors, *Essays in biochemistry* 60(1) (2016) 37-47
- BERTOK, T; SEDIVA, A; KATRLIK, J; GEMEINER, P; MIKULA, M; NOSKO, M; TKAC, J. Label-free detection of glycoproteins by the lectin biosensor down to attomolar level using gold nanoparticles, *Talanta* 108 (2013) 11-8.
- JENSEN, M.K; BARTZ, T.M; MUKAMAL, K.J; DJOUSSE, L; KIZER, J.R.; TRACY, R.P.; ZIEMAN, S.J; RIMM, E.B; SISCOVICK, D.S; SHLIPAK, M; IX, J.H. Fetuin-A, type 2



diabetes, and risk of cardiovascular disease in older adults: the cardiovascular health study, *Diabetes Care* 36 (2013) 1222-1228

KIM, G.Y.; SHIM, J.; KANG, M.S.; MOON, S.H. Optimized coverage of gold nanoparticles at tyrosinase electrode for measurement of a pesticide in various water samples. *J. Hazard. Mater.* 2008, 156, 141

PIHÍKOVÁ, D; KASÁK, P; TKAC, J. Glycoprofiling of cancer biomarkers: label-free electrochemical lectin-based biosensors, *Open Chem* 13 (2015) 636-655.

SANCHEZ-TIRADO, E; GONZALEZ-CORTES, A; YANEZ-SEDENO, P; PINGARRON, JM. Magnetic multiwalled carbon nanotubes as nanocarrier tags for sensitive determination of fetuin in saliva, *Biosensors & bioelectronics* 113 (2018) 88-94.

UYGUN, Z.O; SAHIN, Ç; YILMAZ, M; AKAÇAY, Y; AKDEMIR, A. Fullerene-PAMAM(G5) composite modified impedimetric biosensor to detect Fetuin-A in real blood samples, *Analytical Biochemistry* 542 (2018) 11-15.

6. AGRADECIMENTOS

CAPES, FACEPE, CNPq e Rede Nanobiotecnologia-CAPES.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA A IDENTIFICAÇÃO DE MICOTOXINAS A PARTIR DO USO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO E ANTI-AFLATOXINA

B. M. CERQUEIRA¹, B. S. GUERRA^{1,3}, C. A. S. ANDRADE^{1,2},
M. D. L. OLIVEIRA^{1,2}.

¹ Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco.

² Programa de pós graduação em Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco.

³ Programa de pós graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco

E-mail para contato: brenda.marques00@gmail.com

RESUMO – *Os biossensores tem atraído o interesse de muitas pesquisas devido a sua praticidade e sensibilidade em comparação as técnicas analíticas atuais. Dentre os tipos existentes tem-se os imunossensor os quais apresentam diversas aplicações. Foi desenvolvido um imunossensor eletroquímico para a detecção de aflatoxina B1. O estudo é voltado para esse grupo de micotoxinas, pois ela é classificada como um grupo 1 carcinogênico humano potente. A metodologia empregada para a análise da interação das biomoléculas são técnicas eletroquímicas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e voltametria cíclica (VC) capazes de mensurar cada camada adsorvida no eletrodo. Os resultados obtidos até o momento são da caracterização do biossensor e análise da bioatividade do sistema. O sistema caracterizado apresentou-se estável eletroquimicamente, além de apto para a detecção de aflatoxina B1 (AFLA B1) em alimentos. Desta forma, foi possível verificar a deposição de anticorpo no biodispositivo elucidado. Portanto, o sistema nanoestruturado desenvolvido caracteriza-se como uma inovadora alternativa para detecção de aflatoxina B1.*

Palavras- chaves: Biossensor, micotoxinas, EIE, VC e alimentos.

ABSTRACT- *Biosensors have been attracted the interest of many researches due to their practicality and sensibility compared to current analytical techniques. Among existing types there is the immunosensor which has several applications. An electrochemical immunosensor was developed to detect aflatoxin B1. The study is aimed at this group of mycotoxins, as it's classified as a group 1 potent carcinogenic agent. In addition, the methodology used to analyze the*



interaction of biomolecules are electrochemical techniques of electrochemical impedance spectroscopy (EIE) and cyclic voltammetry (VC) capable of measuring each layer adsorbed on the electrode. The results obtained so far are the characterization of the biosensors and analysis of the bioactivity of the system. The characterized system was shown to be electrochemically stable, in addition to being able to detect aflatoxin B1 (AFLA B1) in food. In this way, it was possible to verify the deposition of antibody in the elucidated bio-device. Therefore, the nanostructured system developed is characterized as excellent and as an innovative alternative for detecting aflatoxin B1.

1. INTRODUÇÃO

Problemas socioeconômicos relacionados a infecção alimentar não são uma novidade. Por isso, a cada dia, torna-se mais necessário a criação de um método de detecção rápido e seguro, já que os métodos existentes são caros e laboriosos (STOEV, 2013).

As MTXs são metabólitos secundários decorrente de 3 espécies fúngicas. Sua etimologia originou-se da palavra grega mukos, que significa “fungo” e latim toxicum referente a “veneno” que coloniza culturas durante a colheita ou durante o armazenamento (Robbins et al, 2000). Dentre as MTXs destacam-se as Aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2) tidas como as mais potencialmente cancerígenas do conjunto, segundo Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC) classificou a aflatoxina B1 (AFB1) como Grupo 1 (cancerígeno humano potente) e pode ser responsável pelo câncer de fígado em muitos países em desenvolvimento (Henry et.al, 1999; CHAUHAN et al., 2016). Elas são capazes de desenvolver-se naturalmente em produtos alimentícios, especialmente cereais, entre outros (ALSHANNAQ et al., 2017). Já que a produção de grãos no Brasil é considerada grande, consistindo em grande parte da economia do País, é necessário o desenvolvimento de um método rápido, simples e de baixo custo para a detecção de toxinas, pois as ferramentas analíticas existentes são caras, laboriosas e de mão de obra especializada. A exemplo das ferramentas utilizadas na avaliação de micotoxinas destacam-se a PCR e o ELISA. E como citado não proveem a necessidade do mercado por serem de difícil uso em campo e de não acompanharem a demanda de informação, além de possuir um custo elevado.

Para a finalidade acima citada surgem os biosensores, dispositivos que utilizam uma molécula biológica para reconhecimento acoplados a um transdutor físico ou químico, tendo o intuito de fornecer especificidade e otimização na detecção dos mesmos. Os imunossensores são biosensores cuja molécula biológica é um anticorpo, ou seja, seu mecanismo se baseia na relação de afinidade antígeno-anticorpo e é analisado por um transdutor. Então, a premissa de qualquer imunossensor é a estabilidade e especificidade existente na reação antígeno-anticorpo (MALIK et al., 2013; WANG et al., 2001). O presente trabalho propõe-se a desenvolver um sistema sensor para detecção de AFB1 de forma rápida, sensível e de baixo custo. Para isto, foram utilizadas as técnicas eletroquímicas, acima citadas, para a análise das alterações ocorridas na superfície do eletrodo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

N-hidroxisuccinimida (NHS), 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) carbodiimida (EDC), Cisteína, Óxido de zinco, Anticorpo monoclonal (Anti-AflaB1), Aflatoxina e Ocratoxina A (controle negativo) foram obtidos da Sigma/Aldrich.



Preparação do sistema Cys_ZnO_Anti-AflaB1

O eletrodo de ouro foi polido com lixa em um ciclo de 30 voltas e deixado por 15 minutos em água sanitária, e posteriormente seco com nitrogênio (N₂). Em seguida, o eletrodo de ouro foi submetido a um potencial de -0,2 V para torná-lo catódico por 2 min. Posteriormente, foi adicionando a superfície do eletrodo 4μL de Cys por 15 min. Após a adição desse composto, foi acrescentado um agente ativador 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)/ N-Hidroxisuccinimida (NHS). Em seguida, foi imobilizada a nanopartícula de óxido de zinco aminadas por 5 min lavadas com água deionizada e seco. Após obtenção do eletrodo modificado com Cys-NPsZnO, este sistema foi submetido a incubação com o Anti-AflaB1 via ativação EDC-NHS, para posteriormente ser avaliado a diferentes concentrações da aflatoxina B1 (AflaB1) e do controle negativo Ocratoxina A (OCRA).

Medidas de impedância eletroquímica

Os experimentos de EIE e VC foram realizados em um Potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT128N numa célula convencional de três eletrodos. Os eletrodos de trabalho (ET) utilizados foram de platina e ouro modificados com os anticorpos, o eletrodo de ouro como contra eletrodo e o de referência foi o Ag/AgCl saturado com KCl. As medidas de impedância eletroquímica foram realizadas na mesma solução de ferro-ferricianeto de potássio numa faixa de frequência entre 100 mHz a 100 KHz com um potencial de amplitude alternada de 10 mV (OLIVEIRA et al., 2008).

Simulação do circuito equivalente das análises de impedância eletroquímica

Os gráficos de impedância eletroquímica (gráficos de Nyquist) foram submetidos a análise de dados através do programa EQUIVCRT (BOUKAMP, 1996), com o objetivo de explorar o comportamento interfacial do sistema Cys-NPsZnO-Anti-AflaB1-AFLA/OTA.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio das análises utilizando VC e EIE, foram obtidos resultados a respeito da plataforma acima elucidada. Para isso, foi utilizado a solução de ferro-ferricianeto de potássio para a troca de elétrons, do par redox com o meio eletrodo dada cada etapa da produção do sistema.

Ademais, foi feito um estudo de tempo para a cisteína, um aminoácido não essencial, utilizado na plataforma para fazer uma ligação entre a superfície do eletrodo de ouro e seu grupamento tiol, estabelecendo assim a primeira camada do sistema. Foi possível observar um aumento da resposta impedimétrica com o aumento do tempo de adsorção da cisteína. O tempo de 15 minutos foi o tempo de escolha para a construção do sensor, visto que refletiu a saturação da superfície do eletrodo (figura 1). A simulação teórica dos resultados de espectroscopia de impedância foi realizada por meio do circuito equivalente de Randles. Os valores dos componentes do circuito, tais como, resistência da solução eletrolítica (R_s), elemento de fase constante (CEP), resistência à transferência de carga (R_{CT}) e impedância de Warburg (Z_w) foram apresentados na tabela 1.

A)

B)

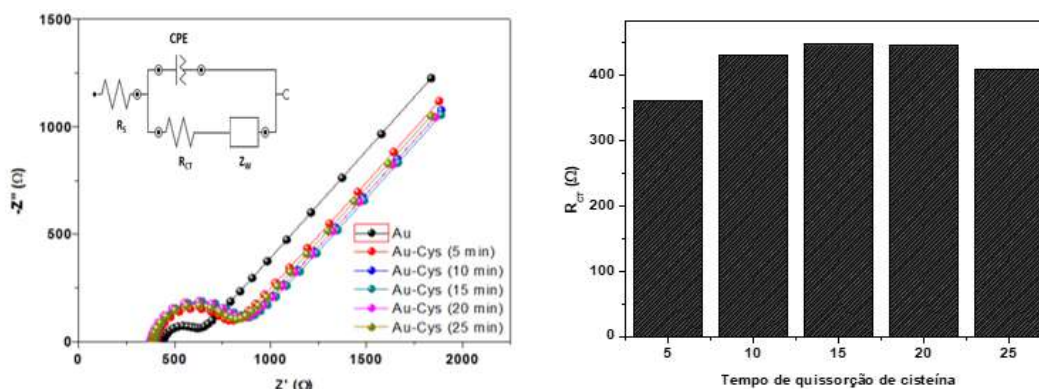


Figura 1. Espectros de impedância (A), valores de resistência à transferência de carga (R_{ct}) (B) para o estudo de adsorção da cisteína.

Tabela 1. Simulação teórica dos resultados de espectroscopia de impedância para o estudo de tempo da cisteína

Modificação eletródica	Tempo de quissorção	CPE (μMho)	n	R_{CT} (Ω)	R_s (Ω)	Z_w (μMho)
Eletrodo de ouro	-	21.8	0.561	190	343	775
Cys	5 min	2.77	0.811	800	373	785
Cys	10 min	2.55	0.814	1.79 K	356	771
Cys	15 min	2.09	0.832	2.73 K	354	700
Cys	20 min	2.02	0.831	3.54 K	389	692
Cys	25 min	1.90	0.835	4.37 K	369	642
Cys	30 min	1.82	0.837	4.71 K	338	617
Cys	35 min	1.75	0.837	5.61 K	370	555
Cys	40 min	1.73	0.836	6.36 K	367	517

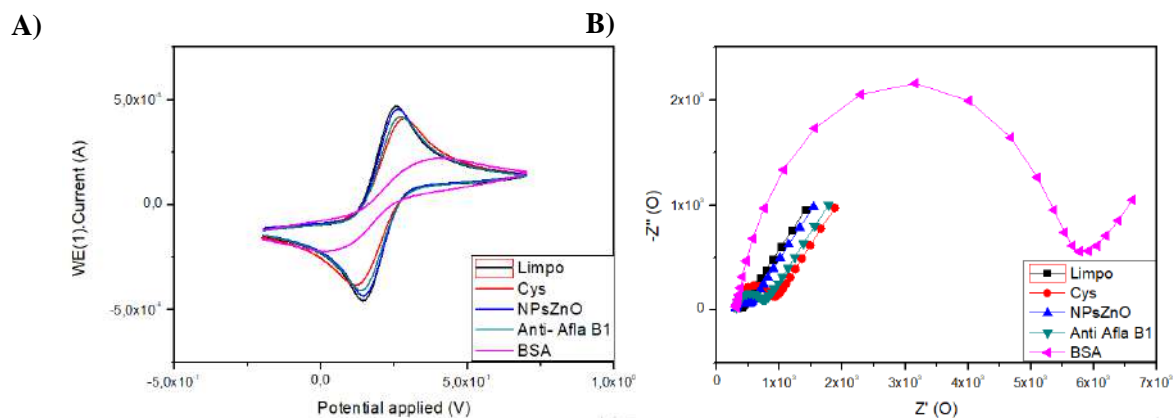
Volume de Cys: 4 μl ; [Cys]: 50 MM.

Na figura 2 A, é observada a voltametria cíclica do sistema e sua gradual redução dos picos catódicos e anódicos após cada etapa de modificação da superfície do eletrodo de ouro. Na figura 2 B observamos por meio da impedância um aumento da resistência à transferência de carga do sistema. Os resultados estão de acordo com os obtidos por meio da VC.

Após a adsorção da cisteína, foi evidenciada a imobilização das NPsZnO refletida pelo aumento da condutividade do sistema sendo demonstrado um aumento das correntes de pico anódicas e catódicas (fig. 2 A) e diminuição da resistência de transferência de carga (fig. 2 B). As NPsZnO dispõem em sua superfície de uma camada de NH_3 . Esta natureza química possibilitou a ancoragem covalente dos anticorpos anti-afla B1 e consequente formação da camada de

bioreconhecimento para o analito avaliado durante a segunda etapa deste projeto. Com o objetivo de bloquear os sítios ativos remanescentes o BSA proporcionou um bloqueio da transferência de carga na superfície do eletrodo, demonstrado pelo aumento da impedância total do sistema.

Figura 2. Voltamogramas cíclicos (A) e Espectros de Impedância (B) para cada etapa de montagem do sistema Cys-NPsZnO-Anti-AflaB1.



Outrossim, foi realizado um estudo de tempo da nanopartícula. No qual foi feita a funcionalização da cisteína com a solução de EDC-NHS, em seguida foi incubado por 10 min e após esse período retirado o excesso. A leitura da nanopartícula foi feita a partir de uma solução da mesma em intervalos de 5 min para se obter uma resposta capaz de aumentar a migração de elétrons no sistema. A simulação teórica dos resultados de espectroscopia de impedância foi realizada por meio do circuito equivalente de Randles. Os valores dos componentes do circuito, tais como, resistência da solução eletrolítica (R_s), elemento de fase constante (CEP), resistência à transferência de carga (R_{CT}) e impedância de Warburg (Z_w) foram apresentados na tabela 2. Para esse estudo em questão ficou elucidado o tempo de 5 min para garantir a resposta esperada.

As nanopartículas de ZnO são de fundamental importância por garantir uma maior adesão do anticorpo, devido a presença de grupos amina livres capazes de promover, como mencionado, uma ligação covalente com o Ac. Além disso, por possuir características semicondutoras ele é capaz de reduzir a resistência e como consequência aumentar a sensibilidade do sistema, já que devido a sua alta capacidade oxidativa promove a redução do par redox do sistema e uma melhor troca de elétrons com o meio. Resultando, assim, em uma maior janela de resposta para o sensor, ou seja, maior sensibilidade.

Tabela 2. Simulação teórica dos resultados de espectroscopia de impedância para estudo de nanopartícula de óxido de zinco

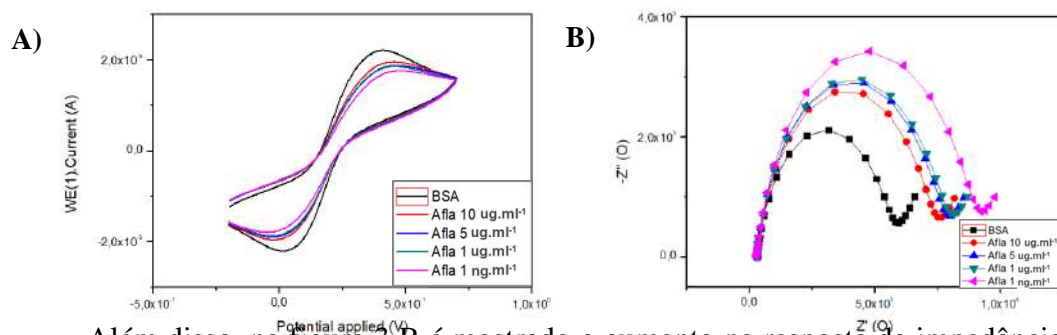
Modificação eletródica	Tempo de quimissorção	CPE (μMho)	n	R_{CT} (Ω)	R_s (Ω)	Z_w (μMho)
Eletrodo de ouro	-	15.3	0.622	192	327	763
Cys	15 min	2.57	0.878	341	375	808
NPsZnO	5min	2.42	0.874	286	395	813
NPsZnO	10 min	2.04	0.874	395	588	824
NPsZnO	15 min	2.11	0.854	778	394	830
NPsZnO	20 min	1.95	0.859	791	394	829
NPsZnO	25min	1.89	0.849	902	369	826
NPsZnO	30min	1.83	0.849	1.02 k	399	819
NPsZnO	35 min	1.75	0.858	977	356	826
NPsZnO	40min	1.54	0.873	1.24 k	397	829

Volume de NPsZnO: 2 μL

Durante a segunda etapa do projeto, após a montagem do sensor, foi iniciado um estudo com 3 concentrações da toxina, demonstrando assim que o sensor produzido apresenta uma resposta. Além disso, é uma resposta dentro de um padrão, já que a adição da toxina em maior concentração não foi o bastante para saturar a superfície levando a hipótese que ocorreram a ligação de diversos Ac no sistema. Contudo, ainda são estudos preliminares, mostrando-se necessário mais estudos da sensibilidade do sensor e de sua seletividade através do controle negativo.

Na figura 3 é visto o desempenho do imunossensor na detecção de Afla por medição de VC e EIE. Na imagem 3A é visto que a uma diminuição dos picos proporcionalmente a adição de toxina. Ou seja, com o aumento da quantidade de Afla B1 disponível para competir pelos sítios de ligação do Ac há uma diminuição na transferência de carga resultando no achatamento dos picos.

Figura 3. Voltamogramas cíclicos (A) e Espectros de Impedância (B) para cada etapa de testagem do sistema Cys-NPsZnO-Anti-AflaB1 para diferentes concentrações da aflatoxina.



Além disso, na figura 3 B é mostrado o aumento na resposta da impedância concomitante ao acúmulo de toxina no eletrodo. Demonstrando assim que a EIE está diretamente relacionada ao aumento da resistência a transferência de carga do sistema.



4. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos até o momento, a plataforma encontra-se caracterizada e testada para aflatoxina, porém ainda são resultados preliminares, é necessário novos testes em diferentes concentrações e seu controle negativo.

5. REFERÊNCIAS

ALSHANNAQ, Ahmad; YU, Jae-hyuk. Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, [s.l.], v. 14, n. 6, p. 632, 13 jun. 2017. MDPI AG.

BOUKAMP, B.A., Sol. St. Ionics 18, 136, 1996.

CALDAS, Eloisa Dutra; SILVA, Saulo Cardoso; OLIVEIRA, João Nascimento. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, [s.l.], v. 36, n. 3, p. 319-323, jun. 2002. FapUNIFESP (SciELO).

ALIK, Parth. et al. Nanobiosensors: concepts and variations. **Isrn Nanomaterials**, [s.l.], v. 2013, p. 1-9, 2013. Hindawi Limited.

OLIVEIRA M. D. L.; CORREIA M. T. S.; COELHO L. C. B. B.; DINIZ F. B. Electrochemical evaluation of lectin-sugar interaction on gold electrode modified with colloidal gold and polyvinyl butyral. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**. v. 66, n.1, p.13-9, 2008.

STOEV, Stoycho D.. Food Safety and Increasing Hazard of Mycotoxin Occurrence in Foods and Feeds. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, [s.l.], v. 53, n. 9, p. 887-901, jan. 2013. Informa UK Limited.

WANG, Qian.; LI, Nanqiang. Electrocatalytic response of norepinephrine at a thiolactic acid self-assembled gold electrode. **Talanta**, [s.l.], v. 55, n. 6, p. 1219-1225, 24 dez. 2001. Elsevier BV.

6. AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos ao Bionano e a FACEPE.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

QUITOSANA E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS NO SEGMENTO TERAPÊUTICO: UMA MINI-REVISÃO

R.N.D. SILVA¹, B.A.M. COSTA², F.A. MATOS², A.L.F. PORTO² e V.M. OLIVEIRA²

¹Faculdade Frassinetti do Recife, Pós-graduação em Biologia, Especialização em Microbiologia.

²Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE.

E-mail para contato: vagne_melo@hotmail.com

RESUMO – A quitosana é um polissacarídeo linear obtido através da desacetilação da quitina, sendo encontrados nos exoesqueletos de artrópodes, insetos e nas paredes celulares dos fungos. Organismos aquáticos têm tido especial atenção como fonte desse polímero. Devido as suas características naturais (não alergênico, biocompatibilidade, biodegradabilidade e não tóxicos) são promissoras para aplicações médicas. Assim, esta mini-revisão buscou elencar as principais aplicações terapêuticas da quitosana. Para tanto, foram utilizados os seguintes sites científicos: ScienceDirect, Elsevier, Springer, TandFonline, PubMed, Wiley Online Library e o Google Scholar. É grande o volume de publicações a respeito do tema, sinalizando o grande interesse dos pesquisadores e da indústria pela temática, principalmente, devido às aplicações diversificadas desse polímero, já tendo sido reportado ações antiinflamatórias, antimicrobianas, antioxidantes, anti-hipertensivas, imunoestimuladoras, regenerativas, além de efeitos anticâncer, antidiabético, entre outros. A associação da quitosana com outros compostos tem facilitado seu uso e deve ser a tônica para novas aplicações biotecnológicas voltadas para o segmento médico e farmacêutico.

Palavras-chave: biopolímero, biomedicina, quitina, resíduos.

ABSTRACT– Chitosan is a linear polysaccharide obtained through deacetylation of chitin, found in the exoskeletons of arthropods, insects and in the cell walls of fungi. Aquatic organisms have been paying special attention as a source of this polymer. Due to their natural characteristics (non-allergenic, biocompatibility, biodegradability and non-toxic) they are promising for medical applications. Thus, this mini-review sought to list the main therapeutic applications of chitosan. For this, the following scientific sites were used: ScienceDirect, Elsevier, Springer, TandFonline, PubMed, Wiley Online Library and Google Scholar. There is a large volume of publications on the subject, signaling the great interest of researchers and industry in the subject, mainly due to the diverse applications of this polymer, having already been reported anti-inflammatory, antimicrobial, antioxidant, anti-hypertensive, immunostimulatory, regenerative actions, in addition to anti-cancer and anti-diabetic effects, among others. The association of chitosan with other compounds has facilitated its use and should be the keynote for new biotechnological applications aimed at the medical and pharmaceutical segment.



Keywords: biopolymer, biomedicine, chitin, residues.

1. INTRODUÇÃO

O crescente interesse no uso de biopolímeros se deve, entre outras coisas, à crescente conscientização relacionada às questões ambientais (Ahmed *et al.*, 2018). A quitina é um dos polímeros mais abundantes na natureza (El Knidri *et al.*, 2018), comumente encontrada nos exoesqueletos de artrópodes, de insetos e nas paredes celulares dos fungos (Muanprasat; Chatsudthipong, 2017).

A quitosana é um polissacarídeo linear policatiônico natural, sendo o segundo polímero mais abundante próximo à celulose (Paul; Kolesinska; Sujka, 2019), obtido pela desacetilação da quitina. É um copolímero linear de 2-acetamido-2-desoxi-p-d-glucopiranosose e 2-amino-2-desoxi-p-D-glucopiranosose ligada a β - (1 \rightarrow 4) (Ahmed *et al.*, 2018; Shariatinia, 2019). A quitosana tem sido amplamente utilizada para várias aplicações biofarmacêuticas e nutracêuticas devido à sua origem natural e propriedades (boa biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade e quelatação de íons metálicos) (El Knidri *et al.*, 2018).

O grupo amina primário da quitosana é responsável por suas várias propriedades, como a natureza catiônica, liberação controlada de drogas, muco-adesão, antimicrobiano, aprimoramento da permeação (Ali; Ahmed, 2018), entre outras. Além disso, a quitosana possui vários grupos funcionais OH e NH₂ que permitem a ligação às proteínas (Shariatinia, 2019). A quitosana é geralmente preparada por um método termoquímico, consumindo tempo, energia e reagentes (El Knidri *et al.*, 2018).

A quitosana é um polímero bioativo com uma grande variedade de aplicações biotecnológicas devido a suas propriedades funcionais (Muxika *et al.*, 2017; Shariatinia *et al.*, 2019), como sua boa biocompatibilidade, biodegradabilidade, hidrofiliabilidade, não toxicidade, alta biodisponibilidade (Hu *et al.*, 2018), simplicidade de modificação, excelente resistência química, capacidade de formar filmes, géis, nanopartículas, micropartículas e contos, além de afinidade com metais, proteínas e corantes (Shariatinia *et al.*, 2019). Atualmente, existe um grande volume de publicações relacionadas às aplicações biotecnológicas da quitosana quando aplicadas a áreas interligadas a biomedicina para fins terapêuticos (Patrulea *et al.*, 2015; Ahsan *et al.*, 2018; Baranwal *et al.*, 2018; Kravanja *et al.*, 2019; Mu *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020). Assim, este trabalho objetivou realizar uma mini-revisão a respeito das principais aplicações biotecnológicas da quitosana relacionadas com o âmbito terapêutico.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

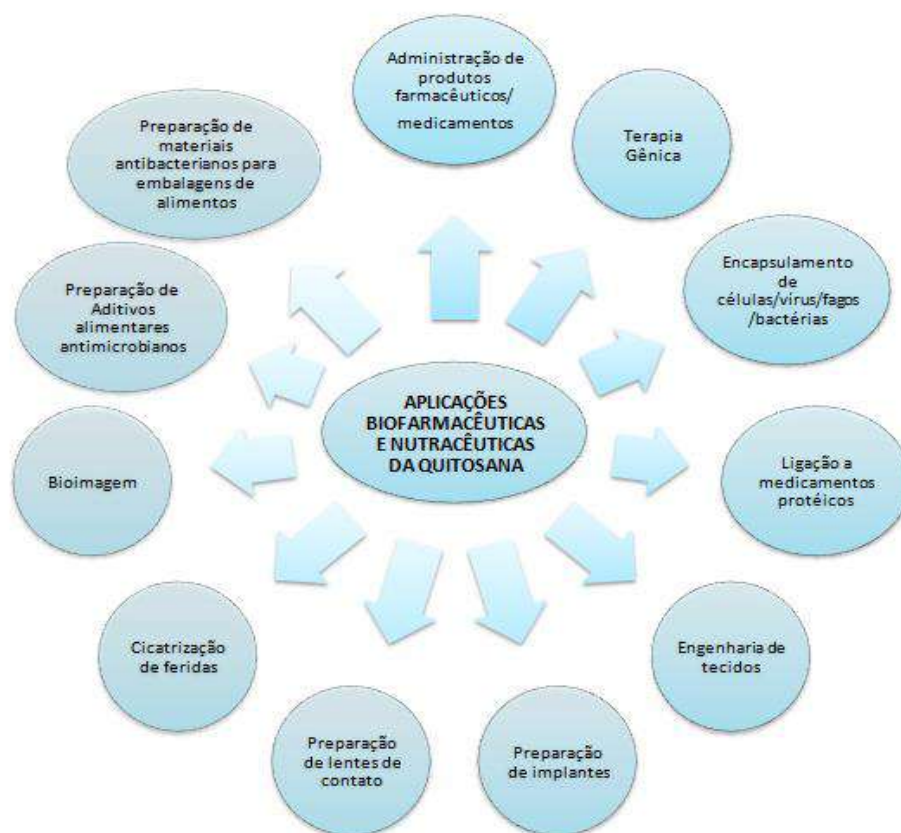
Para esta mini-revisão, foi realizada pesquisa bibliográfica utilizando sites científicos, tais como ScienceDirect (<https://www.sciencedirect.com/>), Elsevier (<https://www.elsevier.com/>), Springer (<https://www.springer.com/>), TandFonline (<https://www.tandfonline.com/>), PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), Wiley Online Library (<https://onlinelibrary.wiley.com/>) e o Google Scholar (<https://scholar.google.com.br/>). A pesquisa foi realizada a partir das palavras-chave: quitosana, aplicações biomédicas da quitosana, aplicações farmacêuticas da quitosana, em português e sua tradução em inglês. Os materiais encontrados nos diferentes bancos de bases de dados científicos foram, posteriormente, conferidos com detalhes sobre os modelos e tipos (artigos científicos; revisões bibliográficas), não havendo restrição quanto ao uso destes. Não houve

qualquer restrição quanto a período de publicação. As informações gerais foram catalogadas de acordo com interesse dos autores.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi encontrado um grande volume de publicações a respeito da temática. Foram utilizados apenas de modo pontual de acordo com a finalidade da utilização terapêutica da quitosana, muitos com a finalidade de produção de biomaterial. Os derivados da quitosana são biomateriais úteis para diferentes propósitos muito devido a sua propriedades (Cheung *et al.*, 2015; Dragostin *et al.*, 2016; Matica *et al.*, 2019; Paul; Kolesinska; Sujka, 2019), fatores que os tornam promissores para aplicações nos segmentos medicamentosos (Fonseca-Santos; Chorilli, 2017; Zhao *et al.*, 2018). As principais aplicações da quitosana como matéria-prima biofarmacêutica e nutracêutica estão listadas na Figura 1.

Figura 1- Aplicações biofarmacêuticas e nutracêuticas da quitosana



Fonte: Própria.

A quitosana tem sido utilizada para produzir nanocarreadores projetados e permitir técnicas de microencapsulação, principalmente para a entrega de medicamentos, produtos biológicos e vacinas (Elieh-Ali-Komi; Hamblin, 2016). Sonin *et al.* (2020) reportaram que nanopartículas de quitosana têm um pequeno efeito citotóxico e um fraco efeito antiplaquetário e anticoagulante. Ainda, em estudos com peixes, Bhat *et al.* (2018) relataram o uso de nanopartículas de quitosana como um agente estabilizador da formulação de eurycomanone e que pode ser utilizada de forma

promissora para aumentar o desempenho reprodutivo dos peixes.

Entre as principais atividades biológicas da quitosana com implicações terapêuticas estão sua ação antiinflamatória, antimicrobiana, antioxidante, anti-hipertensiva, imunoestimuladora, regenerativa, além de efeitos anti-obesidade e hipolipemiantes, antidiabético e intensificador da absorção de cálcio (Muanprasat; Chatsudthipong, 2017), como pode ser visualizado na Figura 2. Atividade antifúngica de derivados da quitosana também já foi descrito por Liu *et al.* (2018).

Figura 2- Aplicações biofarmacêuticas e nutracêuticas da quitosana



Fonte: Própria.

A utilização da quitosana ou de seus derivados associados a outros compostos químicos para encapsulamento já é uma prática conhecida e comprovadamente eficiente (Ottonelli *et al.*, 2020; Sato *et al.*, 2020). Dragostin *et al.* (2020) reportaram a produção de nanopartículas de derivados da quitosana com efeito antiangiogênico para terapia do câncer, corroborando com Younes *et al.* (2012) quando utilizaram resíduos de quitosana mediada por cascas de camarão. No concernente ao efeito cicatrizante, Dragostin *et al.* (2016) comprovaram através de estudo *in vivo* do modelo de ferida por queimadura induzido em ratos Wistar o efeito remodelador e de reepitelização induzido por derivados de quitosana-sulfonamida, corroborando com Iacob *et al.* (2018), que estudaram a cicatrização de feridas de novas membranas baseadas em derivados de quitosana, ácido hialurônico e arginina. Os resultados descritos por esses autores recomendam fortemente o uso de alguns dos derivados da quitosana desenvolvidos como biomateriais antimicrobianos para curativos, comprovando o potencial da quitosana como matéria-prima visando à indústria farmacêutica e biomédica.



4. CONCLUSÃO

O grande volume de publicações a respeito do tema demonstra a enorme potencialidade da quitosana como agente terapêutico através de aplicações biológicas e farmacêuticas diversas, principalmente associadas a outros compostos. Fontes alternativas para sua produção também estão em evidência, especialmente, obtidas de organismos aquáticos.

5. REFERÊNCIAS

AHMED, S.; ANNU; ALI, A.; SHEIKH, J. A review on chitosan centred scaffolds and their applications in tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.*, 116, 849–862, 2018.

ALI, A.; AHMED, S. A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. *Int. J. Biol. Macromol.*, v.109, p.273–286, 2018.

AHSAN, S.M.; THOMAS, M.; REDDY, K.K.; SOORAPARAJU, S.G.; ASTHANA, A.; BHATNAGAR, I. Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.110, p.97–109, 2018.

BARANWAL, A.; KUMAR, A.; PRIYADHARSHINI, A.; OGGU, G.S.; BHATNAGAR, I.; SRIVASTAVA, A.; CHANDRA, P. Quitosana: Um material de bio-fabricação indiscutível para aplicações em engenharia de tecidos e bio-deteção. *Int. J. Biol. Macromol.*, v.110, p.110–123, 2018.

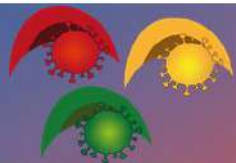
BHAT, I.A.; NAZIR, M.I.; AHMAD, I.; PATHAKOTA, G.B.; CHANU, T.I.; GOSWAMI, M.; SUNDARAY, J.K.; SHARMA, R. Fabrication and characterization of chitosan conjugated eurycomanone nanoparticles: In vivo evaluation of the biodistribution and toxicity in fish. *Int. J. Biolo. Mcromol.*, v.112, p.1093–1103, 2018.

CHEUNG, R.C, NG, T.B.; WONG, J.H.; CHAN, W.Y. Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Mar. Drugs*, v.13, n.8, p.5156-5186, 2015.

DRAGOSTIN, O.M.; SAMAL, S.K.; DASH, M.; LUPASCU, F.; PÂNZARIU, A.; TUCHILUS, C.; GHETU, N.; DANCIU, M.; DUBRUEL, P.; PIEPTU, D.; VASILE, C.; TATIA, R.; PROFIRE, L. New antimicrobial chitosan derivatives for wound dressing applications. *Carbohydr. Polym.*, v.141, p.28–40, 2016.

DRAGOSTIN, O. M.; TATIA, R.; SAMAL, S.K.; OANCEA, A.; ZAMFIR, A.S.; DRAGOSTIN, I.; LISĂ, E.L.; APETREI, C.; ZAMFIR, C.L. Designing of Chitosan Derivatives Nanoparticles with Antiangiogenic Effect for Cancer Therapy. *Nanomaterials*, v.10, n.4, 698, 2020.

EL KNIDRI, H.; BELAABED, R.; ADDAOU, A.; LAAJEB, A.; LAHSINI, A. Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan: A review. *Int. J. Biol. Macromol.*, v.109, p.273-286, 2018.



ELIEH-ALI-KOMI, D.; HAMBLIN, M.R. Chitin and Chitosan: Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials. *Int. J. Curr. Adv. Res.*, v.4, n.3, p.411–427, 2016.

FONSECA-SANTOS, B.; CHORILLI, M. An overview of carboxymethyl derivatives of chitosan: Their use as biomaterials and drug delivery systems. *Materials Science Engineering. C, Materials for biological applications*, v.77, p.1349–1362, 2017.

HU, Z.; ZHANG, D.Y.; LU, S.T.; LI, P.W.; LI, S.D. Chitosan-Based Composite Materials for Prospective Hemostatic Applications. *Marine drugs*, v.16, n.8, p.273, 2018.

IACOB, A.T.; DRĂGAN, M.; GHEȚU, N.; PIEPTU, D.; VASILE, C.; BURON, F.; ROUTIER, S.; GIUSCA, S.E.; CARUNTU, I.D.; PROFIRE, L. Preparation, Characterization and Wound Healing Effects of New Membranes Based on Chitosan, Hyaluronic Acid and Arginine Derivatives. *Polymers*, v.10, n.6, p.607, 2018.

KRAVANJA, G.; PRIMOŽIČ, M.; KNEZ, Ž.; LEITGEB, M. Chitosan-based (Nano)materials for Novel Biomedical Applications. *Molecules (Basel, Switzerland)*, v.24, n.10, p.1960, 2019.

LIU, W.; QIN, Y.; LIU, S.; XING, R.; YU, H.; CHEN, X.; LI, K.; LI, P. Synthesis, characterization and antifungal efficacy of chitosan derivatives with triple quaternary ammonium groups. *Int. J. Biol. Macromol.*, v.114, p.942–949, 2018.

MATICA, M.A.; AACHMANN, F.L.; TØNDERVIK, A.; SLETTA, H.; OSTAFE, V. Chitosan as a Wound Dressing Starting Material: Antimicrobial Properties and Mode of Action. *Int. J. Mol. Sci.*, v.20, n.23, p.5889, 2019.

MU, M.; LI, X.; TONG, A.; GUO, G. Multi-functional chitosan-based smart hydrogels mediated biomedical application. *Expert opinion on drug delivery*, v.16, n.3, p.239–250, 2019.

MUANPRASAT, C.; CHATSUDTHIPONG, V. Chitosan oligosaccharide: Biological activities and potential therapeutic applications. *Pharmacol. Therapeut.*, v.170, p.80–97, 2017.

PAUL, P.; KOLESINSKA, B.; SUJKA, W. Chitosan and Its Derivatives - Biomaterials with Diverse Biological Activity for Manifold Applications. *Mini Ver. Med. Chem.*, v.19, n.9, p.737-750, 2019.

MUXIKA, A.; ETXABIDE, A.; URANGA, J.; GUERRERO, P.; DE LA CABA, K. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. *International Journal of Biological macromolecules*, v.105, p.1358–1368, 2017.

OTTONELLI, M.; ZAPPIA, S.; DEMARTINI, A.; ALLOISIO, M. Chitosan-Stabilized Noble Metal Nanoparticles: Study of their Shape Evolution and Post-Functionalization Properties. *Nanomaterials*, v.10, n.2, p.224, 2020.



PATRULEA, V.; OSTAFE, V.; BORCHARD, G.; JORDAN, O. Chitosan as a starting material for wound healing applications. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, v.97, p.417–426, 2015.

SHARIATINIA, Z. Pharmaceutical applications of chitosan. *Interface Coloidal Adv. Sci.*, v.263, p.131-194, 2018.

SHARIATINIA Z. Pharmaceutical applications of chitosan. *Advances in colloid and interface science*, v.263, p.131–194, 2019.

SATO, T.; MELLO, D.; VASCONCELLOS, L.; VALENTE, A.; & BORGES, A. Chitosan-Based Coacervate Polymers for Propolis Encapsulation: Release and Cytotoxicity Studies. *Int. J. Mol. Sci.*, v.21, n.12, p.4561, 2020.

SONIN, D.; POCHKAEVA, E.; ZHURAVSKII, S.; POSTNOV, V.; KOROLEV, D.; VASINA, L.; KOSTINA, D.; MUKHAMETDINOVA, D.; ZELINSKAYA, I.; SKORIK, Y.; NAUMYSHEVA, E.; MALASHICHEVA, A.; SOMOV, P.; ISTOMINA, M.; RUBANOVA, N.; ALEKSANDROV, I.; VASYUTINA, M.; GALAGUDZA, M. Biological Safety and Biodistribution of Chitosan Nanoparticles. *Nanomaterials*, v.10, n.4, p.810, 2020.

WANG, W.; MENG, Q.; LI, Q.; LIU, J.; ZHOU, M.; JIN, Z.; ZHAO, K. Chitosan Derivatives and Their Application in Biomedicine. *International Journal of Molecular Sciences*, v.21, n.2, p.487, 2020.

ZHAO, D.; YU, S.; SUN, B.; GAO, S.; GUO, S.; ZHAO, K. Biomedical Applications of Chitosan and Its Derivative Nanoparticles. *Polymers*, v.10, n.4, p.462, 2018.

YOUNES, I.; GHORBEL-BELLAJ, O.; NASRI, R.; CHAABOUNI, M.; RINAUDO, M.; NASRI, M. Chitin and chitosan preparation from shrimp shells using optimized enzymatic deproteinization. *Process Biochem.*, v.47, n.12, p.2032–2039, 2012.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

NANOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO BASEADO EM NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO E CLAVANINA-MO PARA DIAGNÓSTICO DE *CANDIDA SP.*

K. L. RIBEIRO^{1,2}, I. A. M. FRIAS^{1,2}, A. G. SILVA JUNIOR^{1,2}, O.L. FRANCO^{3,4},
M.D.L. OLIVEIRA^{1,2}, C. A. S. ANDRADE^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco;

²Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco;

³Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas de Brasília, Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília;

⁴S-Inova Biotech, Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco.

E-mail para contato: kalline_farmajp@hotmail.com

RESUMO – *Candidíase e candidemia são as formas mais comuns de infecções fúngicas nos frequentes casos de infecções no ambiente hospitalar. Em adição, Candida sp. recebeu considerável atenção devido ao fenômeno de resistência antifúngica, para o qual alternativas como peptídeos antimicrobianos (PAM) estão sendo propostas. Diante dos demorados e dispendiosos métodos tradicionais de detecção de leveduras em amostras clínicas, abordagens inovadoras são bem-vindas no cenário atual. Biossensores eletroquímicos se destacam como alternativa sensível, rápida e de baixo custo para detecção de microorganismos. Para tal, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um biossensor impedimétrico para detecção de espécies de Candida spp. A metodologia inclui a construção de uma plataforma sensora constituída por um filme de poli (ácido 3-tiofeno acético) (PTAA), nanopartículas de dióxido de titânio aminadas (TiO₂-NH₂) e do PAM clavanina-MO (clavMO). A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foi utilizada para caracterizar o processo de montagem do sistema sensor, bem como reconhecimento das espécies fúngicas. Um limite de detecção (LOD) de 10¹ unidades formadoras de colônia por mL (UFC.mL) foi apresentada pelos quatro microorganismos estudados (Candida albicans, Candida tropicalis, Candida glabrata e Candida krusei), com maior resposta eletroquímica para C. albicans e C. krusei. O biossensor proposto se destaca como uma alternativa útil para a detecção sensível de Candida sp.*

Palavras-chave: Biossensor, leveduras, peptídeo antimicrobiano, impedância.

ABSTRACT – *Candidiasis and candidemia are the most common forms of fungal infections in frequent cases of nosocomial infections. In addition, Candida sp. received considerable attention*



due to the phenomenon of antifungal resistance, where alternatives such as antimicrobial peptides (AMP) are being proposed. In view of the time-consuming and expensive traditional methods of detecting yeasts in clinical samples, innovative approaches are welcome in the current scenario. Electrochemical biosensors stand out as a sensitive, fast and low-cost alternative for detecting microorganisms. To this end, the present study aimed to develop an impedimetric biosensor for the detection of Candida spp. The methodology includes the construction of a sensor platform consisting of a poly (3-thiophene acetic acid) (PTAA) film, aminated titanium dioxide nanoparticles (TiO₂-NH₂) and AMP clavadin-MO (clavMO). Electrochemical impedance spectroscopy (EIE) technique was used to characterize the assembly process of the sensor system, as well as the recognition of fungal species. A limit of detection (LOD) of 10¹ colony-forming units per mL (CFU.mL) was presented by all evaluated microorganisms (Candida albicans, Candida tropicalis, Candida glabrata and Candida krusei), with the highest electrochemical response for C. albicans and C. krusei. The proposed biosensor stands out as a useful alternative for the sensitive detection of Candida sp.

Keywords: Biosensor, yeasts, antimicrobial peptide, impedance.

1. INTRODUÇÃO

Apesar do papel fundamental em aplicações biotecnológicas na produção de alimentos e bebidas, os fungos têm despertado atenção pela presença constante em casos de infecções hospitalares (CHALLA et al., 2019). Por consequência da crescente resistência a antimicrobianos, espécies de *Candida* spp. se apresentam como um dos quatro principais agentes patogênicos presentes em infecções da corrente sanguínea (candidemia), configurando-se como um desafio para o ambiente clínico-hospitalar. Apesar de ser considerado um comensal simbiote, leveduras do gênero *Candida* spp. pode contaminar o corpo humano por veículos externos, principalmente entre pacientes imunossuprimidos. Infecções por leveduras são mais recorrentes em neonatos, pacientes sob tratamento de antibióticos e com uso de instrumentos invasivos, como cateteres e aparelhos de ventilação mecânica (ANTINORI et al., 2016; PATEL et al., 2018). Sete espécies de *Candida* spp. dentre as centenas existentes se destacam pela frequência de casos e patogenicidade: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* e *C. tropicalis*, representando quase a maioria absoluta dos casos de candidemia a nível mundial (PAPPAS et al., 2018).

A identificação de *Candida* spp. em amostras clínicas ainda exhibe como principais métodos o isolamento de microorganismos da cultura sanguínea e fluidos estéreis, testes imunoenzimáticos como o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), pesquisa histopatológica da doença em tecidos infectados e técnicas moleculares (SAFAVIEH et al., 2017). No entanto, apesar de demonstrarem um resultado satisfatório, são necessários vários dias para a obtenção de resultados no que diz respeito ao crescimento do microorganismo em culturas sólidas e caldos, a técnica histopatológica costuma ser invasiva e dolorosa ao paciente, testes imunossorológicos carecem de especificidade e abordagens moleculares como o PCR, FISH, etc., são considerados dispendiosos (KAUR; CHAKRABARTI, 2017; LASS-FLÖRL, 2017). Diante de tal problemática, novas opções são requeridas, onde dispositivos sensíveis, de rápida análise e baixo custo são características fundamentais.

Biossensores eletroquímicos se destacam como ferramentas inovadoras conhecidas por seu



baixo custo, portabilidade e sensibilidade aprimorada associada ao uso de componentes nanoestruturados. Em adição, tal abordagem de diagnóstico dispõe da vantagem de ser facilmente miniaturizado e realização de análises em tempo real, com resultados sendo obtidos em minutos (MADURAIVEERAN; SASIDHARAN; GANESAN, 2018). De constituição básica consistindo de um elemento sensor de biorreconhecimento (cuja finalidade repousa na especificidade e detecção do analito-alvo presente na amostra clínica/biológica) e um transdutor com objetivo de converter o evento da interação analito-alvo em um sinal elétrico proporcional a concentração do analito. Em adição, nanopartículas metálicas são empregadas em plataformas sensoras devido a suas características físico-químicas úteis no processo de transferência de elétrons de um sistema eletroquímico, além de elevada área superfície que permite a funcionalização com grupos funcionais e moléculas bioativas (MALEKZAD et al., 2017).

Inicialmente direcionada como segunda opção viável de composto antimicrobiano, os peptídeos antimicrobianos (PAM) denotam múltiplas funções, onde pesquisas direcionam sua aplicabilidade como elementos de biorreconhecimento (RIOOL et al., 2017). Sua estrutura peptídica linear catiônica, estabilidade e capacidade de ligação semisseletiva às superfícies celulares de microrganismos classificam o PAM como moléculas bioativas adequadas para uso em plataformas sensoras (ANDRADE et al., 2015; SILVA JUNIOR et al., 2018). Dentre tais peptídeos, a clavanina A, de sequência de aminoácidos (VFQFLGKIIHHVGNFVHGFSHVF-NH₂) se configura como um PAM anfipático isolado dos hemócitos de *Styela clava*, um organismo tunicado marinho (SILVA et al., 2015). Com a finalidade de promover um aprimoramento na habilidade de ligação à bicamada lipídica de microrganismos, SILVA et al., 2016 inseriu cinco resíduos de aminoácidos à sequência original da clavanina A (FLPII), mais precisamente na região C-terminal, dando origem ao PAM clavanina-MO (ClavMO) (VFQFLGKIIHHVGNFVHGFSHVFFLPII-NH₂).

Diante do abordado, o presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de uma plataforma biossensora impedimétrica baseada em monocamadas automontadas de poli (ácido tiofeno-acético) (PTAA), nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂) funcionalizadas com grupos amina e ClavMO para detecção e diferenciação de diferentes espécies patogênicas de *Candida spp.* A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foi utilizada para avaliar o processo de montagem do biossensor e seu desempenho em ensaios de biorreconhecimento.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Ácido 3-tiofenoacético (TAA), (3-aminopropil)trietoxissilano (APTES), TiO₂, dimetilsulfóxido (DMSO), N-hidroxissulfosuccinimida (NHS), 1-ethyl-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), ferrocianeto de potássio (K₄[Fe(CN)₆]) e ferrocianeto de potássio (K₃[Fe(CN)₆]) foram obtidas da Sigma-Aldrich (EUA). Todos reagentes são de grau analítico e não precisaram passar por purificação adicional. Água deionizada ultrapura foi utilizada em todos os experimentos, obtida pelo sistema Milli-Q plus (Billerica, EUA).

Síntese de nanopartículas de TiO₂ aminadas e clavMO

A modificação química das NPs TiO₂ ocorreu em um balão de fundo redondo. 500 mg de TiO₂ foi diluído em 50mL de DMSO e colocada em banho ultrassônico. Após dispersão, APTES (400 µL) foi adicionado à solução, permanecendo em agitação magnética por 12h. As



nanopartículas funcionalizadas com amina foram lavadas em metanol, filtradas e secas em estufa a 60 °C.

A clavMO foi sintetizada usando a estratégia N-9-fluorenilmetiloxycarbonil (Fmoc) em fase sólida e purificado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), resultando em grau de pureza >95%.

Parâmetros eletroquímicos

As análises via EIE foram realizadas em um potenciostato/galvanostato interfaceado com o software NOVA 1.11, além de usar o programa OriginPro8 para análise dos gráficos obtidos. A célula eletroquímica usada foi composta por três eletrodos imersos em uma solução de 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ (1:1) em tampão fosfato pH 7.4 usado como sonda redox. Um eletrodo de trabalho (ET) com superfície de ouro foi usado como eletrodo de trabalho para montagem da plataforma sensora. Ag/AgCl (saturado em KCl 3M) e platina foram utilizados como eletrodo de referência (ER) e eletrodo auxiliar (EA), respectivamente. As análises impedimétricas foram realizadas numa frequência de 100 mHz a 100 kHz com potencial de onda senoidal 10mV.

Formação do filme de PTAA

A eletrodeposição de TAA deu origem a filmes de politiofeno acético (PTAA) via técnica voltametria cíclica (VC). Determinada quantidade de TAA é dissolvida em HCl 0,1 M, onde o ET é imerso. A eletrodeposição ocorreu por meio de 20-40 ciclos voltamétricos em um potencial variando de -0,2V a + 1,5V, com potencial 100 mV.s⁻¹.

Montagem da plataforma sensora

Os grupos carboxila de PTAA livres foram ativados quimicamente com os agentes acopladores EDC NHS favorecendo a conjugação com as TiO₂ aminadas (TiO₂-NH₂). Em seguida, uma solução da clavMO (615 µM) foi prontamente preparada e adsorvida sobre o sistema PTAA/TiO₂-NH₂ para incubação por 10 minutos. Por fim, a plataforma formada foi testada para o reconhecimento de espécies de *Candida* (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei*) em diferentes concentrações variando de 10¹ a 10⁶ UFC mL⁻¹.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Fig. 1 mostra o voltamograma cíclico da polimerização do 3-TAA com a diminuição do pico de corrente anódica (em torno de 1,12V), além de uma mudança contínua em direção a potenciais elevados. Esse comportamento está associado ao aumento da espessura do filme após

cada ciclo de polimerização e, portanto, ao aumento da resistência à transferência de carga.

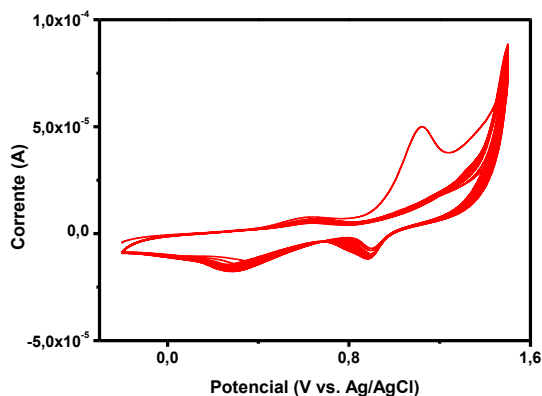


Figura 1 – Voltamograma Cíclico da polimerização do filme de PTAA.

A Fig. 2 mostra o diagrama de Nyquist referente à análise impedimétrica da montagem do sistema sensor, utilizando como parâmetro a variação na resistência à transferência de carga (R_{CT}). Após a obtenção do eletrodo de ouro limpo (Fig. 2, curva preta, $R_{CT} = 0,101 \text{ k}\Omega$), houve a eletrodeposição do filme PTAA. A Fig. 2 (curva vermelha) demonstra a resposta relativa à montagem do PTAA, resultando em pequeno incremento do R_{CT} ($R_{CT} = 0,124 \text{ k}\Omega$) e camada eletrodepositada de espessura próxima a 80 nm. Os grupos carboxílicos presentes no filme PTAA foram ligados covalentemente aos $\text{TiO}_2\text{-NH}_2$ pelos acopladores EDC NHS, como resultado, houve aumento da resposta impedimétrica com incremento do diâmetro do semicírculo ($R_{CT} = 0,137 \text{ k}\Omega$), como mostra Fig. 2 (curva azul). A integração das nanopartículas de TiO_2 teve como objetivo além da ancoragem da clavMO, aprimorar a cinética da transferência de elétrons entre o ET e solução eletrolítica, resultando no aumento da sensibilidade do sistema (SHETTI et al., 2019). Após a conjugação covalente com a clavanina-MO, foi observado um aumento adicional no diâmetro do semicírculo ($R_{CT} = 0,179$), Fig. 2 (curva verde). A integração da clavMO (de elevada cationicidade) à plataforma sensora objetivou interação direta com superfícies eletronegativas de membranas microbianas, discriminando membranas de outros tipos celulares (células de mamíferos, zwitteriônicas), evitando interações inespecíficas (NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011).

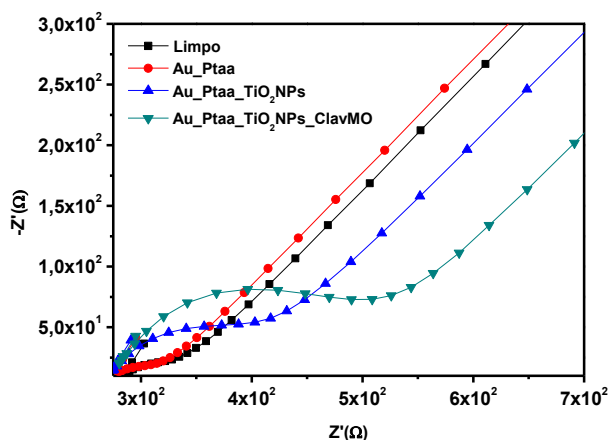


Figura 2 – Resposta impedimétrica da montagem da plataforma sensora.

A adição das amostras de diferentes espécies de *Candida* spp. à plataforma do biossensor promoveu um aumento do diâmetro do semicírculo proporcional ao aumento da concentração de microrganismos presente na suspensão, como mostra a Fig. 3 a-d. Esse efeito está relacionado à adesão das células ao biossensor, formando um complexo “clavMO-*Candida* spp.” que bloqueia a transferência de elétrons do par redox, resultando no aumento do R_{CT} . A variação relativa do R_{CT} (ΔR_{CT}) indicou uma relação linear entre a concentração das espécies e o R_{CT} , se apresentando da seguinte forma: *C. tropicalis* < *C. glabrata* < *C. albicans* < *C. krusei*, demonstrando uma análise diferencial para cada espécie de microorganismo. A inserção dos cinco resíduos de aminoácidos à estrutura original da clavanina A aprimorou a hidrofobicidade do PAM, resultando em maior inserção da membrana das espécies de *Candida* spp., cuja característica estrutural única de cada espécie resultou em respostas eletroquímicas diferentes interespecies (SILVA et al., 2016). Um limite de detecção de 10^1 CFU mL⁻¹ foi obtido para todas as espécies de *Candida* avaliadas.

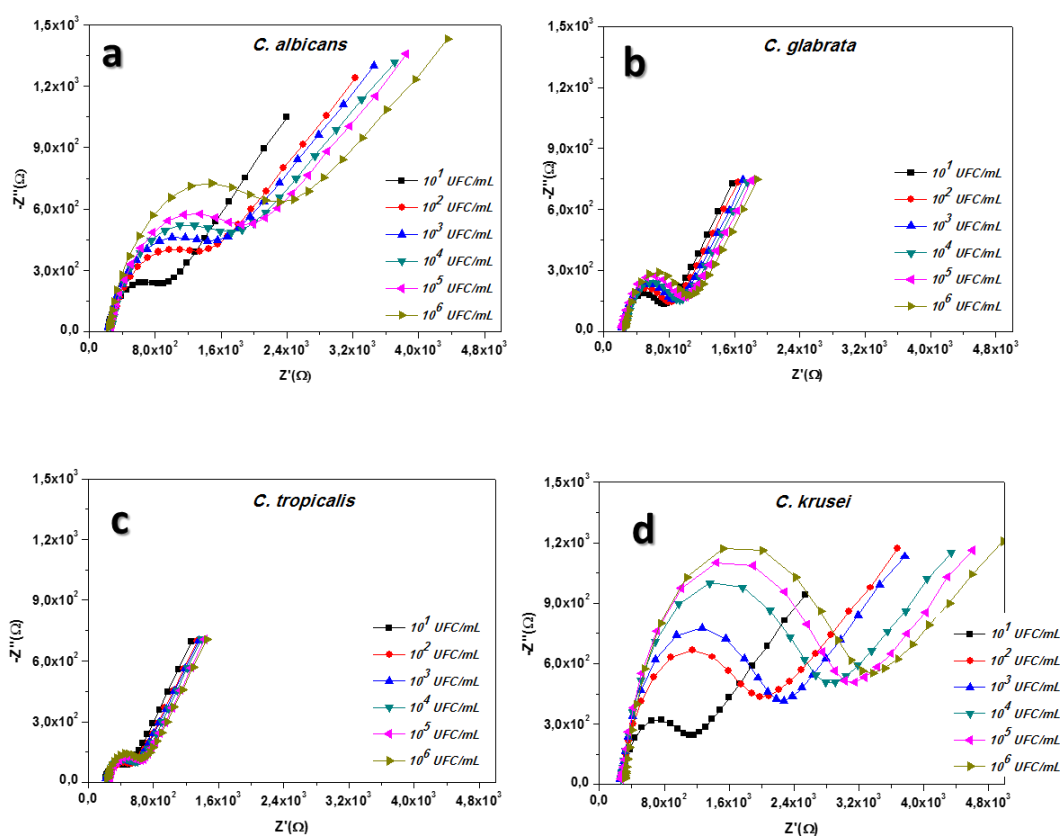


Figura 3 – Diagramas Nyquist do processo de biorreconhecimento do biossensor frente amostras de *Candida* em diferentes concentrações (10^1 a 10^6 UFC.mL⁻¹): a) *C. albicans*, b) *C. glabrata*, c) *C. tropicalis* e d) *C. krusei*.

4. CONCLUSÃO

O sistema sensor baseado em nanofilmes de PTAA, TiO₂-NH₂ e o peptídeo antimicrobiano clavMO foi capaz de reconhecer e diferenciar entre quatro espécies diferentes de *Candida*, onde *Candida albicans* e *Candida krusei* apresentaram a maior resposta eletroquímica analisada por meio da EIE. Foi alcançado um excelente limite de detecção para cada microrganismo avaliado



(10^1 UFC.mL⁻¹). Os resultados apresentados pelo sistema sensor PTAA_TiO₂_ClavMO mostram seu potencial para promissora aplicação biomédica na área de diagnóstico de *Candida sp.*

5. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, C. A. S. et al. Nanostructured sensor based on carbon nanotubes and clavainin A for bacterial detection. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 135, p. 833–839, 2015.
- ANTINORI, S. et al. Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. **European Journal of Internal Medicine**, v. 34, p. 21–28, 2016.
- CHALLA, S. et al. Fungal White Biotechnology Applications for Food Security : Opportunities and Challenges. In: A., Y. et al. (Eds.). . **Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi**. [s.l.] Springer, 2019. p. 119–148.
- KAUR, H.; CHAKRABARTI, A. Strategies to Reduce Mortality in Adult and Neonatal Candidemia in Developing Countries. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 3, p. 41, 2017.
- LASS-FLÖRL, C. Current Challenges in the Diagnosis of Fungal Infections. In: LION, T. (Ed.). . **Human Fungal Pathogen Identification**. New York: Humana Press, 2017. v. 1508p. 3–17.
- MADURAVEERAN, G.; SASIDHARAN, M.; GANESAN, V. Electrochemical sensor and biosensor platforms based on advanced nanomaterials for biological and biomedical applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 103, n. December 2017, p. 113–129, 2018.
- MALEKZAD, H. et al. Noble metal nanoparticles in biosensors: Recent studies and applications. **Nanotechnology Reviews**, v. 6, n. 3, p. 301–329, 2017.
- NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 464–472, 2011.
- PAPPAS, P. G. et al. Invasive Candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 18026, 2018.
- PATEL, P. K. et al. The epidemiology of hospital-acquired urinary tract-related bloodstream infection in veterans. **American Journal of Infection Control**, v. 46, n. 7, p. 747–750, 2018.
- RIOOL, M. et al. Antimicrobial Peptides in Biomedical Device Manufacturing. **Frontiers in Chemistry**, v. 5, n. August, p. 1–13, 2017.
- SAFAVIEH, M. et al. Advances in *Candida* detection platforms for clinical and point-of-care applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 441–458, 2017.
- SHETTI, N. P. et al. Nanostructured titanium oxide hybrids-based electrochemical biosensors for healthcare applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 178, p. 385–394, 2019.
- SILVA JUNIOR, A. G. et al. A simple nanostructured impedimetric biosensor based on clavainin a peptide for bacterial detection. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 255, p. 3267–3274, 2018.
- SILVA, O. N. et al. Clavainin a improves outcome of complications from different bacterial infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 3, p. 1620–1626, 2015.
- SILVA, O. N. et al. An anti-infective synthetic peptide with dual antimicrobial and immunomodulatory activities. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 35465, 2016.

6. AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa de estudo concedida.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

USO DE NANOESTRUTURAS DE Fe_3O_4 @QUITOSANA E CONCANAVALINA A PARA A DETECÇÃO IMPEDIMÉTRICA DE *CANDIDA SPP.*

M. S. MACHADO¹, A. G. SILVA JUNIOR^{1,2}, S. R. SÁ¹, R. G. LIMA-NETO³,
M. D. L. OLIVEIRA^{1,2} e C. A. S. ANDRADE^{1,2}

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica, Recife/PE, Brasil;

² Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, UFPE, Recife/PE, Brasil;

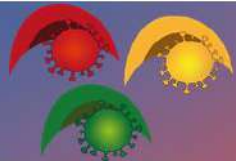
³ Departamento de Medicina Tropical, UFPE, Recife/PE, Brasil;

E-mail para contato: pfvmaari@gmail.com

RESUMO – Dentre as múltiplas espécies de Candida spp. presentes em casos de infecções nosocomiais, Candida albicans se destaca como principal agente microbiano. A alarmante taxa de mortalidade apresentada pela candidemia expõe a necessidade de métodos inovadores para a rápida detecção e diferenciação de leveduras patogênicas, visando a aplicação imediata da terapia mais adequada ao paciente infectado. Biossensores eletroquímicos são considerados uma ferramenta promissora no campo bioanalítico devido a sua elevada sensibilidade, baixo custo e miniaturização por integrar nanoestruturas na construção de plataformas sensoras. Lectinas como a Concanavalina A (ConA) são hololectinas que apresentam afinidade a determinados açúcares presentes na estrutura de microorganismos, como D-glicose e D-manose da parede celular de fungos do gênero Candida spp. No trabalho proposto, um sistema sensor composto por monocamadas automontadas de ácido 4-mercaptobenzóico (MBA) e nanopartículas magnéticas revestidas pelo polímero natural quitosana e funcionalizados com ConA (Fe_3O_4 @Quit-ConA) foi desenvolvido para a detecção de C. albicans em suspensão fúngica. As técnicas voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) comprovaram a montagem do biossensor e a detecção do microorganismo, cujo limite de detecção 10^1 UFC.mL⁻¹ destaca a sua sensibilidade. Os resultados obtidos apontam o sistema proposto como ferramenta complementar na identificação de fungos patogênicos.

Palavras-chave: Sensor, nanopartículas, lectina, leveduras.

ABSTRACT – Among multiple species of Candida spp. present in cases of nosocomial infections, Candida albicans stands out as the principal microbial agent. The alarming mortality rate presented by candidemia exposes the need for innovative methods for the rapid detection and differentiation of pathogenic yeasts, aiming at the immediate application of the most appropriate



therapy to the infected patient. Electrochemical biosensors are seen as promising tools in the bioanalytical field due to high sensitivity, low cost, and miniaturization for integrating nanostructures in the construction of sensor platforms. Lectins such as Concanavalin A (ConA) are hololectins that present affinity for sugars present in the structure of microorganisms, such as D-glucose and D-mannose of the fungal cell wall of the genus *Candida* spp. In the proposed work, a sensor system composed of self-assembled monolayers of 4-mercaptobenzoic acid (MBA) and magnetic nanoparticles coated with the natural polymer chitosan and functionalized with ConA ($Fe_3O_4@Quit-ConA$) was developed for the detection of *C. albicans* in fungal suspensions. Cyclic voltammetry (VC) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) techniques proved the assembly of the biosensor and the microbial detection, whose limit of detection (LOD) of 10^1 UFC.mL⁻¹ highlights its sensitivity. The obtained results stand out the proposed system as a complementary tool in the identification of pathogenic fungi.

Keywords: Sensor, nanoparticles, lectin, yeasts.

1. INTRODUÇÃO

Dentre os microorganismos eucarióticos que apresentam patogenicidade a humanos (cerca de 400 espécies), os fungos têm despertado um alarme no ambiente clínico e hospitalar, uma vez que os antifúngicos atuais não apresentam a mesma efetividade de outrora devido à resistência aos antimicrobianos. Fungos do tipo levedura apresentam como principal gênero a *Candida* spp., reconhecidas como um simbiote comensal principalmente encontrado na pele e mucosas (orofaringe, cavidade bucal, órgãos sexuais, etc.) (DE PAUW, 2011).

As infecções nosocomiais ocasionadas por fungos patogênicos crescem anualmente, onde *Candida* spp. representa 10% das infecções na corrente sanguínea (candidemia) e 25% das infecções no trato urinário nas unidades de terapia intensiva (JAHAGIRDAR, 2018). Tais infecções são mais frequentemente relacionados a neonatos, imunocomprometidos e pacientes sob tratamento com antibióticos de amplo espectro, além do uso de dispositivos invasivos como cateteres e sondas (ANTINORI, 2016). Dentre as mais de 150 espécies de *Candida* spp. catalogadas, sete se destacam em patogenicidade e número de casos de infecção humana: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida lusitanae*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* (AO, 2018).

Métodos tradicionais como semeio em meios de cultura sólidos e caldos e imunoenaios como o ELISA permanecem sendo o procedimento padrão para identificação do microorganismo. Apesar de efetivos, tais testes carecem em sensibilidade, além de ser necessário de 2 a 4 dias para o total crescimento do microorganismo e frequentes resultados falsos-positivos (VILLAMIZAR; MAROTO; RIUS, 2009). Em adição, técnicas moleculares como a reação em cadeia de polimerase (PCR) também é utilizada, mas apesar da sensibilidade, a técnica é dispendiosa no que diz respeito a reagentes e equipamentos (LAURI; MARIANI, *et al.* 2009). Diante das questões apresentadas, a detecção rápida e sensível das espécies patogênicas de *Candida* spp. se torna essencial para ao melhor prognóstico do paciente, além da rápida administração dos medicamentos adequados. Tais ações resultam em economia e redução do número de infecções pela redução do tempo no ambiente hospitalar (BILIR *et al.*, 2015).

Como alternativa aos métodos convencionais, biossensores se destacam como dispositivos analíticos inovadores por apresentarem sensibilidade, especificidade e custo reduzido, além de



possibilidade de detecção de múltiplos analitos em um mesmo sensor. Constituído basicamente por um elemento sensor com finalidade de identificação específica ao analito-alvo (podendo ser fragmentos de DNA/RNA, peptídeos, enzimas, anticorpos, proteínas, etc.) e um transdutor (dentre eles há destaque para o eletroquímico, óptico, piezoelétrico, etc.) com papel de converter a interação analito-alvo em um sinal elétrico detectável (PARMIN, 2019). Em adição, é importante salientar que biossensores do tipo eletroquímico estão em constante crescimento no campo biomédico, uma vez que suas características como simplicidade de montagem da plataforma sensora, rápida resposta e miniaturização são características indispensáveis (REZAEI; IRANNEJAD, *et al* 2019).

A definição de lectina mais completa foi formulada por Kocourek & Horejsi citados por Etzler (1985). De acordo com estes autores, lectinas são proteínas não pertencentes ao sistema imunológico, porém capazes de reconhecer sítios específicos em moléculas e ligar-se reversivelmente a carboidratos, sem alterar a estrutura covalente das ligações glicosídicas dos sítios.

Sobressaindo-se como alternativas de custo reduzido e comprovada efetividade, lectinas surgem como opção viável de elemento sensor diante dos anticorpos e oligonucleotídeos. Em meio a diversos tipos e locais onde são isoladas, as lectinas de plantas como a concanavalina A (ConA) são proteínas com características únicas de ligação a carboidratos específicos que constituem a superfície da parede celular e componentes internos de múltiplos organismos (KARNCHANATAT, 2012). À vista disso, lectinas têm sido implementadas em biossensores eletroquímicos como moléculas de biorreconhecimento para detecção de microorganismos, onde as particularidades estruturais de cada analito permite a detecção e diferenciação entre as espécies (DAN, X.; LIU; NG, *et al* 2016; WANG; ANZAI, *et al* 2015).

Dessa forma, o presente trabalho descreve o desenvolvimento de uma plataforma biossensora composta por monocamadas automontadas de ácido 4-mercaptobenzóico (MBA), nanopartículas magnéticas revestidas por quitosana e funcionalizadas pela lectina ConA ($\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quit-ConA) para detecção de fungos do gênero *Candida* spp. através das técnicas voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

MBA, quitosana, hidróxido de amônio (NH_4OH), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS) foram adquiridos pela Sigma-Aldrich (EUA). Cloreto férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), ferricianeto de potássio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), ferrocianeto de potássio ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico foram obtidos pela VETEC (Brasil). Água deionizada ultrapura foi utilizada em todas as etapas dos experimentos, obtida pelo sistema de purificação Milli-Q.

Preparo da plataforma biossensora

Inicialmente, a cada novo experimento, o eletrodo de trabalho (ET) com superfície de ouro ($\phi = 2$ mm) passa por um processo de limpeza por meio de NaClO (~ 15 min), seguido de banho ultrassônico e água deionizada. Em seguida, é realizada uma análise via VC e EIE. Após a obtenção de um voltamograma padrão de eletrodo com superfície de ouro limpo, a montagem do biossensor foi iniciada. Logo depois, o ET foi imerso em uma solução etanólica de MBA (10mM) e mantido



em repouso durante 10min para a obtenção de uma monocamada automontada. Posteriormente, a nanopartícula $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quit-ConA}$ foi aplicada (15min) à monocamada automontada de MBA, seguida com aplicação prévia dos agentes acopladores EDC-NHS (0.4 M e 0.1 M, respectivamente, 1:1, v/v).

Cultura dos microrganismos e experimentos de biorreconhecimento

Candida albicans foi o microorganismo de escolha para o teste de biorreconhecimento eletroquímico, uma vez que a mesma representa a maioria dos casos de infecção. De início, o fungo foi semeado, colhido, lavado e ressuscitado em solução salina (0,9%) em diferentes concentrações de unidades formadoras de colônia (UFC mL^{-1}) (10^1 a 10^5 UFC mL^{-1}) de acordo com a escala de McFarland. Todos os materiais utilizados no processo foram previamente esterilizados. Para avaliar a detecção do microorganismo, a suspensão fúngica foi gotejada e mantida à superfície do sensor durante 10min em temperatura ambiente. Após o período de interação analito-alvo, água ultrapura foi utilizada para remover as leveduras não ligadas.

Caracterização eletroquímica

A avaliação eletroquímica foi realizada com o auxílio de um potenciostato/galvanostato μ Autolab PGSTAT 128N (Ecochemie, Holanda) associado ao software NOVA 1.11 e programa OriginPro8 para análise dos gráficos. Ferro-ferricianeto de potássio 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ foi usado como par redox, o qual foram dispostos 20 mL da solução em uma célula eletroquímica. Nesta solução foram imersos três eletrodos: eletrodo de referência (ER) saturado em KCl 3M (Ag/AgCl), contra-eletrodo (CE) de platina e um eletrodo de trabalho (ET) com superfície de ouro, local de montagem do biossensor. Os parâmetros voltamétricos utilizados foram potencial -0,2 a 0,7 V com velocidade de varredura = 50 mV, enquanto que os estudos impedimétricos foram realizados utilizando a frequência de 100 mHz a 100 kHz e potencial de onda senoidal de 10 mV.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a verificação do eletrodo indicando a limpeza da superfície de ouro de forma correta, o primeiro componente da plataforma a ser analisado foi o MBA, na concentração 10mM, onde foram avaliados os seguintes tempos de adsorção: 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min e 30 min, período o qual o eletrodo ficou imerso na solução de MBA.

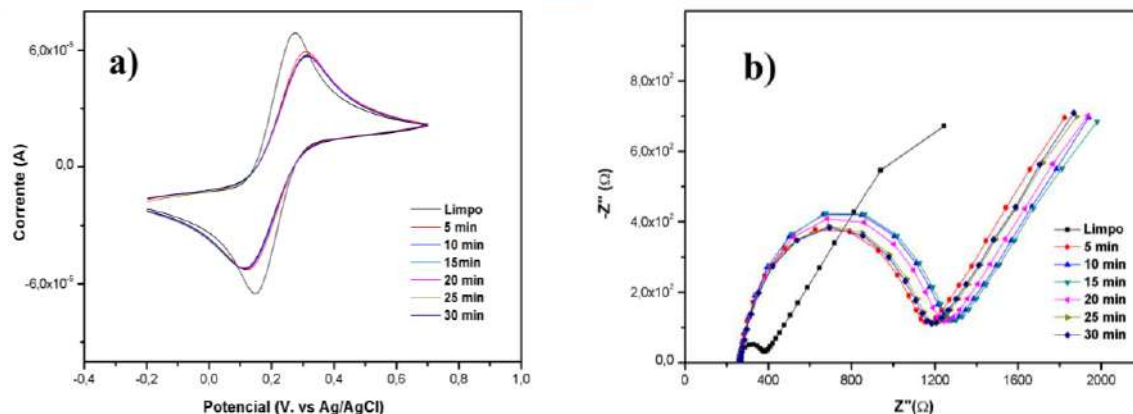


Figura 1 – Avaliação voltamétrica (a) e impedimétrica (b) do tempo de adsorção do MBA (10mM) na superfície de ouro do eletrodo.

Na Fig. 1 temos a resposta interfacial do MBA após a interação com o ouro do ET. Na avaliação voltamétrica (Fig. 1a), observa-se o fechamento dos picos catódicos e anódicos após a deposição do MBA, enquanto que na resposta impedimétrica (Fig. 1b) houve o aumento no diâmetro do semicírculo de Cole-Cole relacionado a resistência a transferência de carga (R_{CT}), fenômeno atribuído a dificuldade da sonda redox alcançar a superfície do ET após a deposição de compostos ao eletrodo (GROSSI; RICCÒ, *et al.* 2017).

O MBA foi utilizado visando a obtenção de monocamadas automontadas, o qual o grupo tiol (-SH) do MBA apresenta elevada afinidade ao ouro, resultando na ligação S-Au em um processo de quimissorção espontânea (XUE, Y *et al.*, 2014).

Percebe-se que no tempo de 10 minutos a maior resposta foi obtida (voltamograma e curva azul - ▲), indicando total saturação do ouro do ET. A próxima etapa constitui a ligação das $Fe_3O_4@Quit-ConA$ à monocamada de MBA recobrendo o eletrodo ($2\mu L$ – em diferentes períodos de tempo). A ativação prévia dos grupos carboxílicos terminais do MBA foi obtida através da adição do EDC NHS (0,4 mM e 0,1 mM, respectivamente - $2\mu L$ por 5 min) para promover uma ligação mais estável aos grupos amina livres presentes na estrutura das nanopartículas.

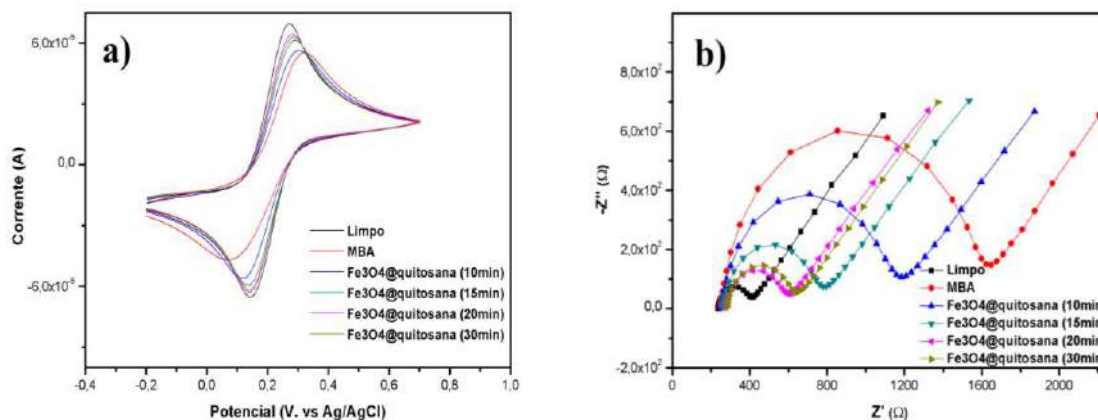
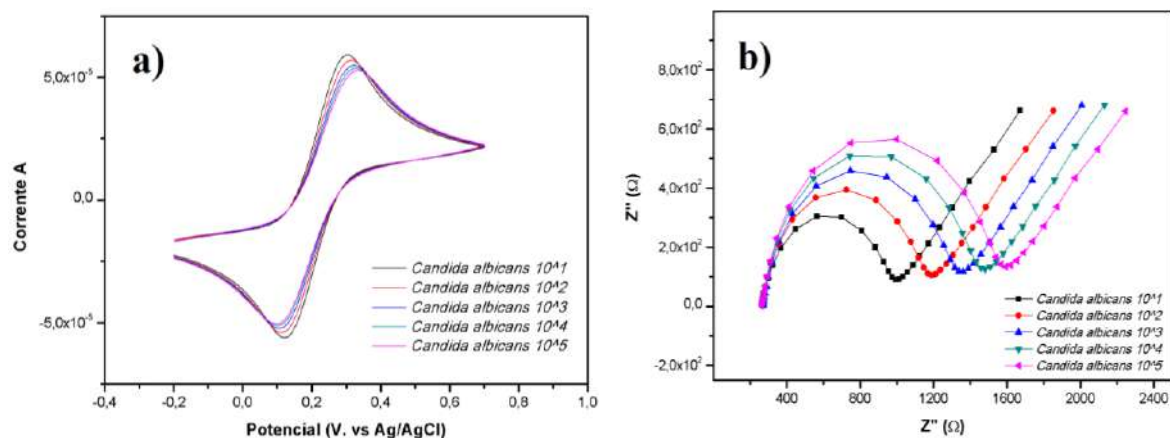


Figura 2 - Avaliação voltamétrica (a) e impedimétrica (b) da adsorção da nanopartícula magnética revestida por quitosana e modificada com ConA.

Na Fig. 2 observamos o comportamento interfacial da nanopartícula após ligação ao MBA



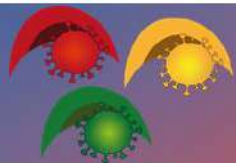
associado ao uso do EDC NHS. A condutividade da $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quit-ConA em conjunto com as cargas positivas/neutras presentes no éster NHS resultou no aumento dos picos anódicos e catódicos (Fig. 2a) e redução no diâmetro dos semicírculos (Fig. 2b) (KELEŞTEMUR; ALTUNBEK; CULHA, *et al.* 2017). Os resultados obtidos indicam uma melhor resposta voltamétrica e impedimétrica apresentada pela adsorção no tempo de 15 min (voltamograma e curva verde - ∇), sendo ela a resposta eletroquímica média apresentada pelos períodos de tempo avaliados. O tempo de adsorção é escolhido baseado na sobreposição dos gráficos, durante os testes que foram feitos de forma repetitiva. A média de 15min foi a que melhor se sobrepôs. Dessa forma, fica estabelecido que o tempo total de obtenção da plataforma biossensora $\text{MBA_Fe}_3\text{O}_4@$ Quit-ConA é de 25 min.

Figura 3 - Avaliação voltamétrica (a) e impedimétrica (b) da detecção da *Candida albicans* pelo sistema sensor $\text{MBA_Fe}_3\text{O}_4@$ Quit-ConA.

Visando comprovar o biorreconhecimento proposto pelo biossensor desenvolvido, foi realizada uma avaliação por meio da VC e EIE com o fungo *Candida albicans* (Fig. 3), onde o mesmo foi suspenso em solução tampão pH 7 e separado em diferentes concentrações (10^1 a 10^5 UFC.mL $^{-1}$) de acordo com a escala de McFarland. Observa-se um fechamento gradual dos picos catódicos e anódicos (Fig. 3 a) e aumento gradual dos semicírculos (Fig. 3 b) à medida que a concentração do microorganismo adsorvido aumenta.

Com o aumento da taxa de mortalidade pela candidemia vem a necessidade de métodos inovadores para a rápida detecção e diferenciação da *Candida* spp. Portanto, os tempos apresentados neste estudo tem como objetivo destacar a resposta rápida da plataforma biossensora se comparada a outros métodos que chegam a demorar dias para se obter uma resposta, dificultando assim uma terapia imediata ao paciente, diminuindo suas chances de cura.

ConA é uma hololectina que apresenta uma estrutura que se liga a açúcares específicos. Pode-se destacar os principais monossacarídeos que compõem a estrutura de *Candida* spp., a saber: D-glicose (Glc), N-acetil-glicosamina (GlcNAc), D-manose (Man) e ácido siálico (SA) (MASUOKA, 2004). Em adição, a literatura destaca que o ConA apresenta uma ligação específica tais açúcares, principalmente Glc e Man (MOUYNA, 2016). Dessa forma, o sistema proposto ostentando o ConA como elemento sensor foi capaz de se ligar aos açúcares citados, apresentando limite de detecção da *C. albicans* de 10^1 UFC.mL $^{-1}$.



4. CONCLUSÃO

Um sistema biossensor composto por monocamadas automontadas de MBA e nanopartículas magnéticas funcionalizadas por lectina foi desenvolvido para detecção de *C. albicans* em suspensões fúngicas. Com limite de detecção 10^1 UFC mL⁻¹, o biossensor mostrou-se sensível à detecção do microorganismo. Novos testes eletroquímicos serão realizados com outras espécies de *Candida* spp., onde se espera que diferentes padrões voltamétricos e impedimétricos sejam alcançados uma vez que a composição de açúcares na estrutura da parede celular fúngica varia interespecies. O biossensor proposto pode ser considerado uma promissora opção de dispositivo para auxiliar na detecção de fungos patogênicos.

5. REFERÊNCIAS

- ANTINORI, S. et al. Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. **European Journal of Internal Medicine**, v. 34, p. 21–28, 2016.
- AO, W. et al. Rapid detection and differentiation of clinically relevant candida species simultaneously from blood culture by use of a novel signal amplification approach. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 1, 2018.
- BILIR, S. P. et al. The economic impact of rapid *Candida* species identification by T2Candida among high-risk patients. **Future microbiology**, v. 10, p. 1133–1144, 2015.
- DAN, X.; LIU, W.; NG, T. B. Development and Applications of Lectins as Biological Tools in Biomedical Research. **Medicinal Research Reviews**, v. 36, n. 2, p. 221–247, 2016.
- DE PAUW, B. E. What are fungal infections? **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 3, n. 1, p. 1–8, 2011.
- GROSSI, M.; RICCÒ, B. Electrical impedance spectroscopy (EIS) for biological analysis and food characterization: A review. **Journal of Sensors and Sensor Systems**, v. 6, n. 2, p. 303–325, 2017.
- JAHAGIRDAR, V. L. et al. *Candida* species as potential nosocomial pathogens – A review. **Electronic Journal of General Medicine**, v. 15, n. 2, p. 0–4, 2018.
- KARNCHANATAT, A. Antimicrobial Activity of Lectins from Plants. In: **Antimicrobial Agents**. [s.l.] InTech, 2012. p. 145–178.
- KELEŞTEMUR, S.; ALTUNBEK, M.; CULHA, M. Influence of EDC/NHS coupling chemistry on stability and cytotoxicity of ZnO nanoparticles modified with proteins. **Applied Surface Science**, v. 403, p. 455–463, 2017.
- LAURI, A.; MARIANI, P. O. Potentials and limitations of molecular diagnostic methods in food safety. **Genes & Nutrition**, v. 4, n. 1, p. 1–12, 2009.
- MASUOKA, J. Surface Glycans of *Candida albicans* and Other Pathogenic Fungi : Physiological Roles , Clinical Uses , and Experimental Challenges Surface Glycans of *Candida albicans* and Other Pathogenic Fungi : Physiological Roles , Clinical Uses , and Experimental Chal. **Clinical microbiology reviews**, v. 17, n. 2, p. 281–310, 2004.
- MOUYNA, I. et al. GH16 and GH81 family β -(1,3)-glucanases in *Aspergillus fumigatus* are essential for conidial cell wall morphogenesis. **Cellular Microbiology**, v. 18, n. 9, p. 1285–1293, 2016.
- PARMIN, N. A. et al. **Biosensor Recognizes the Receptor Molecules**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.
- REZAEI, B.; IRANNEJAD, N. Electrochemical detection techniques in biosensor applications. In: **Electrochemical Biosensors**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. p. 11–43.



VILLAMIZAR, R. A.; MAROTO, A.; RIUS, F. X. Improved detection of *Candida albicans* with carbon nanotube field-effect transistors. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 136, n. 2, p. 451–457, 2009.

WANG, B.; ANZAI, J. I. **Recent progress in lectin-based biosensors** *Materials*, 2015.

XUE, Y. et al. Quantifying thiol–gold interactions towards the efficient strength control. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 1–9, 2014.

6. AGRADECIMENTOS

Ao PROPESQ/UFPE pela bolsa concedida e CNPq pelo auxílio financeiro. Agradeço ao meu orientador Prof. César Andrade pela confiança e oportunidade, e a todos do BIONANO.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

GENOSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM POLITIOFENO PARA DETECÇÃO DE DIFERENTES SUBTIPOS DO PAPILOMA VÍRUS HUMANO

M. R. S. NEVES¹, R. P. S. de LUCENA², N. LUCENA-SILVA³, C. A. S. ANDRADE^{1,2} e M.
D. L. OLIVEIRA^{1,2}

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica.

² Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

³ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Departamento de Imunologia;

E-mail para contato: matheusr2014@outlook.com

RESUMO – *No presente trabalho foi desenvolvido um genossensor baseado em poli (ácido tiofeno-3-acético) (PTAA) para a biodetecção do gene supressor de tumor p53 em amostras de cDNA de pacientes infectados com HPV de alto e baixo risco de desenvolvimento maligno de neoplasias no colo do útero, da região anogenital, e na região da orofaringe. A montagem do genossensor foi baseada na polimerização do PTAA, com a subsequente ligação covalente da sonda p53 para ocorrer a ligação com as amostras de cDNA do vírus. As análises do processo de montagem do genossensor foram obtidas através da voltametria cíclica e da espectrometria de impedância eletroquímica. Foi possível distinguir diferentes subtipos de HPV através de dados coletados em $\Delta R_{ct}\%$. Os resultados indicaram boa sensibilidade, especificidade e biocompatibilidade do genossensor, e a potencial utilização do PTAA como filme para a imobilização da sonda de estudo para HPV.*

Palavras-chave: Biossensor, PTAA, Gene p53, HPV

ABSTRACT – *In the present work, a poly (thiophene-3-acetic acid) (PTAA) -based genosensor was developed for the bioetection of the tumor suppressor gene p53 in cDNA samples from patients infected with HPV at high and low risk of malignant neoplasm development in the cervix, anogenital region, and oropharynx region. The assembly of the genosensor was based on the polymerization of the PTAA, with the subsequent covalent attachment of the p53 probe to occur the immobilization with the virus cDNA samples. The analysis of the genosensor assembly process was obtained through cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectrometry. It was*



possible to distinguish different subtypes of HPV through data collected in $\Delta Rct\%$. Results indicated the good sensitivity, specificity and biocompatibility of the genosensor, and the potential use of PTAA as a film for immobilizing the HPV study probe.

Keywords: Biosensor, PTAA, p53 gene, HPV

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma das causas de mortes mais comuns no mundo, sendo responsável por 9,8 milhões de mortes em 2018 (OMS, 2018). No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (Inca), cerca de 582 mil novos casos foram registrados em 2018. As infecções virais têm uma importante contribuição no desenvolvimento de 15% a 20% de todos os cânceres humanos.

Entre essas infecções virais, O papiloma vírus humano (HPV) está relacionado às lesões anogenitais responsáveis pela doença sexualmente transmissível de grande impacto na saúde pública devido a sua alta incidência. O HPV é responsável pelo processo neoplásico maligno, principalmente em células escamosas do colo do útero, da região anogenital, e na região da orofaringe, tendo em vista que cerca 95% dos casos de câncer cervical em todo o mundo são positivos para DNA oncogênico do HPV (Chee Kai Chan et al., 2019). Os tipos de HPV estão divididos no grupo de baixo risco, dentre eles os 6, 11, 53, 66, 70, 73 e 82 e o grupo de alto risco são os subtipos 16, 18, 31, 33, 35, 51 52, 56, 58, 59 e 68.

Os métodos de diagnóstico atuais para o diagnóstico do HPV não são de imediato. A princípio é realizada uma anamnese com exames citológicos, como o teste de Papanicolau, para avaliar os fatores de risco relacionados ao câncer. Em seguida, são realizados exames moleculares. Entre esses exames se destacam a captura híbrida, uma técnica simples, rápida, segura e de baixo custo, todavia, e incapaz de detectar todos os tipos virais de alto risco e não determina o tipo viral específico. E a reação da polimerase em cadeia (PCR), sendo o padrão ouro para o diagnóstico do HPV, têm elevada sensibilidade e especificidade na identificação do DNA do HPV, porém, apresenta custo elevado.

Os métodos eletroanalíticos, como a voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), são utilizados em biossensores nanoestruturados para a obtenção de propriedades elétricas mensuráveis de biomoléculas como fragmentos de DNA oncogênico do vírus, e também da proteína p53. A proteína p53 atua na regulação do ciclo celular como um agente pró-apoptótico. Desta forma, é alvo para as proteínas oncogênicas expressas por tipos de HPV de alto risco, principalmente o 16 e o 18. Assim, a alta sensibilidade e o baixo custo desses métodos tornam possível de realizar um diagnóstico preciso dos estágios primários da infecção (Pegah Mahmood et al.,2020), contribuindo para o tratamento mais eficiente para o paciente.

O poli (ácido tiofeno-3-acético) (PTAA) é um polímero intrinsecamente condutor que foi escolhido como plataforma para o desenvolvimento do biossensor, devido a sua boa condutividade, estabilidade ambiental e excelente estabilidade eletroquímica (Yangping Wen et al.,2012). Ademais, a boa biocompatibilidade do PTAA causada pelos grupamentos carboxílicos funcionalizados a sua estrutura, permite a imobilização covalente de espécies biológicas, tornando-o uma ótima escolha como plataforma para o biossensor. Portanto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o processo de adsorção de PTAA como nanoestrutura para imobilização da sonda p53 para biodetecção do gene supressor de tumor p53 em amostras de cDNA de pacientes infectados com HPV de alto e baixo risco.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os métodos analíticos utilizados para avaliação do desenvolvimento do biossensor foram a voltametria cíclica (VC), que foram realizadas a um potencial de varredura fixo de -0,2 a 0,7 V e velocidade de varredura de 50 mV.s^{-1} . Os dados da espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), foram obtidos em uma faixa de frequência entre 100 mHz a 100 KHz com um potencial de amplitude alternada de 10 mV.

Para o desenvolvimento do biossensor, foram utilizados uma célula eletroquímica contendo três eletrodos, o eletrodo de trabalho de disco de ouro, o contra eletrodo de platina e o de referência de Ag/AgCL saturado com KCl. Os três eletrodos foram imersos na célula eletroquímica contendo 20 mL de solução de 10 mM de ferro-ferricianeto de potássio $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1:1), atuando como sonda redox.

Para o processo de montagem do biossensor, inicialmente foi realizado um procedimento de limpeza e subsequente caracterização do eletrodo de ouro limpo, para garantir a não presença de impurezas que interfiram no resultado da análise. Após a caracterização do eletrodo limpo, o eletrodo foi imerso numa solução de 20 mL de PTAA para a realização do processo de polimerização em 40 ciclos de voltametria com potencial aplicado de 0.70V. Em seguida, foi avaliado e caracterizado através da voltametria cíclica (VC) na solução ferro-ferricianeto de potássio.

Após a caracterização do processo de polimerização, foi adicionado $4\mu\text{L}$ da solução de EDC:NHS (1:1) no eletrodo de trabalho para ativar os grupos carboxílicos do polímero, sendo incubado por 10min. Posteriormente, foi gotejado $2\mu\text{L}$ da solução da sonda p53 sobre o eletrodo modificado por 30min para permitir a imobilização covalente da sonda. Após as ligações da sonda p53 com o PTAA, foi obtido o sistema genossensor denominado PTAA-Sonda p53, e avaliado frente às amostras de cDNA de pacientes infectados por HPV de alto e baixo risco para detecção da proteína p53.

O genossensor foi exposto às diferentes amostras de cDNA contendo HPVs. Foi gotejado $2\mu\text{L}$ da solução da amostra de cDNA na concentração 100 pg/mL^{-1} sobre o genossensor, onde anteriormente a solução foi aquecida em ebulição por 90 segundos para possível separação das fitas de DNA da amostra e aplicada rapidamente no eletrodo. Após incubação por 30 minutos a bioatividade do sistema sensor foi caracterizada por VC e EIE. Na figura 1, podemos observar um esquema representativo de montagem de cada etapa da plataforma sensora.

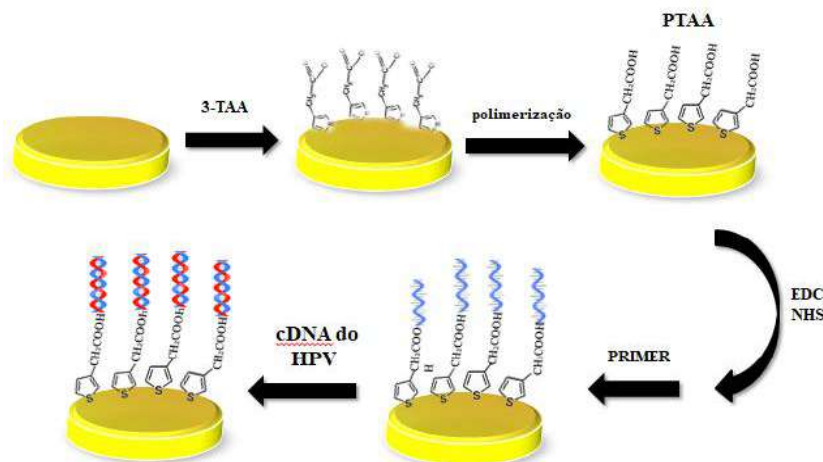


Figura 1 – Esquema do processo de montagem do genossensor na superfície de ouro do eletrodo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de eletropolimerização do aminotiofeno foi realizado através de varreduras de VC para formação do filme PTAA na superfície do eletrodo de trabalho. Após o aumento das correntes de pico anódicas e catódicas foi verificado a formação do filme de PTAA sobre a superfície do eletrodo de ouro. Além disso, foi possível observar a formação de alguns picos na região catódica devido à presença de grupos carboxílicos do PTAA característico do processo de óxido-redução (Figura 2).

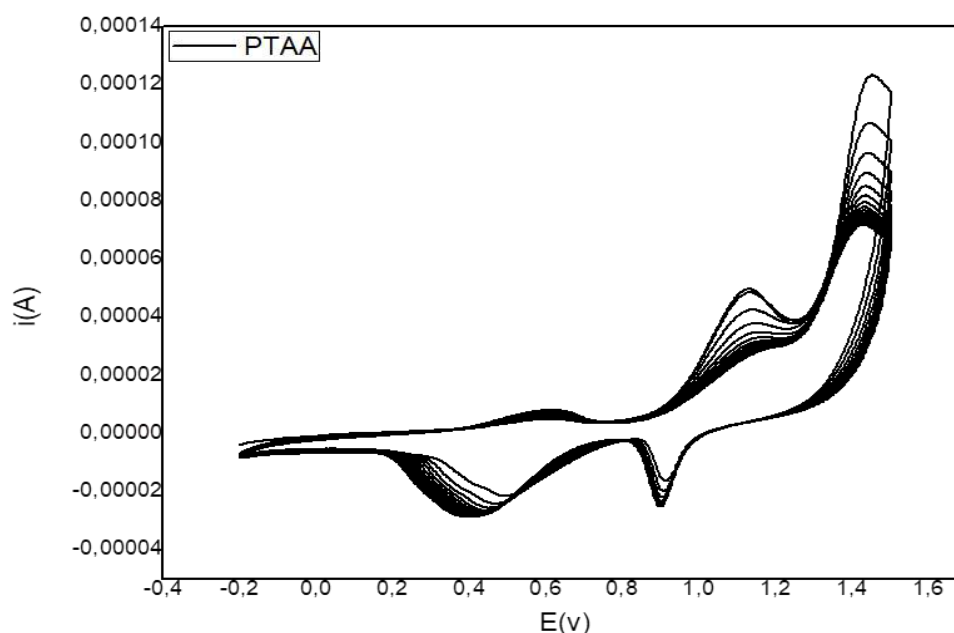


Figura 2 – Gráfico voltamétrico do processo de polimerização do PTAA.

Essas características indicam a eficiência que o filme de PTAA foi formado na superfície do eletrodo de ouro (Dong li et al., 2012). Após a obtenção do filme de PTAA, foi realizada a caracterização eletroquímica através das técnicas de voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) utilizando a sonda redox ferro-ferricianeto de potássio. Pode-se observar na Figura 3a que o eletrodo de ouro limpo apresenta picos anódico e catódico bem definidos, característico de um processo limitado por difusão. Em adição, a presença do filme de PTAA revela uma queda na corrente de pico anódica (i_{pa}) e catódica (i_{pc}), o que reflete uma queda na resposta amperométrica total do sistema.

A análise impedimétrica destacada pelo gráfico de Nyquist (Fig. 3b) está de acordo com a análise de voltametria cíclica. É possível observar que o eletrodo limpo apresenta um comportamento limitado por difusão com um pequeno diâmetro do semicírculo. Em contrapartida, quando observamos a deposição do filme, o valor do diâmetro do semicírculo aumenta o que está diretamente relacionado com o incremento na resistência de transferência de carga (RCT).

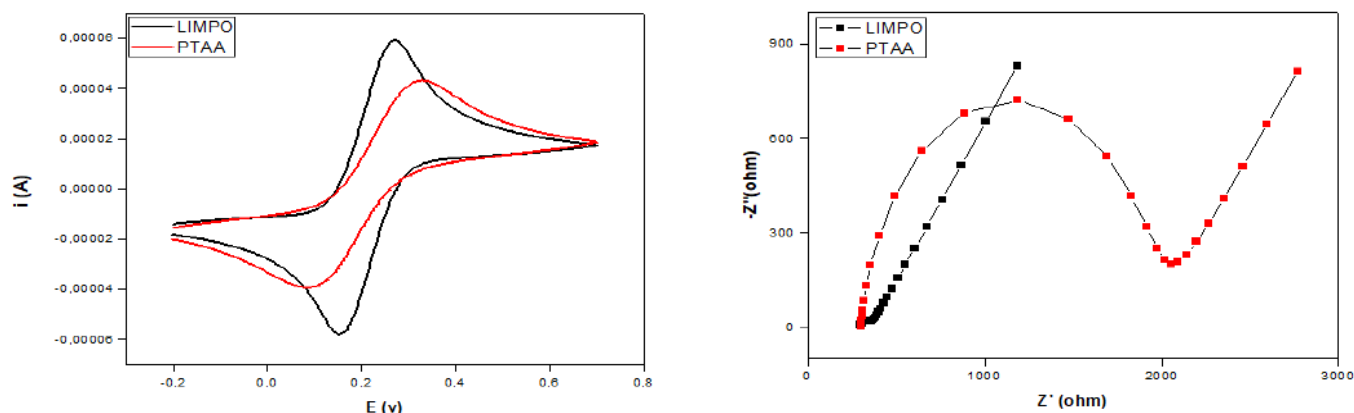


Figura 3 – Análises voltamétrica e impedimétrica após a polimerização do PTAA sobre o eletrodo de ouro.

O grupos carboxílicos presentes na superfície do PTAA depositado na superfície do eletrodo de ouro foram ativados com EDC:NHS. Esta ativação foi essencial para o acoplamento covalente da sonda p53. Pode-se observar que após a imobilização da sonda houve uma nova diminuição das correntes ipa e ipc θ que reflete um bloqueio na transferência de carga entre o eletrodo e o par redox (Fig. 4a). Em adição, no gráfico de Nyquist é possível observar o aumento das componentes real e imaginária do sistema como reflexo do incremento da resistência, o que comprova a adsorção covalente da sonda aminada sobre a superfície do filme de PTAA (Hui Peng, et al., 2007). Tais resultados se corroboram.

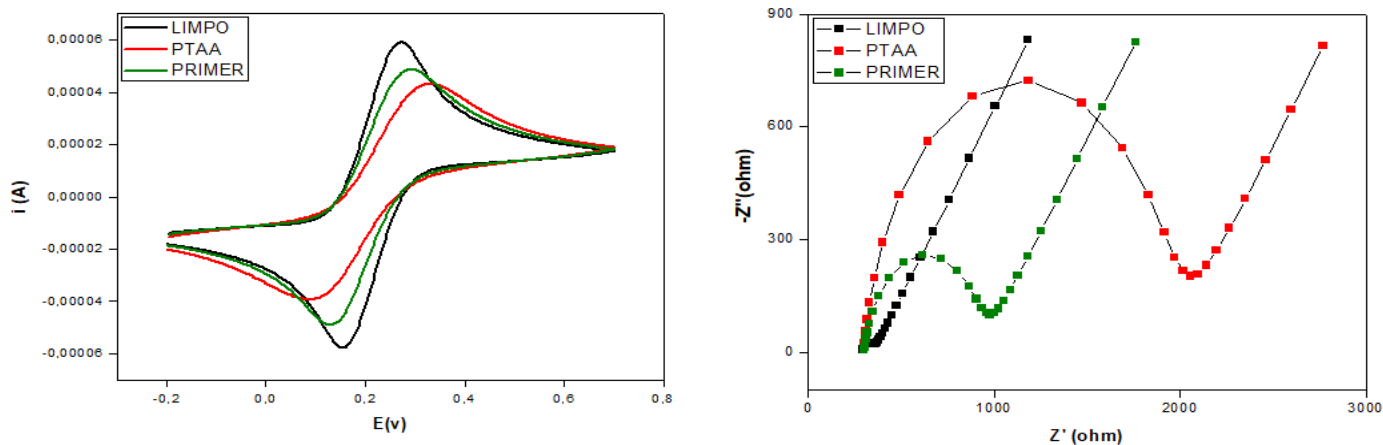


Figura 4 – Análises de VC e EIE do processo de imobilização do primer aminado no PTAA após ativação via EDC/NHS.

A capacidade de bioreconhecimento do sistema sensor PTAA-PrimerHPV foi avaliada frente à amostra de cDNA do HPV na concentração de 100 pg/mL^{-1} . As análises eletroquímicas de VC e EIE (Fig. 5a e 5b), revelaram que houve interação via processo de hibridização entre a sonda e a

amostra de cDNA. O processo de hibridização da sonda p53 é destacado pela redução dos picos catódico e anódico e consequente aumento no diâmetro do semicírculo do gráfico de Nyquist.

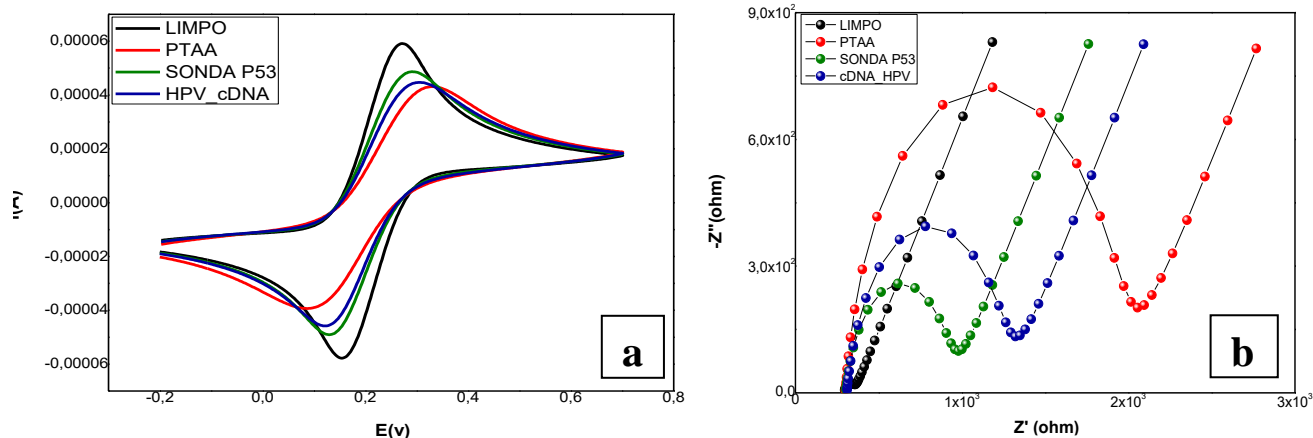


Figura 5 – Análises de VC e EIE do processo de hibridização da sonda p53 e amostra de cDNA do HPV.

Foram feitas análises dos tipos de HPV 6, 11, 16, 31, 33, 45 e 58 para avaliar a resposta frente às diferentes concentrações de cDNA de acordo com a virulência de cada subtipo frente a sonda p53. Os dados obtidos em $\Delta R_{ct}\%$ (Fig. 6), demonstram que o genossensor foi capaz de diferenciar os tipos de HPV de acordo com a sua atividade cancerígena, indicando que espécies de alto risco como o HPV 16 apresentaram interação maior com a sonda p53 em comparação com as de baixo risco.

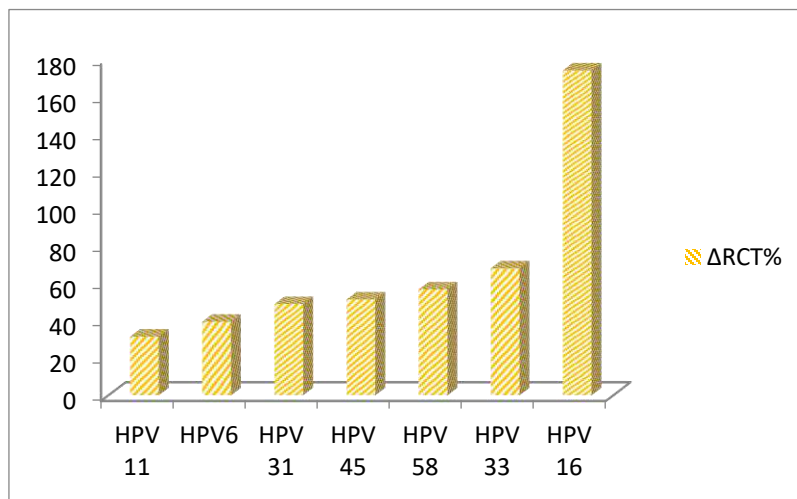


Figura 6 – gráfico de barras a partir da extração de dados ΔR_{ct} de cada subtipo de HPV de amostras de cDNA.



4. CONCLUSÃO

Foi desenvolvido um genossensor baseado na ligação covalente da sonda p53 na superfície do PTAA para detecção de amostras de cDNA de tipos distintos de HPV. O genossensor apresentou boa condutividade para a obtenção de dados eletroquímicos das amostras de cDNA do vírus. O sistema desenvolvido demonstrou elevada bioafinidade, sensibilidade, e especificidade para a detecção do vírus, sendo capaz de detectar e distinguir diferentes tipos de HPV em baixas concentrações. Desta forma, é possível perceber a viabilidade de se utilizar o PTAA como filme para a imobilização da sonda de estudo e sua possível utilização como genossensor para HPV.

5. REFERÊNCIAS

Kai, C., Aimagambetova, G., Ukybassova, T., Kongrtay, K., and Azizan, A. Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer: Epidemiology, Screening, and Vaccination—Review of Current Perspectives. University School of Medicine, University Medical Center. Astana, kazakhstan. 2019.

Li, D., Wen, Y., Xu, J., He, H., & Liu, M. An Amperimetric Biosensor Based On Covalent Immobilization Of Ascorbate Oxidase On Biocompatible And Low-Toxic Poly(Thiophene-3-Acetic Acid) Matrix. Jiangxi Agricultural University, Nanchang, China. 2012.

Mahmoodi, P., Rezayi, M., Rasoulii, E., Avan, A., Gholami, M., Ghayour, M., Karimi, E and Alias, Y. Early-stage cervical cancer diagnosis based on an ultra-sensitive electrochemical DNA nanobiosensor for HPV-18 detection in real samples. Medical Toxicology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. 2020.

Peng, H., Zhang, L., Spires, J., Soeller, C., Sejdic, T. Synthesis of a functionalized polythiophene as an active substrate for a label-free electrochemical genosensor. , The University of Auckland, New Zealand. 2007.

Wen, Y., Li, D., Xu, J., Wang, X. Electrosynthesis of Poly(thiophene-3-acetic Acid) Film in Ionic Liquids for Covalent Immobilization of Biologically Active Species. Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang, China. 2012.

6. AGRADECIMENTOS

O autor agradece à UFPE e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por dar suporte ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (PIBITI).



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS METAL-ORGÂNICAS PARA APLICAÇÃO NANOTERANÓSTICA

A. M. Q. FELIX¹, S. ALVES Jr.², M. D. L. de OLIVEIRA¹ e C. A. S. de ANDRADE¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Fisiologia;

² Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Departamento de Química Fundamental.

E-mail para contato: aiany.a@hotmail.com

RESUMO – A nanoteranóstica é uma área que permite o desenvolvimento de plataformas avançadas voltadas ao diagnóstico e terapia de doenças, podendo melhorar o tratamento e a qualidade de vida de pacientes, vários nanomateriais vêm sendo investigados para essa aplicação, entre os quais se destacam as estruturas metal-orgânicas (MOFs) devido a suas características e propriedades. Dessa forma este trabalho apresenta caracterizações iniciais, realizadas por técnicas de Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difração de raios-X (DRX) de uma MOF funcionalizada. Os resultados obtidos demonstraram a manutenção da rede cristalina e das propriedades típicas dos cristais, com tamanho dos cristais entre 240 e 280 nm. Pelas características obtidas, o sistema é potencialmente promissor para aplicação teranóstica, portanto o presente trabalho consiste em resultados preliminares acerca de uma MOF que será aplicada para entrega de fármacos e como sistema biossensor.

Palavras-chave: Nanomateriais. Nanomedicina. MOFs.

ABSTRACT - Nanoteranóstica is an area that allows the development of advanced platforms aimed at the diagnosis and therapy of diseases, which can improve the treatment and quality of life of patients, several nanomaterials have been investigated for this application, among which are the metal-organic (MOFs) due to their characteristics and properties. Thus, this work presents initial characterizations, performed by scanning electron microscopy (SEM) and X-ray diffraction (XRD) techniques of a functionalized MOF. The results obtained demonstrated the maintenance of the crystalline network and the typical properties of the crystals, with crystal sizes between 240 and 280 nm. Due to the characteristics obtained, the system is potentially promising for teranostic application, therefore the present work consists of preliminary results about an MOF that will be applied for drug delivery and as a biosensor system.

Keywords: Nanomaterials. Nanomedicine. MOFs.



1. INTRODUÇÃO

Os nanomateriais começaram a ser aplicados nas mais diversas áreas, devido as suas inúmeras possibilidades de uso, resultado de suas propriedades (Buzea, 2007). Mas além das perspectivas e potencialidades, surgiram questionamentos e preocupações sobre os possíveis efeitos nocivos, que poderiam ocorrer com uso de materiais em dimensões nano (Palkhiwala, 2014). Os questionamentos tornaram a aplicação desses materiais, algo constantemente revisto em busca de melhorias, especialmente no campo da saúde (Parreira, 2011; Kargozar, 2018).

Dito isto, uma nova área surge da aplicabilidade dos nanomateriais no campo da saúde, chamada de nanomedicina (Ugwu et al., 2017). Sendo essa uma subdivisão da nanotecnologia, visa a aplicação dos nanomateriais para fins médicos, abrangendo a utilização de sistemas de nanocarreamento para liberação controlada de medicamentos (Cerize, 2012; Asai, 2012) e novos métodos de diagnóstico (nanodiagnóstico), a partir da junção dessas duas aplicações emerge o ramo da nanoteranóstica, combinando terapia e diagnóstico (Ossa, 2014).

Neste contexto, surge também o interesse crescente pelas estruturas metal-orgânicas (MOFs) ou polímeros de coordenação porosa, constituídos por átomos ou aglomerados metálicos e ligantes orgânicos (James, 2003). Possuindo inúmeras possibilidades para aplicação nesta área, devido à baixa toxicidade, biocompatibilidade, e elevada estabilidade térmica e química, associadas a capacidade de ajustar sua estrutura e funcionalidade durante a síntese (Mckinlay et al., 2010).

Mediante esses aspectos favoráveis acerca das MOFs, destacam-se a ZIF-8, constituída por 2-metilimidazol e zinco tetraédrico, e a ZIF-90, constituída por 2-imidazolcarboxialdeído com zinco tetraédrico (Zou et al., 2014), estas possuem características estruturais similares, além de biocompatibilidade (Hu et al., 2016), a ZIF-90 apresenta ainda possibilidade de funcionalização, devido aos seus grupamentos aldeído livres que podem ligar-se covalentemente a grupamentos amina, inclusive de proteínas, sem interferências na sua estrutura (Wang et al., 2009).

Levando em consideração todos esses aspectos, um sistema Mix-ZIF, denominado ZIF-8/ZIF-90_{5%} foi sintetizado e caracterizações preliminares foram realizadas, onde buscou-se elucidar a morfologia e estrutura do material por meio de técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difração de raios-X (DRX). O trabalho busca apresentar os resultados preliminares que evidenciam características promissoras desse material para aplicação em uma plataforma de diagnóstico e terapia.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os nanocristais foram sintetizados a partir de metodologia proposta por Tiwari (2017) e colaboradores, consistindo na preparação de duas soluções, uma por dissolução de nitrato de zinco em água, e outra por dissolução de 2-metilimidazol e 2-imidazolcarboxialdeído em metanol, modificações foram realizadas na proporção dos solutos orgânicos para obter uma estrutura com grupamentos aldeído livres e posteriormente possibilitar a funcionalização (Yaghi et al., 2003).

As soluções foram misturadas sob condição ambiente (27°C-30°C) e mantidas em agitação durante 15 minutos. Em seguida, os resíduos dos reagentes foram removidos por meio de três ciclos de lavagem com metanol e centrifugação, o produto final obtido após a secagem em estufa a vácuo foi um pó.

Em seguida foi realizada a caracterização por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para determinar a morfologia do material, utilizou-se uma fita de carbono, na qual as amostras foram aderidas e metalizadas com filme de ouro (15 nm espessura) durante 120 segundos e se procedeu com a análise em microscópio eletrônico de varredura. A análise com objetivo de

determinar as fases cristalinas e a pureza das amostras em pó foi realizada por difração de raios-x (DRX), utilizando um difratômetro com voltagem de 40 kV e corrente de 30 mA, sob temperatura ambiente, sendo os parâmetros utilizados $2\theta = 5 - 50^\circ$; comprimento de onda igual a $1,5406 \text{ \AA}$ e velocidade de 2 min^{-1} .

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para selecionar o melhor sistema, diferentes sínteses foram realizadas e o material obtido passou por algumas caracterizações, dessa forma ficou estabelecido que a melhor proporção do reagente orgânico 2-imidazolcarboxialdeído na estrutura seria de 5% (0,2M), o material foi então submetido a caracterizações preliminares, e os cristais produzidos foram nomeados como ZIF-8/ZIF-90_{5%}, cabe destacar que outras caracterizações ainda estão em andamento.

Em materiais cristalinos a técnica de difração de raios X é fundamental para caracterização, pois permite elucidar as estruturas, nestes materiais espera-se que as ordens estruturais sejam relativamente altas e os planos de difração estejam bem definidos (Iwashita, 2016). Na Figura 1, o difratograma evidenciou a pureza e a estrutura dos cristais obtidos, devido a presença dos picos de difração bem definidos, indicando alta cristalinidade.

Nesse difratograma, percebe-se que em todas as amostras, não houve a presença de picos de difração adicionais, indicando a manutenção da fase cristalina e a obtenção de uma fase estável do material, mesmo com adição de 5% do 2-imidazolcarboxialdeído na estrutura da ZIF-8, ainda assim mais caracterizações que evidenciem a composição serão realizadas por técnicas espectroscópicas.

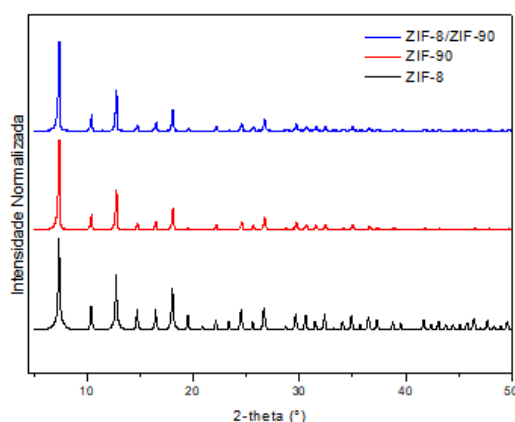


Figura 1 - Espectros de DRX obtidos a partir dos cristais sintetizados.

A morfologia das nanopartículas de ZIF-8 e ZIF-8/ZIF-90_{5%} foram observadas usando microscopia eletrônica de varredura, conforme apresentado na Figura 2. Os cristais se apresentaram com morfologia dodecaédrica bem definida e tamanho nanométrico, compatível com a literatura (SCHEIJN, 2014; LIN, 2015).

Como demonstrado pela distribuição do tamanho médio dos cristais, em relação as partículas da ZIF-8, com tamanho entre 300-350 nm, houve uma diminuição neste tamanho médio após a adição do 2-imidazolcarboxialdeído a estrutura, passando a ter entre 240-280nm. Estes valores se encontram dentro dos valores experimentais para o tamanho médio desses cristais, que segundo a literatura está entre 200-400 nm (JIAN, 2014).

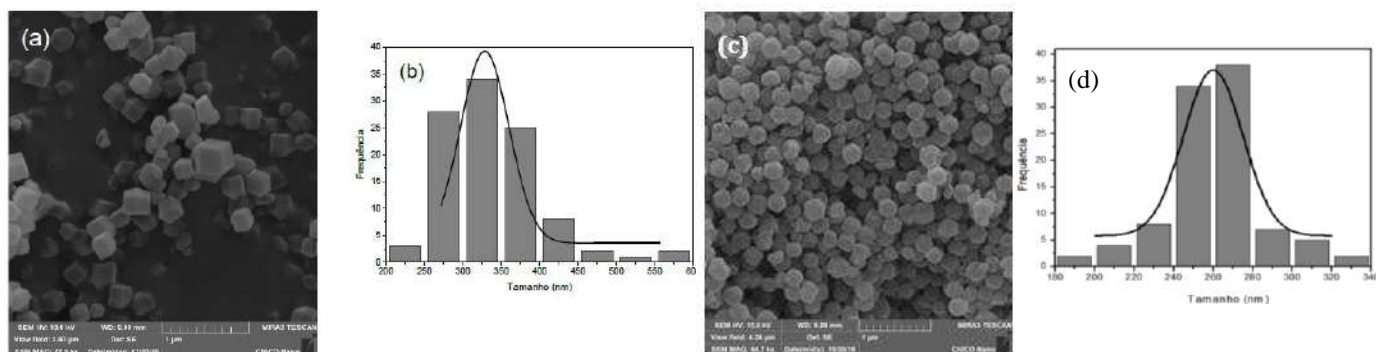


Figura 2 - Imagens de MEV dos cristais (a) ZIF-8, (c) ZIF-8/ZIF-90_{5%} e distribuições do tamanho de partícula para (b) ZIF-8 e (d) ZIF-8/ZIF-90_{5%}.

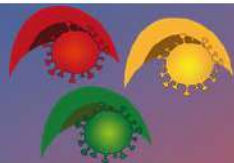
4. CONCLUSÃO

O sistema obtido apresenta características estruturais e químicas que o tornam promissor para aplicações teranósticas, é possível observar pelas técnicas utilizadas que foram formados cristais com homogeneidade estrutural e dimensional, porém estes são apenas aspectos preliminares e outras caracterizações estão em andamento.

A modificação feita nas redes tridimensionais da ZIF-8, pela utilização do reagente orgânico da ZIF-90, permitirá sua funcionalização e posterior ligação a proteínas e superfícies de eletrodos para utilização em plataformas diagnósticas, visando diagnósticos rápidos e de baixo custo, sua ação terapêutica deverá permitir a manutenção da taxa de liberação dos fármacos adsorvidos a sua estrutura, por um tempo mais prolongado com administração única. Os resultados obtidos inicialmente sustentam a sua aplicação nestas duas vertentes, com demais caracterizações estruturais, assim como caracterizações eletroquímicas se encontrando em andamento.

5. REFERÊNCIAS

- ASAI, T. Nanoparticle-Mediated Delivery of Anticancer Agents to Tumor Angiogenic Vessels. Department of Medical Biochemistry (Graduate Division of Pharmaceutical Sciences) – University of Shizuoka. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 35, p. 1855-1861, 2012.
- BUZEA, C.; PACHECO, I. I.; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, v. 2, p. 1934-8630, 2007.
- CERIZE, N. N. P. *Estudos de sistemas nanocarreadores para o ácido 5 aminolevulínico com aplicação na terapia fotodinâmica*. Tese de Doutorado (Faculdade de Ciências Farmacêuticas) – USP, Ribeirão Preto – SP, p. 48, 2012.
- HU, X. et al. One-step synthesis of nanostructured mesoporous ZIF-8/silica composites. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 219, p. 311-316, 2016.
- IWASHITA, N. *X-ray Powder Diffraction*. In: *Materials Science and Engineering of Carbon: Characterization*. 1 ed. Japan, p. 7-25, 2016.
- JAMES, S.L. Metal-organic frameworks. *Chem. Soc. Ver.*, v. 32, p. 276-288, 2003.

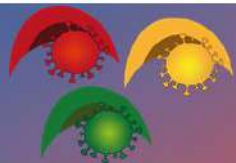


- JIAN, M. et al. Adsorptive removal of arsenic from aqueous solution by zeolitic imidazolate framework – 8 (ZIF-8) nanoparticles. *Colloids and Surfaces*, v. 465, p. 67-76, 2014.
- KARGOZARA, S.; MOZAFARI, M. Nanotechnology and Nanomedicine: Start small, think big. *Materials Today: Proceedings*, v. 5, p. 15492-15500, 2018.
- LIN, Y.; WANG, C.; PAN, Y.; XIANG, L.; LIU, Y. Preparation of Y³⁺- and La³⁺-doped ZIF-8 crystals and the fluorescence sensing of amines. *Chem. Lett.*, v. 44, p. 887-889, 2015.
- MCKINLAY C. et al. BioMOFs: Metal–Organic Frameworks for Biological and Medical Application. *Angew. Chem. Int. Ed.*, v. 49, p. 6260-6266, 2010.
- OSSA, D. *Quality Aspects of Nano-Based Medicines SME: Workshop: Focus on Quality for Medicines Containing Chemical Entities London*. European Medicines Agency, London, 2014.
- PALKHIWALA, S.; BAKSHI, S.R. Engineered nanoparticles: Revisiting safety concerns in light of ethno medicine. *Ayu Journal*, v. 35, p. 237-42, 2014.
- PARREIRA, D. B.; EUGÊNIO, J. Nanopartículas para aplicação oncológica. *INPI*, 2011.
- SCHEJN, A. et al. Controlling ZIF-8 nano- and microcrystal formation and reactivity through zinc salt variations. *Cryst. Eng. Comm.*, v. 16, p. 4493, 2014.
- TIWARI, A.; SINGH, A.; GARG, N. et al. Curcumin encapsulated zeolitic imidazolate frameworks as stimuli responsive drug delivery system and their interaction with biomimetic environment. *Sci. Rep.*, v. 7, p. 1-11, 2017.
- UGWU, M. C.; AMADI, N. C.; OKOLO, C. R.; DADA, M. O.; EGEJURU, C. C.; OGBODO, E. C.; IKE, O. C. Nanomedicine: application of nanotechnology. *European Journal of Biomedical AND Pharmaceutical sciences*, v. 4, p. 136-143, 2017.
- WANG, X.-S. et al. A Large-Surface-Area Boracite-Network-Topology Porous MOF Constructed from a Conjugated Ligand Exhibiting a High Hydrogen Uptake Capacity. *Inorg. Chem.*, v. 48, p. 7519-7521, 2009.
- YAGHI, O. M.; O'KEEFFE, M.; OCKWIG, N.W.; CHAE, H.K.; EDDAOUDI, M.; KIM, J. Reticular synthesis and the design of new materials. *Nature*, v. 423, p. 705-714, 2003.
- ZOU, F.; HU, X.; LI, Z.; QIE, L.; HU, C.; ZENG, R.; JIANG, Y.; HUANG, Y. MOF-Derived Porous ZnO/ZnFe₂O₄/C Octahedra with Hollow Interiors for High-Rate Lithium-Ion Batteries. *Advanced Materials*, v.26, n.38, p. 6622-6628, 2014.

6. AGRADECIMENTOS

Felix, A.M.Q. agradece a FACEPE pela bolsa concedida.

Andrade, C.A.S e Oliveira, M.D.L. agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

EXTRAÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE TERAPÊUTICO A PARTIR DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

J.C. SILVA¹, L.H.S. LINO¹, V.M. OLIVEIRA¹ e A.L.F. PORTO¹

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, DMFA, Laboratório de Tecnologia de Produtos Bioativos, LABTECBIO.

E-mail para contato: vagne_melo@hotmail.com

RESUMO – Enzimas destinadas para aplicações biomédicas e farmacêuticas precisam passar por rigorosos processos de purificação. Muitas vezes a fonte da matéria-prima acaba elevando o custo da produção e isso reflete diretamente no valor comercial do produto. Dessa forma, fontes alternativas que possam baratear os custos são altamente desejáveis. Uma alternativa atual é a utilização de resíduos da indústria pesqueira por serem fontes ricas em biomoléculas proteicas. Assim, este trabalho objetivou purificar proteases com atividades colagenolíticas de vísceras intestinais de tambaqui (*Colossoma macropomum*), usando o sistema de partição trifásica. Para tanto, as vísceras intestinais foram maceradas, homogeneizadas, aquecidas e centrifugadas para produção do extrato enzimático, que foi submetido a diferentes concentrações de solvente (*t*-butanol) a partir de um planejamento experimental. O maior fator de purificação 3,30; enquanto a maior recuperação foi de 92,42%, respectivamente. Assim, foi possível extrair e purificar proteases de interesse biomédico e terapêutico, sinalizando a possibilidade de novas investigações para definição das propriedades das proteases particionadas.

Palavras-chave: *Colossoma macropomum*, partição, separação, sistema.

ABSTRACT– Enzymes intended for biomedical and pharmaceutical applications must undergo rigorous purification processes. Often the source of the raw material ends up raising the cost of production and this directly reflects on the commercial value of the product. Thus, alternative sources that can lower costs are highly desirable. A current alternative is the use of residues from the fishing industry as they are rich sources of protein biomolecules. Thus, this work aimed to purify proteases with collagenolytic activities of intestinal viscera of tambaqui (*Colossoma macropomum*), using the three-phase partition system. For this, the intestinal viscera were macerated, homogenized, heated and centrifuged to produce the enzymatic extract, which was subjected to different concentrations of solvent (*t*-butanol) from an experimental design. The biggest purification factor 3.30; while the biggest recovery was 92.42%, respectively. Thus, it was possible to extract and purify proteases of biomedical and therapeutic interest, signaling the



possibility of further investigations to define the properties of partitioned proteases.

Keywords: Colossoma macropomum, partition, separation, system.

1. INTRODUÇÃO

A produção de peixes nativos pela piscicultura em 2018 foi de 287.910 toneladas, sendo o tambaqui (*Colossoma macropomum*) a espécie mais cultivada (Peixe BR, 2019). A grande produção é acompanhada da geração de resíduos sólidos, como vísceras internas. Essas vísceras são fontes ricas de biomoléculas protéicas, principalmente de proteases (Oliveira *et al.*, 2020). Proteases são enzimas capazes de clivar proteínas e representam um montante significativo no mercado global de enzimas (Gurumallesh *et al.*, 2019).

As proteases podem ser obtidas de inúmeras fontes (animais, vegetais e microbianas), sendo as microbianas as mais representativas (Gurumallesh *et al.*, 2019). Todavia, os custos de produção e problemas relacionados a patogenicidade dessa fontes tem despertado a atenção para fontes alternativas, como os resíduos do pescado. No segmento biomédico e terapêutico, proteases colagenolíticas têm sido amplamente empregadas em processos reparatórios (Bhagwat; Dandge, 2018).

Para utilização de resíduos aquícolas tem sido adotada uma técnica de separação em sistema de fases, o particionamento trifásico (TPP), recuperado biomoléculas de organismos aquáticos (Kuepethkaew *et al.*, 2017; Phong *et al.*, 2018). Assim, este trabalho objetivou purificar proteases com atividades colagenolíticas de vísceras intestinais de tambaqui (*Colossoma macropomum*), usando o sistema de partição trifásica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção do material biológico

Vísceras intestinais de tambaqui (*Colossoma macropomum*) foram adquiridas na Base de Pesca e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE. As vísceras foram transportadas ao Laboratório de Tecnologia de Produtos Bioativos, LABTECBIO. A espécie utilizada está registrada no Patrimônio Genético Brasileiro n°A25441A.

2.2 Preparação do extrato bruto enzimático e dosagem de proteínas totais

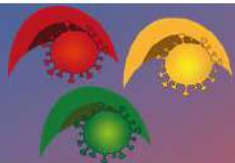
A extração de proteases colagenolíticas foi realizada de acordo com por Oliveira *et al.* (2020). A concentração de proteína total foi determinada de acordo com Smith *et al.* (1985).

2.4 Ensaio colagenolítico

As propriedades colagenolíticas foram determinadas de acordo com Oliveira *et al.* (2020), usando azocoll como substrato. A leitura da amostra foi a 520 nm.

2.5 Extração e purificação por partição trifásica (TPP)

A TPP foi realizada conforme descrito por Rawdkuen *et al.* (2012). O efeito da relação de extrato bruto/*t*-butanol (1,0: 0,5; 1,0:1,0; 1,0:1,5 e 1,0:2,0) foi avaliado, com uma concentração

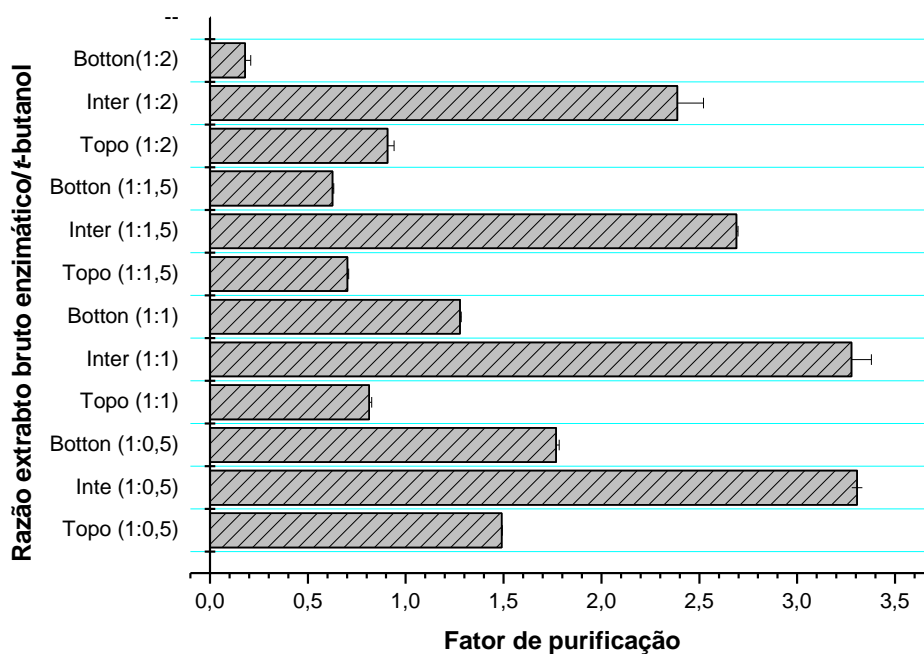


constante de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 30% (p/v).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram determinados o total de proteínas (3,57 mg/mL), a atividade proteásica (8,30 U/mL), atividade colagenolítica volumétrica (441,53 U/mL) e a específica (123,54 U/mg) do extrato bruto vísceras de tambaqui (*Colossoma macropomum*). O extrato bruto foi submetido ao particionamento trifásico. O maior fator de purificação (3,30) e recuperação (92,48%) da protease inespecífica e da protease com atividade colagenolítica foi encontrado na interfase da razão extrato bruto/*t*-butanol 1,0: 0,5, como visualizado na figura 1, corroborando com proteases extraídas de peixes pelo mesmo método (Rawdkuen *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2020).

Figura 1 – Fator de purificação das proteases de tambaqui (*Colossoma macropomum*) particionadas pelo TPP



4. CONCLUSÃO

A partição se mostrou eficaz, favorecendo o aproveitamento dos resíduos. As proteases purificadas são desejadas pelo mercado terapêutico, sinalizando a possibilidade de vísceras de tambaqui servir de matéria-prima biotecnológica.

5. REFERÊNCIAS

BHAGWAT, P.; DANDGE, P. Collagen and collagenolytic proteases: A review. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, v.15, p. 43-55, 2018.



GURUMALLESH, P.; ALAGU, K.; RAMAKRISHNAN, B.; MUTHUSAMY, S. A systematic reconsideration on proteases. *Int. J. Biol. Macromol.*, v.128, p. 254-256, 2019.

KUEPETHKAEW, S.; SANGKHARAK, K.; BENJAKUL, S.; KLOMKLAO, S. Use of TPP and ATPS for partitioning and recovery of lipase from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hepatopancreas. *J. Food Sci. Technol.*, v. 54, p. 3880–3891, 2017.

OLIVEIRA, V.M.; CUNHA, M.N.C.; ASSIS, C.R.D.; SILVA, J.M.; NASCIMENTO, T.P.; SANTOS, J.F.; DUARTE, C.A.L.; MARQUES, D.A.V.; BEZERRA, R.S.; PORTO, A.L.F. Separation and partial purification of collagenolytic protease from peacock bass (*Cichla ocellaris*) using different protocol: Precipitation and partitioning approaches. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, p. 101509, 2020.

PEIXE BR - Associação Brasileira da Piscicultura. *Anuário 2019 Peixe BR da Piscicultura*. 148p. Disponível em: <<https://www.peixebr.com.br/anuario-peixe-br-da-piscicultura-2019/>>. Acesso em: 23 maio. 2020.

PHONG, W.N.; SHOW, P.L.; CHOW, Y.H.; LING, T.C. Recovery of biotechnological products using aqueous two phase systems. *J. Biosci. Bioeng.*, v. 16, p. 273–281, 2018.

RAWDKUEN, S.; VANABUN, A.; BENJAKUL, S. Recovery of proteases from the viscera of farmed giant catfish (*Pangasianodon gigas*) by three-phase partitioning. *Process Biochem.*, v. 47, n.12, 2566–2569, 2012.

SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, v.150, n. 1, p. 76–85, 1985.

6. AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – código 88887.175810/2018-00. Os autores agradecem também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Universidade Federal Rural de Pernambuco pela bolsa de PIBIC de Nilson Silva.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

GENOSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE OURO

S. D. E. T. GONÇALVES¹, G. S. SANTOS^{1,2}, F. L. MELO³, C. A. S. ANDRADE^{1,2}, M. D. L. OLIVEIRA^{1,2}

¹Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco.

²Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco.

³Laboratório de Doenças Transmissíveis, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

e-mail: sthefany.dpetg@gmail.com

RESUMO - Introdução: A Leishmaniose é uma doença de caráter zoonótico que acomete o homem e outras espécies de animais, transmitida por protozoários do gênero *Leishmania* sp. É uma doença crônica e sistêmica que quando não tratada pode evoluir para óbito em mais de 90% dos casos. Assim, o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos para esta doença se torna fundamental. **Objetivos:** Modificar o eletrodo de ouro através da adsorção química de MPTS e nanopartículas de ouro (AuNPs) modificadas com MBA para realização da imobilização de uma sonda reconhecadora do genoma de *Leishmania* sp. **Métodos:** Caracterização através da técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) realizada numa faixa de frequência de 100 mHz a 100 kHz, numa amplitude de 10 mV, utilizando-se o ferro-ferricianeto de potássio a 10 mM como sonda redox. **Resultados:** A EIE revelou que a camada automontada composta por MPTS foi adsorvida adequadamente na superfície do eletrodo, sendo observado um aumento na impedância total do sistema refletido pelo aumento de seu diâmetro. A otimização do sistema, devido a adição de AuNPs, o tornou mais condutor, e um novo aumento do diâmetro após a adição da Sonda_L, provou que o sistema MPTS-AuNPs-Sonda_L foi obtido. Posteriormente, o sistema foi capaz de detectar *Leishmania* sp. em amostras contaminadas. **Conclusão:** Diante disto, o estudo provou que a plataforma é altamente indicada como método de detecção para *Leishmania* sp., apresentando baixo custo, sensibilidade e especificidade.

Palavras-chave: biossensor; leishmaniose; impedância eletroquímica; eletroquímica.

ABSTRACT - Introduction: Leishmaniasis is a zoonotic disease that affects humans and other animal species transmitted by protozoa of the genus *Leishmania* sp. It is a chronic and systemic disease that, when untreated, can progress to death in more than 90% of cases. Thus, the development of new diagnostic methods for this disease is essential. **Objectives:** Development of genosensor based on self-assembled monolayers of MPTS associated to gold nanoparticles (AuNPs) modified with MBA. After, a *Leishmania* sp. probe (Probe_L) was immobilized on the nanoparticles surface. **Methods:** The experiments were performed by using electrochemical impedance spectroscopy (EIE) technique in a frequency range of 100 mHz to 100 kHz and applied potential of 10 mV. 10mM potassium ferricyanide was used as a redox probe. **Results:** EIE



revealed that the self-assembled layer composed of MPTS was properly adsorbed on the electrode surface, with an increase in the total impedance of the system being reflected by the increase in its diameter. AuNPs were immobilized aiming the optimization of the system, resulting in a more conductive system. A further increase in diameter was observed after the addition of ProbeL. The electrochemical response showed that MPTS-AuNPs-SondaL system was successfully obtained. The system was able to detect *Leishmania sp.* from contaminated samples. **Conclusion:** The platform shows excellent sensitivity, specificity, and therefore was effective to recognize *Leishmania sp.*

Keywords: biosensor; leishmaniasis; electrochemical impedance; gold nanoparticle.

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose é uma doença visceral, cutânea e mucosa, devido à infecção pela espécie *Leishmania* (Neves, 2005). Sua forma cutânea, sendo a mais comum, é caracterizada por lesões cutâneas na pele e é transmitida através dos complexos *L. mexicana* e *L. braziliensis* (Berman, 1997).

Os exames parasitológicos são considerados métodos de referência no diagnóstico da LV, ainda que requeiram procedimentos invasivos e a necessidade de profissionais experientes. São ainda procedimentos que demandam trabalho intensivo e que não apresenta sensibilidade ideal. A confirmação de LV pode ser feita pela demonstração direta em esfregaços ou pelo cultivo do parasito obtido de baço, fígado, medula óssea ou linfonodos (Reis et al, 2009). A especificidade dos métodos parasitológicos é de cerca de 100%, mas a sensibilidade é bastante variável, pois a distribuição dos parasitas não é homogênea no tecido e varia de 95 a 98% quando se utiliza o aspirado de baço, de 76 a 91% para o de fígado, de 52 a 89% para o de medula óssea e 52 a 69% para o de linfonodos (Gontijo et al, 2004).

O diagnóstico padrão ouro atualmente, é feito a partir da escarificação, biópsia, imprint e punção aspirativa nas bordas da lesão, porém são métodos que não apresentam uma alta sensibilidade, apesar de serem baratos (Rithinger et al., 2007).

No entanto, os testes supracitados apresentam como principal limitação a reação cruzada com outras parasitoses e baixa sensibilidade na detecção de casos assintomáticos. Dessa forma o desenvolvimento de novas ferramentas de detecção da *L. chagasi* de forma rápida e sensível é de extrema importância, destacando-se o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos impedimétricos e voltamétricos (Mohan et al, 2011).

Biossensores são pequenos dispositivos que utilizam componentes biológicos como elementos de reconhecimento de outros representantes biológicos, como vírus, bactérias, fungos ou mesmo células cancerígenas. Para construção de biossensores eletroquímicos, é de extrema importância imobilizar os elementos de reconhecimento sobre o eletrodo para fornecer os sítios de reconhecimento molecular, associado a isso vem sendo utilizados nanomateriais para facilitar a detecção do analito de interesse com sensibilidade (Mugasa et. al, 2010).

Os métodos de diagnóstico baseados em eletroquímica, têm chamado bastante atenção, devido a sua alta sensibilidade e especificidade (Buso et al., 2000). A utilização de camadas automontadas em um eletrodo se mostra bastante eficaz para este tipo de diagnóstico. A adição de nanopartículas de ouro, a fim de imobilizar sondas de DNA, apresenta uma grande importância



para a montagem, visto que, seu caráter altamente condutor, permite amplificar a resposta da plataforma.

Neste estudo, foi realizada a montagem de uma plataforma baseada no conjunto de MPTS e solução de EDC/NHS, em uma superfície de ouro com posterior adição de AuNPs modificadas com MBA, demonstrando alta especificidade e sensibilidade para a detecção de sonda de DNA_{Leishmania}, através da análise da impedância eletroquímica pelo diagrama de Nyquist.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

A sonda e o genoma de *Leishmania* sp. foram cedidos pelo Dr. Fábio Lopes de Melo, obtidas no Laboratório de Doenças transmissíveis – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. As amostras de pacientes também foram cedidas pelo Laboratório de Doenças Transmissíveis, o qual possui as atividades de seu laboratório devidamente autorizadas pelo comitê de ética da UFPE.

Modificação do eletrodo com MPTS, EDC/NHS e nanopartículas de ouro

Inicialmente, o eletrodo foi polido com lixa e água desionizada e colocado imerso em água sanitária por 10 minutos. Em seguida, da solução de MPTS, que foi preparada através da mistura com água destilada na proporção de 0,5:100 e 600 μ L de HCl 0,1M, onde foi agitada até obter uma solução homogênea, foi adicionado 8 μ L na superfície do eletrodo e incubado por cerca de 10 minutos.

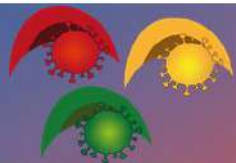
As nanopartículas foram sintetizadas a partir da diluição de 1 mL de HAuCl₄ em 99 mL de água, seguida da adição de 4 mL de 1% de citrato de sódio e agitação magnética em 60°C por 30 minutos. As AuNPs foram então diluídas em água e depois, foi adicionado 0,2 mL de 10⁻³ M de MBA, sendo mantido por 2 horas na agitação magnética à temperatura ambiente (Luna et al., 2015). Após a adição de 1 μ L de EDC e 1 μ L de NHS e encubação por 5 minutos, foi adicionado mais 5 μ L de AuNPs, mantendo o eletrodo incubado durante 30 minutos.

Imobilização da sonda de DNA de Leishmania sp. sobre eletrodo modificado com AuNPs

Após a adição das nanopartículas de ouro, 2 μ L de sonda de DNA_{Leishmania} foram adicionados ao eletrodo e incubado por 30 minutos. Em seguida, o eletrodo modificado com DNA foi enxaguado com água destilada para remover o sDNA_{Leishmania} fracamente adsorvido. Posteriormente, os sítios ativos remanescentes foram bloqueados com BSA (10 μ g/mL). O eletrodo obtido, sDNA-AuNPs-MPTS, foi então, exposto ao material genômico extraído do soro de pacientes com leishmaniose.

Medidas de impedância eletroquímica e simulação do circuito equivalente

Os experimentos de EIE foram realizados em um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT128N numa célula convencional de três eletrodos. Os eletrodos de trabalho (ET) utilizado foi o modificado com ouro, o eletrodo de platina funciona como contra eletrodo e o de referência, apresenta o Ag/AgCl saturado com KCl. As medidas de impedância eletroquímica serão realizadas numa faixa de frequência entre 100 mHz a 100 KHz com um potencial de amplitude alternada de 10 mV.



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A EIE é uma ferramenta que possibilita a avaliação da interface eletrodo-solução e nos fornece informações acerca das mudanças que ocorrem na dupla camada elétrica da superfície. Na avaliação do eletrodo limpo, o diagrama de Nyquist se mostrou limitado por difusão e, ao adicionar a camada de MPTS, houve um aumento do semicírculo, comprovando que foi adsorvido no eletrodo de trabalho. Após a adição do sistema ligante EDC/NHS, houve uma diminuição do semicírculo, caracterizado pelo aumento da condutividade do sistema. O grupamento tiol do MPTS que é exposto, é importante para a posterior adsorção da nanopartícula de ouro que, ao ser adicionada, provoca um aumento do semicírculo. Esta resposta indica que a ancoragem de AuNPs sobre o MPTS foi efetiva, aumentando a superfície eletroativa do eletrodo.

Continuando a montagem da plataforma, a adição da sDNA_{Leishmania} provocou um outro aumento no diâmetro do semicírculo no gráfico em decorrência à repulsão eletrostática entre o par redox e a sonda de DNA na superfície do eletrodo. Em seguida, os sítios restantes foram preenchidos através da BSA, sendo evidenciado um discreto aumento do semicírculo. Foi formada, então, a plataforma sensora MPTS_EDC/NHS_AuNPs_BSA para detecção da Leishmaniose, exposta na figura 1.

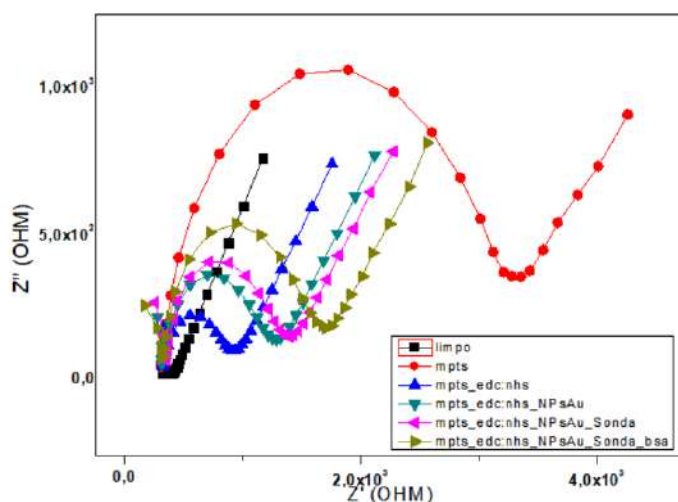


Figura 1. Análise impedimétrica das etapas de montagem do genossensor.

A avaliação da bioatividade do sistema sensor permitiu evidenciar a capacidade de reconhecimento específico às sequências complementares da amostra-teste. Desta forma, na figura 2, foi avaliada a bioatividade da plataforma, adicionando DNA complementar, sendo observado um aumento gradativo da impedância total do sistema em diferentes concentrações do analito avaliado, indicando a ocorrência de hibridização e reconhecimento. O sistema foi capaz de responder às diferentes concentrações do genoma da *Leishmania* sp., sendo capaz de responder ao analito em até 1 ng/mL⁻¹.

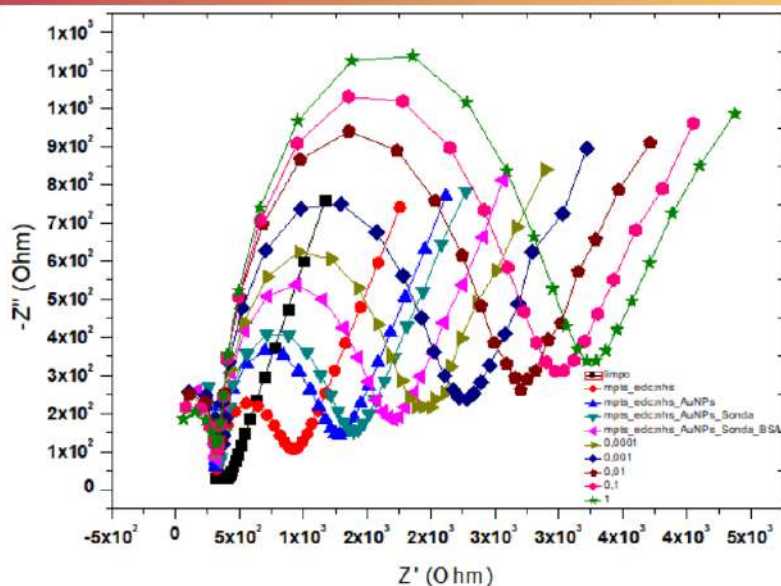
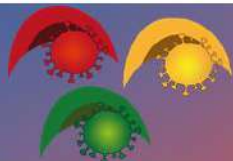


Figura 2. Análise impedimétrica do genossensor frente às diferentes concentrações do genoma de *Leishmania sp.*

Ao expor o sistema à amostra genômica de *S. masoni* foi possível observar que o sensor não foi responsivo, processo demonstrado pela baixa resposta do diâmetro do semicírculo quando comparado com a resposta da plataforma sensora, exibido na figura 3.

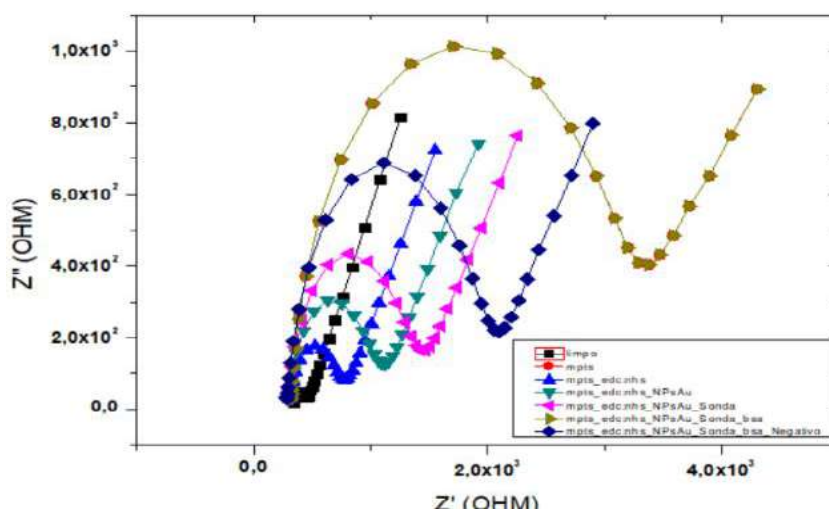


Figura 3. Análise impedimétrica do sistema sensor frente à amostra de *S. masoni*.

Em adição, a partir da avaliação do sistema sensor frente às amostras reais de pacientes infectados, foi possível observar um aumento do diâmetro do semicírculo, comprovando a eficiência do sistema na detecção de *L. chagasi* em amostras infectadas, como mostra a figura 4.

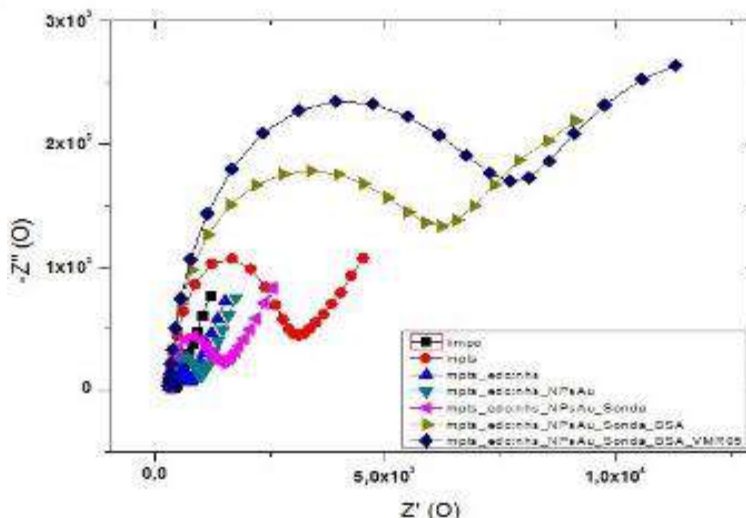
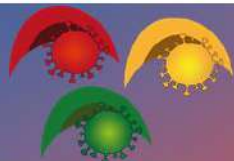


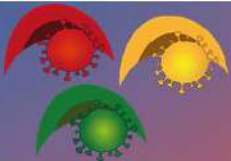
Figura 4. Análise impedimétrica do genossensor em relação a amostra de soro infectado.

4. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que a plataforma manteve e estabeleceu um processo de hibridização específica frente ao genoma e amostras de soro contaminadas com *Leishmania sp.* A plataforma desenvolvida é indicada como método de detecção para *Leishmania sp.*, apresentando baixo custo, sensibilidade e especificidade.

5. REFERÊNCIAS

- BERMAN, J. D. 1997. Human Leishmaniasis: Clinical, Diagnostic, and Chemotherapeutic Developments in the Last 10 Years. *Clinical Infectious Diseases* 24: 684–703.
- BUSO, A., et al. 2000. Electrochemical removal of tannins from aqueous solutions. *Industrial & engineering chemistry research* 39: 494-499.
- GONTIJO, C.M.F., MELO, M.N. 2004. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospect, *Rev. Bras. Epidemiol.* 7:338-349.
- LUNA, D. M. N., AVELINO, K. Y. P. S., CORDEIRO, M. T., ANDRADE, C. A. S., & OLIVEIRA, M. D. L. 2015. Electrochemical immunosensor for dengue virus serotypes based on 4-mercaptobenzoic acid modified gold nanoparticles on self-assembled cysteine monolayers. *Sensors and Actuators B: Chemical* 220:565–572.
- MOHAN, S., SRIVASTAVA, P., MAHESHWARI, S.N., SUNDAR, S., PRAKASH, R. 2011. Nano-structured nickel oxide based DNA biosensor for detection of visceral leishmaniasis (Kala-azar). *Analyst* 136:2845-2851.
- MUGASA, C.M., LAURENT, G.J., SCHOONE, F.L., BASIYE, A.A., SAAD, S. 2010. Schallig, Simplified molecular detection of *Leishmania* parasites in various clinical samples from patients with leishmaniasis. *Parasite Vector* 3:1-6.
- NEVES, D. P. *Parasitologia Humana*. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
- REIS, A.B., MARTINS-FILHO, O.A., TEXEIRA-CARVALHO, A., GIUNCHETTI, R.C., CARNEIRO, C.M., MAYRINK, W., TAFURI, W.L., CORREA-OLIVEIRA, R. 2009. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128:87-95.



REITHINGER, R., DUJARDIN, J.-C., LOUZIR, H., Pirmez, C., ALEXANDER, B., & BROOKER, S. 2007. Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*. 7:581–596.
SANTOS, G. S.; CALDAS, R. G. S. C.; ANDRADE, C. A. S.; OLIVEIRA, M. D. L. Método para Detecção Eletroquímica do Genoma do Verme de *Schistosoma mansoni*, Utilizando Plataforma de Ouro Eletro-depositado. 2018, Brasil.

6. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, ao Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, vinculado ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco e ao Laboratório de Doenças Transmissíveis – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

APLICAÇÃO DA NANOTECNOLOGIA EM BIOSSENSORES PARA DETECÇÃO DE AFLATOXINA B1

B. S. GUERRA¹, B. M. CERQUEIRA², C.A.S. de ANDRADE² e M.D.L. de OLIVEIRA²

¹ Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica – UFPE, Recife- PE.

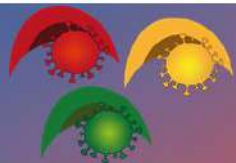
² Departamento de Bioquímica- Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados- UFPE, Recife- PE.

E-mail para contato: guerrabsantiago@gmail.com

RESUMO – *A ocorrência de micotoxicoses no mundo é bastante alta, principalmente relacionada a contaminação através de alimentos, e a Aflatoxina B1 é a micotoxina mais tóxica dentro de sua família para humanos e animais. Atualmente, existem vários métodos que realizam a detecção das mesmas, contudo demanda de insumos com preços elevados e pessoas altamente treinadas. Os biossensores apresentam-se como uma ótima ferramenta analítica, e necessitam de um elemento biológico e um transdutor para detecção de substâncias de interesse, além de seu baixo custo e potencial para miniaturização. A associação da eletroquímica com a nanotecnologia vem permitindo a obtenção de sistema cada vez mais sensíveis e livres de ruído. O óxido de zinco é um dos metais inorgânicos mais conhecidos e aplicados em pesquisas no desenvolvimento de biossensores devido às suas características como biocompatibilidade e condutividade, deste modo será apresentado uma visão geral do desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos para detecção precoce de Aflatoxina em alimentos, de maneira que os biossensores apresentam-se como uma abordagem inovadora de baixo custo, sensível, e específico para investigações bioquímicas e analíticas.*

Palavras- chave: Micotoxicoses, Imunossensores, Técnicas eletroquímicas.

ABSTRACT- *The occurrence of mycotoxicoses in the world is quite high, mainly related to contamination through food, and Aflatoxin B1 is the most toxic mycotoxin within its family for humans and animals. Currently, there are several methods that perform their detection, however demand for inputs with high prices and highly trained people. Biosensors are a great analytical tool, and they need a biological element and a transducer to detect substances of interest, in addition to their low cost and potential for miniaturization. The association of electrochemistry with nanotechnology has been making it possible to obtain an increasingly sensitive and noise-free system. Zinc oxide is one of the most well-known inorganic metals used in research in the development of biosensors due to its characteristics such as biocompatibility and conductivity. In this way, an overview of the development of electrochemical immunosensors for early detection of*



Aflatoxin in food will be presented. that biosensors present themselves as an innovative, low-cost, sensitive, and specific approach for biochemical and analytical investigations.

Keywords: Mycotoxicosis, Immunosensors, Electrochemical techniques.

1. INTRODUÇÃO

Segundo Bennett e colaboradores as micotoxinas (MTX) são compostos de baixo peso molecular, que são produzidas por fungos filamentosos. Estima-se que existe mais de 300 compostos conhecidos como MTX, porém uma pequena quantidade apresenta riscos significativos à contaminação na alimentação humana e animal (Bennett; Klich, 2003), desenvolvem-se em condições de transporte, campo ou até no decorrer do tempo de estocagem de alimentos (Fink-Gremmels, 2008). Uma vez presentes no organismo, as micotoxinas estimulam a inibição de síntese de algumas proteínas, lipídios, ácidos nucleicos entre outros, induzindo ao estresse oxidativo nas células como também a inibição do ciclo celular, desencadeando a micotoxicose (Creppy *et. al.*, 2004). Os principais gêneros fúngicos que produzem as MTX são: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (Ashiq, 2014).

Segundo Fink- Gremmels, as aflatoxinas (AFTs) são consideradas potentes agentes cancerígenos (Fink-Gremmels, 2008), teratogênicos, mutagênicos e imunossupressor. É frequentemente encontrada em rações e alimentos e tem sido associada a algumas doenças em humanos em todo o mundo. As AFTs exibem uma grande família composta por vários gêneros incluindo B1, B2, G1 e G2, porém outros três tipos de micotoxinas pertencentes a família AFTs, foram detectados: M1, M2 e B1 (Marin *et. al.*, 2013), que contaminam principalmente milho, amendoim, cereais antes ou pós colheita, tendo como temperatura ideal para replicação e desenvolvimento 24 a 35° C (Paniel *et. al.* , 2010).

A aflatoxina B1 é que apresenta maior toxicidade quando comparada a todas as outras de sua família exibindo efeitos hepatotóxicos e carcinogênicos, além disto elas são bastantes estáveis em temperaturas altas configurada a partir de sua organização química como mostrado na figura 1, podendo portanto resistir a processos de cozimento (Binder *et.al.*, 2007). Para que exista um tratamento mais rápido e eficaz contra as micotoxicoses, como também identificar as fontes de contaminação deve-se utilizar de ensaios que apresentem maior seletividade e sensibilidade, e capacidade de miniaturização como no caso dos biossensores (Magliulo *et. al.*, 2005).

Os biossensores apresentam respostas mensuráveis para fins diagnósticos e/ ou terapêuticos fundamentado em materiais de origem biológica, quando a interação com o seu transdutor. Os crescentes estudos relacionados aos biossensores iniciaram-se com a comercialização dos monitores de glicose e outros que visavam a redução de custos para os pacientes (SHANMUGAM *et. al.*, 2017). O desenvolvimento de dispositivos sensores apresenta como premissa a viabilidade de amplificar as detecções de micotoxinas, representando assim uma tecnologia que pode ser empregada nos mais variados setores da indústria alimentícia configurando uma melhora relacionada aos processos de produção, armazenamento, proteção e segurança dos alimentos; sendo mecanismos sensíveis, simples, que realizam uma rápida análise reprodutiva, baixo custo, e com a possibilidade de miniaturização (Oliveira *et. al.*, 2019).

As pesquisas voltadas para síntese, desenvolvimento e utilização de nanopartículas vem crescendo devido às suas ótimas propriedades físico-químicas: escala nanométrica, condutividade elétrica elevada e biocompatibilidade. As nanopartículas de óxido de zinco são um importante nanomaterial multifuncional utilizado em vários métodos de detecção analítica como em



biossensores pizoelétricos, eletroquímicos e ópticos. Os biossensores eletroquímicos à base de ZnO são efetivamente usados para detectar uma grande variedade de analitos, como glicose, colesterol, DNA e dopamina. Em adição, ZnO tem sido reconhecido como um bom candidato para aplicações de biossensores devido ao seu alto ponto isoelétrico (PI), custo-benefício, não toxicidade e estabilidade química. Um alto valor de PI permite um melhor processo de absorção de enzimas, DNA e proteínas por interações eletrostáticas (PORTO et. al., 2018).

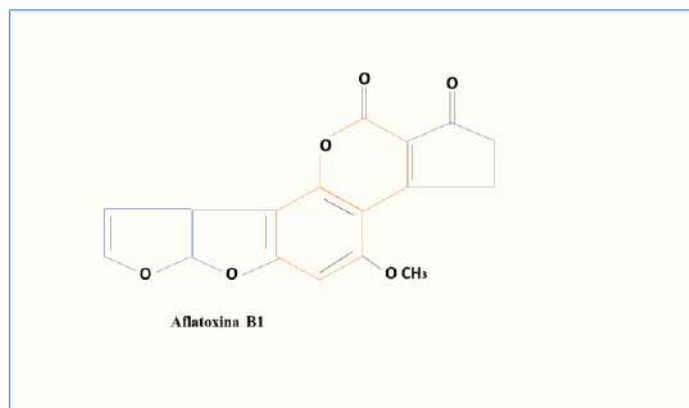


Figura 1: Estrutura química da Aflatoxina B1.

O objetivo deste trabalho é descrever as técnicas eletroquímicas existentes na literatura para desenvolvimento de imunossensores como também a sua aplicação em alimentos para detecção de AFB1.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Esta revisão trata-se de uma revisão sistemática do tipo narrativa utilizando as bases de dados Scielo, Pubmed, Plataforma Sucupira e Google Acadêmico. Este trabalho teve como critérios de inclusão: artigos nas línguas inglesa e portuguesa e desta forma foram obtidos 50 artigos, destes 26 foram escolhidos para construção desta revisão por apresentar magnitude temática. Foram excluídos do estudo artigos incompletos que interpelaram outros tipos de estruturas temáticas sobre as biossensores e sua associação com micotoxinas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os biossensores apresentam respostas mensuráveis para fins diagnósticos e/ou terapêuticos fundamentados em materiais de origem biológica, quanto a interação com o seu transdutor, estes buscam uma aplicação associada a nanomateriais que sirvam como sondas para a ampliação de sinal melhorando ainda mais a sensibilidade (Oliveira *et. al.*, 2019). Materiais de origem biológica ativos, como enzimas, anticorpos, ácidos nucleicos, lectinas, proteínas, dentre outros, podem ser imobilizados junto a um transdutor adequado (Hosu *et. al.*, 2018).

O desenvolvimento de elementos de reconhecimento biológico sensíveis e estáveis é uma tarefa chave para os biossensores (Wang *et.al.*,2013). A composição é fundamentada na comunicação de duas partes, ou seja, o componente biológico sendo a camada de bioreconhecimento, que irá interagir de forma específica com o analito, e o transdutor que atua convertendo o evento de interação biológica em um sinal mensurável (Oliveira *et. al.*, 2019). A avaliação eletroquímica acontece dentro de “células eletroquímicas” objeto dos biossensores,



sendo compostas por dois, três ou quatro eletrodos e uma única célula eletroquímica, porém os mais utilizados são os sistemas de três eletrodos: o eletrodo de referência, eletrodo de trabalho e um eletrodo auxiliar ou contra-eletrodo (Damos *et.al.*, 2004). Estes elementos são mantenedores da função potenciostática, e os eletrodos são ligados a um amplificador operacional, que ajustará a diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o de referência (Pacheco *et. al.*, 2013).

Os métodos baseados em imunoenaios são ferramentas muito importantes para investigação das AFTs, o ensaio imunoenzimático ELISA, sendo mais utilizado o método sanduíche (Turner *et.al.*, 2009). Outros métodos como cromatografia líquida de espectrometria em massa (LC/MS), o LC- MS acoplado ao ELISA (SIMÃO *et.al.*, 2015), o método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (González-Osnaya *et.al.*, 2008), cromatografia em camada fina (TLC), são métodos que já são utilizados para a identificação de AFB1 (SIMÃO *et.al.*, 2015). Outros métodos também são utilizados como ferramentas de avaliação como a reação em cadeia polimerase em tempo real (RT-PCR) (Magliulo *et. al.*, 2005) e cromatografia em camada delgada (CCD) (Oliveira *et. al.*, 2019), entretanto nestas técnicas há uma demanda elevada de reagentes como também, necessita de um alto grau de pureza para as análises cromatográficas, e o alto custo de instrumentação e manutenção, (González-Osnaya *et al.*, 2008). Diante destas limitações torna-se necessário o desenvolvimento de novos dispositivos analíticos, como os biossensores, pelo fato de que fornecem especificidade, otimização e rapidez nos resultados favorecendo na garantia e controle de qualidade dos alimentos (Castillo *et. al.*, 2015).

Os resultados obtidos através dos métodos eletroanalíticos associados a eletroquímica acontecem com base no uso de sondas redox possibilitando muitas vantagens, como sensibilidade e baixo limite de detecção (Bret *et al.*, 1998). Neste contexto, destacam-se as técnicas de voltametria cíclica (VC) e a Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS) (Damos, 2004).

A técnica de VC depende dos fenômenos ocorridos entre na superfície do eletrodo de trabalho. Em adição, se caracteriza por ser dinâmica porque trabalha a partir de uma corrente elétrica aplicada controlada por um potencial, de modo que, os resultados são obtidos mediante a medição da magnitude da corrente elétrica, existente entre o eletrodo auxiliar e o de trabalho, expondo de informações sobre os processos redox, cinética das reações de transferência de elétrons e reações químicas desenvolvidas a partir do analito (Wang *et. al.*, 2013).

Na EIS é utilizado um potencial alternado, que possibilita o monitoramento do processo de construção dos biossensores e pode ser utilizada para investigação do processo de reconhecimento biológico. A partir do uso da EIS é possível obter a determinação da transferência de carga, resistência e estimar a capacitância da dupla camada elétrica (Simão *et. al.*, 2015). A EIS apresenta como principal vantagem o fornecimento de informações essenciais sobre a cinética do processo a nível da interface eletrodo/solução, sendo uma técnica precisa e reprodutiva, como também fornece informações sobre o controle eletroquímico do analito (Ribeiro *et.al.*, 2015).

Os imunossensores são biossensores que são muito utilizados para detecção de agentes microbianos, por apresentarem uma resposta precoce, com alta sensibilidade e especificidade, e as interações acontecem quando o anticorpo ou antígeno é imobilizado na superfície do eletrodo. Os anticorpos utilizados para a construção de monocamadas do biossensor são a classe IgM ou IgG, devendo ser imobilizados preferencialmente na superfície do eletrodo por meio de ligação covalente a partir do uso de agentes acopladores, ficando a fração Fc livre para interagir com o antígeno (Skládal, 2013).

Na figura 2, pode-se visualizar uma representação esquemática de uma célula eletroquímica composta de por três eletrodos e as características de um anticorpo.

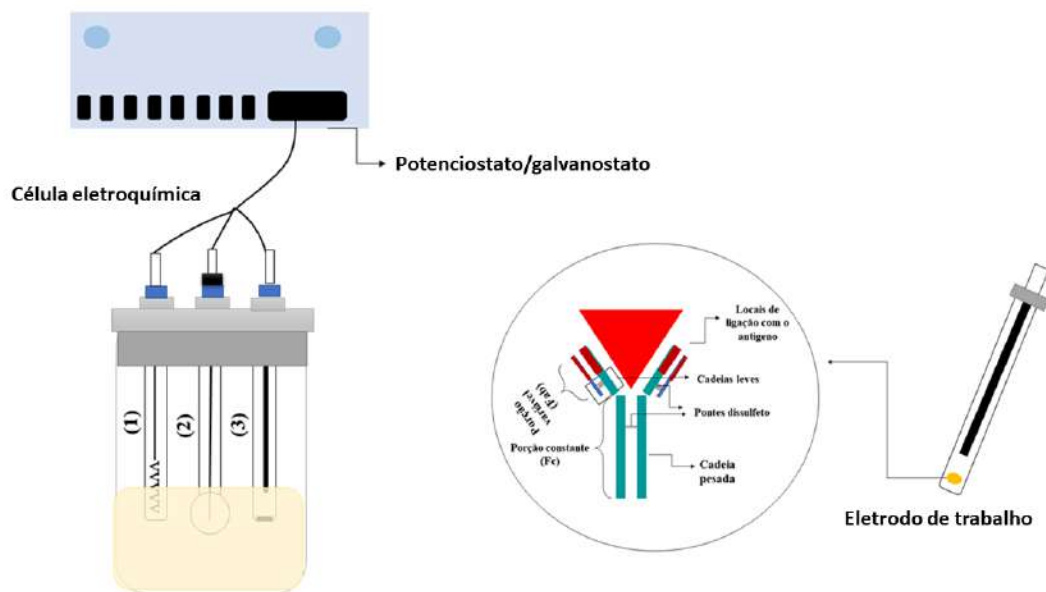


Figura 2: Representação esquemática de uma célula eletroquímica de três eletrodos utilizada para avaliação de modificação de superfícies modificadas: (1) Contra- eletrodo, (2) eletrodo de referência e (3) eletrodo de trabalho, submersos na sonda redox e representação da estrutura química de anticorpo, e a formação do complexo antígeno- anticorpo na superfície do eletrodo. O antígeno liga-se ao anticorpo através de ligações não-covalente.

A associação de eletroquímica com nanomateriais é essencial para o favorecimento de uma adequada construção de uma plataforma sensora. Em adição, as nanopartículas de óxido de zinco são um importante nanomaterial, de caráter multifuncional utilizado em vários métodos de detecção analítica. As nanopartículas de ZnO também têm sido reconhecidas como um bom candidato por apresentar alto ponto isoelétrico (PI), custo-benefício, não toxicidade e estabilidade química. Um alto valor de PI permite um melhor processo de adsorção de enzimas, DNA e proteínas por interações eletrostáticas. Desta forma, as nanopartículas de óxido de zinco mostram-se excelentes, por serem resistentes ao calor apresentando baixa toxicidade e melhorando a eletroatividade dos sistemas (Porto et. al.,2018; Oliveira et.al., 2019).

Os imunossensores eletroquímicos para detecção de AFB1, representam-se com uma alternativa para detecção desta toxina com ótima sensibilidade para análise de alimentos (SIMÃO et. al., 2015). O desenvolvimento destes imunossensores se deu a partir da necessidade de detecção de AFB1 em quantidades extremamente pequenas em alimentos (Paniel; Radoi; Marty, 2010). Estes sistemas podem ser obtidos através da modificação da superfície do eletrodo com elementos que permitam a adsorção covalente do anticorpo e posterior avaliação da formação do complexo anticorpo-antígeno (figura 3).

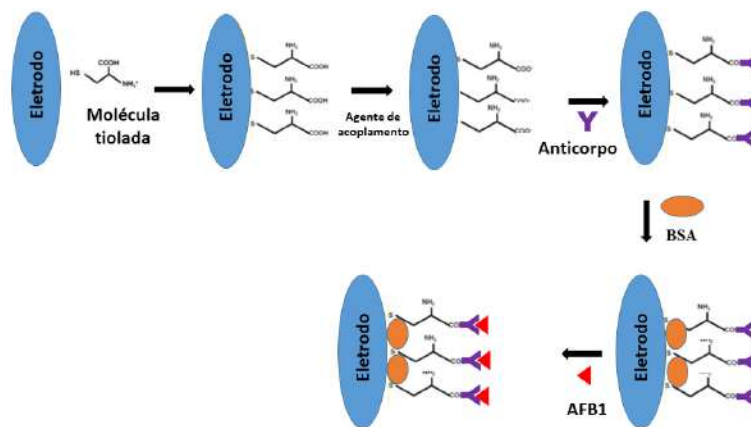


Figura 3: Representação esquemática das etapas de modificação de uma superfície eletroquímica para obtenção de um imunossensor.

4. CONCLUSÃO

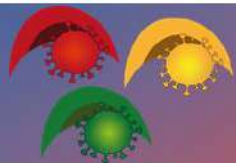
Diante de todas estas perspectivas abordadas podemos concluir que os biossensores apresentam-se como ótimos métodos para detecção de toxinas alimentares principalmente micotoxinas, ficando explícito também que as análises podem ocorrer diretamente em contato com os alimentos contaminados, sem a necessidade de tratamento prévio e os resultados podem ser obtidos em poucos minutos após a exposição. A associação da nanopartícula de óxido de Zinco com os transdutores eletroquímicos, melhora o desempenho analítico na superfície do sensor, pois permite um melhor trânsito de elétrons nas camadas auto-montadas. Portanto, os biossensores destacam-se por ser uma abordagem inovadora, de baixo custo, sensível, podendo ser utilizado em investigações na bioquímica analítica.

5. REFERÊNCIAS

- ASHIQ, Samina. Natural Occurrence of Mycotoxins in Food and Feed: Pakistan Perspective. *Com. Reviews In Food Science And Food Safety*, [s.l.], v. 14, n. 2, p.159-175, Wiley, 12 dez. 2014
- BENNETT, J. W.; KLICH, M.. *Mycotoxins. Clinical Microbiology Reviews*, v. 16, n. 3, p.497-516, New Orleans, La. jun. 2003
- BINDER, E.m.; TAN, L.m.; CHIN, L.j.; HANDL, J.; RICHARD, J.. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Anim. Feed Scien. And Tech.*, [s.l.], v. 137, n. 3-4, p.265-282. Elsevier BV, out. 2007
- CASTILLO, Gabriela; SPINELLA, Katia; POTURNAYOVÁ, Alexandra; INEJDÁRKOVÁ, Maja; MOSIELLO, Lucia; HIANIK, Tibor. Detection of aflatoxin B 1 by aptamer-based biosensor using PAMAM dendrimers as immobilization platform. *Food Control*, [s.l.], v. 52, p.9-18, Elsevier BV, jun. 2015



- CREPPY, Edmond E.; CHIARAPPA, Patrizia; BAUDRIMONT, Isabelle; BORRACCI, Pietro; MOUKHA, Serge; CARRATÙ, Maria R. Synergistic effects of fumonisin B1 and ochratoxin A: are in vitro cytotoxicity data predictive of in vivo acute toxicity?. *Toxicology*, [s.l.], v. 201, n. 1-3, p. 115-123, Elsevier BV, set. 2004
- DAMOS, Flavio Santos; MENDES, Renata Kelly; KUBOTA, Lauro Tatsuo. Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. *Quim. Nov.*, [s.l.], v. 27, n. 6, p. 970-979, FapUNIFESP, dez. 2004
- FINK-GREMMELS, Johanna. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. *Food Additives & Contaminants: Part A*, [s.l.], v. 25, n. 2, p.172-180, UK, fev. 2008
- GONZÁLEZ-OSNAYA, L.; SORIANO, J.m.; MOLTÓ, J.c.; MAÑES, J.. Simple liquid chromatography assay for analyzing ochratoxin A in bovine milk. [s.l.], v. 108, n. 1, p.272-276, *Food Chemistry*, maio 2008
- HOSU, Oana; SELVOLINI, Giulia; CRISTEA, Cecilia; MARRAZZA, Giovanna. Electrochemical Immunosensors for Disease Detection and Diagnosis. *Current Medicinal Chemistry*, [s.l.], v. 25, n. 33, p. 4119-4137, *Bentham Science Publishers Ltda*, 24 out. 2018
- MAGLIULO, Maria; MIRASOLI, Mara; SIMONI, Patrizia; LELLI, Rosella; PORTANTI, Ottavio; RODA, Aldo. Development and Validation of an Ultrasensitive Chemiluminescent Enzyme Immunoassay for Aflatoxin M1 in Milk. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, [s.l.], v. 53, n. 9, p.3300-3305, *American Chemical Society (ACS)*, maio 2005
- MARIN, S.; RAMOS, A.j.; CANO-SANCHO, G.; SANCHIS, V.. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food And Chem. Toxicology*, [s.l.], v. 60, p.218-237, Elsevier BV. out. 2013
- OLIVEIRA, Idjane Santana; SILVA JUNIOR, Alberto Galdino da; ANDRADE, Cesar Augusto Souza de; OLIVEIRA, Maria Danielly Lima. Biosensors for early detection of fungi spoilage and toxigenic and mycotoxins in food. *Current Opinion In Food Science*, [s.l.], v. 29, p. 64-79, Elsevier BV. out. 2019
- PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. Voltammetry: a brief review about concepts: A Brief Review About Concepts. *Rev. Virt. de Quím*, [s.l.], v. 5, n. 4, p. 516-537, Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 2013
- PANIEL, Nathalie; RADOI, Antonio; MARTY, Jean-louis. Development of an Electrochemical Biosensor for the Detection of Aflatoxin M1 in Milk., [s.l.], v. 10, n. 10, p.9439-9448, *Sensors*, 20 out. 2010
- RIBEIRO, D.v.; SOUZA, C.a.c.; ABRANTES, J.c.c.. Use of Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) to monitoring the corrosion of reinforced concrete. *Revista Ibracon de Estruturas e Materiais*, [s.l.], v. 8, n. 4, p. 529-546, *FapUNIFESP. (SciELO)*, ago. 2015
- SIMÃO, Estéfani P.; BARBIERI, Gilcelia J. L. S.; ANDRADE, Cesar A. S.; OLIVEIRA, Maria D. L.. Biosensor Based on Cysteine Monolayer and Monoclonal Antibody for Specific Detection of Aflatoxin B1 in Rice. *Journal Of The Brazilian Chemical Society*, [s.l.], p.1040-1047, *Soc. Brasileira de Química (SBQ)*. 2015.
- SKLÁDAL, Petr *et al.* Electrochemical immunosensors for detection of microorganisms. *Int. J. Electrochem.* v. 8, n. 0, p. 1635-1649, Czech Republic, 1 fev. 2013.
- TURNER, Nicholas W.; SUBRAHMANYAM, Sreenath; PILETSKY, Sergey A.. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. *Anal. Chem. Acta*, [s.l.], v. 632, n. 2, p. 168-180. Elsevier BV. jan. 2009



WANG, Jianling; CHEN, Guihua; JIANG, Hui; LI, Zhiyong; WANG, Xuemei. Advances in nano-scaled biosensors for biomedical applications. *The Anal.t.*, [s.l.], v. 138, n. 16, p. 4427-4447, Royal Society of Chemistry (RSC), 2013

6. AGRADECIMENTOS

CAPES, CNPq e FACEPE.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

PLATAFORMA BIOSSENSORA ELETROQUÍMICA BASEADA NO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO TEMPORINA-PTA PARA DETECÇÃO DE MICROORGANISMOS DE INTERESSE CLÍNICO

A. G. SILVA JUNIOR^{1,2}, I. A. M. FRIAS^{1,2}, S. R. SÁ², R. G. LIMA-NETO³, L. MIGLIOLO⁴,
M.D.L. OLIVEIRA^{1,2}, C. A. S. ANDRADE^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco; Recife/PE, Brasil;

²Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE, Brasil;

³Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE, Brasil;

⁴Universidade Católica Dom Bosco, UCDB, Campo Grande/MS, Brasil.

E-mail para contato: albertogaldino16@gmail.com

RESUMO – *Microorganismos como bactérias e fungos se enquadram como um dos principais causadores de infecções gastrointestinais, principalmente em países em desenvolvimento devido ao precário saneamento básico. Em adição, esses microorganismos são presentes em inúmeros casos de infecção hospitalar. Métodos tradicionais de detecção de microorganismos requerem tempo prolongado para divulgar o resultado do diagnóstico, além de terem equipamentos e reagentes de custo elevado. Biossensores eletroquímicos se destacaram campo médico-diagnóstico devido às suas características como baixo-custo, sensibilidade e miniaturização, favorecendo portabilidade com análise de resultados em minutos. Peptídeos antimicrobianos como a temporina-PTA se mostraram uma alternativa inovadora de elemento de biorreconhecimento para biossensores. O presente trabalho desenvolveu uma plataforma biossensora composta por monocamadas automontadas, nanopartículas magnéticas revestidas por ouro e o peptídeo antimicrobiano temporina-PTA para detecção de *Acinetobacter baumannii* e *Candida tropicalis*. A interação peptídeo-microorganismo foi favorecida pela carga positiva do peptídeo e carga negativa da superfície da bactéria e do fungo estudado. A detecção avaliada via espectroscopia de impedância eletroquímica apontou limite de detecção de 10 unidades formadoras de colônia por mL. O biossensor proposto apresenta-se como ferramenta promissora para apoio a testes de detecção de microorganismos.*

Palavras-chave: Biossensor; impedância; nanopartículas; bactéria; Candida spp.

ABSTRACT – *Microorganisms such as bacteria and fungi are one of the main causes of*



gastrointestinal infections, mainly in developing countries due to poor basic sanitation. In addition, these microorganisms are present in numerous cases of nosocomial infection. Traditional methods of detecting microorganisms require prolonged time to disclose the result, in addition to having expensive equipment and reagents. Electrochemical biosensors stood out in the medical-diagnostic field due to their characteristics such as low-cost, sensitivity and miniaturization, favoring portability with analysis of results in minutes. Antimicrobial peptides such as temporin-PTA proved to be an innovative alternative as biorecognition element for biosensors. The present work developed a biosensor platform composed of self-assembled monolayers, magnetic nanoparticles coated with gold and the antimicrobial peptide temporin-PTA for the detection of *Acinetobacter baumannii* and *Candida tropicalis*. The peptide-microorganism interaction was favored by the positive charges of the peptide and the negative charge on the surface of the studied bacteria and fungi. The detection evaluated via electrochemical impedance spectroscopy showed a detection limit of 10 colony-forming units per mL. The proposed biosensor presents itself as a promising tool to support tests for the detection of microorganisms.

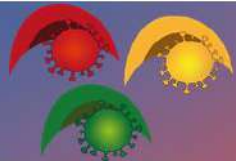
Keywords: Biosensor; impedance; nanoparticles; bacterium; *Candida* spp.

1. INTRODUÇÃO

Apesar de todos os avanços no campo médico e clínico, infecções ocasionadas por microorganismos ainda permanecem sendo um crescente problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento (PERCIVAL et al., 2014). Políticas públicas visando o tratamento da água, bem como o uso seguro em regiões com escasso saneamento básico são divulgados, mas pouca resposta é observada. Diversas espécies de bactérias, fungos e protozoários causam infecções severas em animais na pecuária, principalmente em países da África e América do Sul, onde se destacam como setor essencial de suas economias (MICHAEL THRUSFIELD, 2018). Doenças gastrointestinais e diarreia associadas a infecção por microorganismos presentes na água são responsáveis por milhões de mortes anualmente (ALHAMLAN; AL-QAHTANI; AL-AHDAL, 2015; RAMÍREZ-CASTILLO et al., 2015).

Em adição, microorganismos presentes no acrônimo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies *Enterobacter*) são amplamente correlacionados em infecções ocasionadas no ambiente hospitalar, desencadeando, por exemplo, bacteremia e bacteriúria devido ao uso de instrumentos invasivos (MA et al., 2020). Outros microorganismos que se tornaram uma ameaça clínica principalmente devido à resistência antibiótica e antifúngica são as leveduras do gênero *Candida* spp, como a *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Candidemia e candidíase agravam o quadro de pacientes imunocomprometidos, atingindo principalmente neonatos e idosos (LAMOTH et al., 2018).

Técnicas como a cultura de microorganismos em placa ou caldos ainda permanecem sendo uma opção amplamente utilizada, apesar de ser demorada no aspecto de crescimento microbiano (de 24h a 72h após o semeio) utilizando amostras de sangue e urina (SAFAVIEH et al., 2017). Enzimoimunoensaios e testes moleculares com a reação em cadeia de polimerase (PCR), apesar de efetivos, apresentam casos de falso-positivos e fraca amplificação de células não viáveis dos microorganismos presentes na amostra, além de requererem equipamentos e materiais dispendiosos (KOBAYASHI et al., 2009). Com isso, alternativas inovadoras são essenciais como



opção às técnicas tradicionais, visando estratégias que acolham baixo-custo com efetiva sensibilidade e especificidade na detecção do analito-alvo.

Plataformas biossensoras se destacam como novas ferramentas de rápida análise biológica, integrando nanomateriais e múltiplos substratos que podem ser facilmente miniaturizados para dispositivos portáteis. Biossensores eletroquímicos se destacam diante de outros transdutores pela simples análise e integração de moléculas de biorreconhecimento específicas para um determinado analito (MADURAIVEERAN; SASIDHARAN; GANESAN, 2018). Dentre tais moléculas, destacam-se antígenos, anticorpos, fragmentos de oligonucleotídeos, enzimas, células, peptídeos, etc., onde após a interação com o analito-alvo, desencadearão um sinal elétrico proporcional à concentração do analito presente na amostra (ENSAFI, 2019).

Inicialmente utilizados como alternativa inovadora de agentes bactericidas e fungicidas, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) apresentam um amplo espectro de aplicação, onde o uso em plataformas biossensoras se mostrou adequado para a identificação de microorganismos (RIOOL et al., 2017). A interação de sua estrutura catiônica com a superfície eletronegativamente carregada de bactérias e fungos resultará na variação do potencial e da resistência à transferência de carga (R_{CT}) na interface eletrodo sensor-solução adjacente, sendo facilmente avaliado pelas técnicas voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) (QIAO et al., 2020; SILVA JUNIOR et al., 2018).

Portanto, o trabalho proposto teve como objetivo o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico baseado em monocamadas automontadas de ácido 4-mercaptopbenzóico (MBA), nanopartículas magnéticas revestidas por ouro ($Fe_3O_4@Au$ -APTES) e do PAM bioinspirado temporina-PTA (T-PTA) com sequência FFGSVLKLIPKIL-NH₂, normalmente imobilizado da secreção da pele da rã *Hylarana picturata*, encontrada em florestas na Malásia (CONLON et al., 2008). Os analitos-alvo consistiram de uma bactéria (*Acinetobacter baumannii*) e um fungo (*Candida tropicalis*).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

MBA, (3-aminopropil)trietoxissilano (APTES), 1-etil-3-(3dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), cloreto de ouro III trihidratado ($HAuCl_4.3H_2O$) e borohidreto de sódio ($NaBH_4$) foram obtidos pela Sigma Aldrich (EUA). Cloreto de ferro (III) hexahidratado ($FeCl_3.6H_2O$) e sulfato de ferro (II) heptahidratado ($FeSO_4.7H_2O$) foram obtidos pela VETEC (Brasil). Água deionizada ultrapura foi utilizada em todas as etapas experimentais, obtidas pelo sistema de purificação Millipore Milli-Q (Billerica, EUA). O PAM do estudo, a T-PTA, foi sintetizada usando o método N-9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) e purificado via cromatografia (HPLC).

Cultura dos microorganismos

A. baumannii e *C. tropicalis* foram semeados em meio Mueller-Hinton e ágar Sabouraud dextrose, respectivamente. As condições experimentais foram de incubação a 37°C durante 24h. Após o crescimento, as células foram lavadas em salina esterilizada (0,9%) e suspensas em tampão fosfato (PBS) pH 7. Diferentes concentrações foram distribuídas em eppendorfs ($10^1 - 10^5$ unidades formadoras de colônia por mL [CFU.mL⁻¹]) seguindo a escala de McFarland e usando espectrofotômetro com densidade óptica em 600 nm (OD_{600}). As suspensões de microorganismos



foram estocadas a 4°C até início dos testes eletroquímicos de detecção.

Síntese das nanopartículas magnéticas

As Fe_3O_4 foram preparadas pelo método de co-precipitação do Fe^{2+} e Fe^{3+} proposto por Ebrahiminezhad e colaboradores 2012, com algumas modificações. 8.5 mM de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 4.3 mM do $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ são diluídos em 50 mL de água deionizada, com agitação magnética (60°C). 5 mL de hidróxido de amônio é adicionado à solução, resultando na modificação da cor da solução para preto, indicativo de formação das Fe_3O_4 . As nanopartículas foram lavadas com água e etanol 70% até a solução atingir pH 7. O revestimento com ouro seguiu o protocolo de Salehizadeh e colaboradores, 2012, com a adsorção do Au^{3+} nas Fe_3O_4 e adição da D-glicose como agente redutor. APTES revestiu as nanopartículas adicionando 100 mg das $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ em uma solução de etanol com 13 mM de APTES, seguindo com agitação magnética por 12h, resultando nas $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ -APTES.

Preparo da plataforma sensora

Inicialmente, o eletrodo de trabalho com superfície de ouro (ET), substrato de montagem do sensor, foi lavado em água deionizada, polido em alumina seguido de banho ultrassônico. Posteriormente, o ET é imerso em solução de MBA 50 mM durante 10 min, resultando em uma monocamada automontada (SAM). Em seguida, os grupos carboxílicos livres do SAM formado são ativados pelos agentes acopladores EDC NHS (0.4 M e 0.1 M, 1:1, respectivamente). As $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ -APTES foram adsorvidas ao eletrodo por 10 min, com os grupos amina do APTES se ligando aos grupos carboxílicos da SAM. T-PTA foi incubado no eletrodo durante 10 min, resultando no sistema $\text{MBA_Fe}_3\text{O}_4@Au$ -APTES_T-PTA.

Avaliação eletroquímica

Uma célula eletroquímica contendo 3 eletrodos (ET como eletrodo de trabalho, Ag/AgCl como referência e platina como contra-eletrodo) imersos em solução de ferro-ferricianeto de potássio $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ foi utilizada. CV e EIS foram realizados por meio do potenciostato/galvanostato PGSTAT 128 N (Ecochemie, Países Baixos) e interface com o software NOVA 1.11 e OriginPro8 para análise dos gráficos. As análises via CV ocorreram no potencial entre -0.2V e +0.7V e taxa de varredura de $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. Os experimentos impedimétricos se deram na faixa de frequência 100 mHz a 100 kHz e potencial de onda senoidal 10 mV. Todos os experimentos ocorreram em temperatura ambiente e no interior de uma gaiola de Faraday.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso de uma sonda redox como $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ no estudo de plataformas sensoras via CV e EIE se destaca como uma ferramenta útil no comportamento eletroquímico e reações que ocorrem na interface de um substrato (como o ET com superfície de ouro) e a solução adjacente (RETA et al., 2018). Dessa forma, o processo de montagem do sistema sensor $\text{MBA_Fe}_3\text{O}_4@Au$ -APTES_T-PTA foi avaliado por meio das variações dos picos catódicos e anódicos do voltamograma cíclico e variações na resistência à transferência de carga (R_{CT}) no diagrama de Nyquist.

Na Fig. 1 temos a resposta eletroquímica referente à montagem da plataforma biossensora. De início, um voltamograma e espectro impedimétrico referente ao eletrodo com superfície limpa é avaliado (voltamograma preto, Fig. 1a e curva preta, Fig. 1b, respectivamente). Após a

certificação do mesmo, a adsorção do MBA resultará no fechamento dos picos anódicos e catódicos (voltamograma vermelho, Fig. 1a) e aumento do R_{CT} (curva vermelha, Fig. 1b), resultante da formação de SAMs de MBA, favorecida pela interação tiol-ouro (S-Au), revestindo toda superfície do ET (HASAN; PANDEY, 2018). Posteriormente, a aplicação dos agentes EDC NHS, seguida da integração das nanopartículas $Fe_3O_4@Au$ -APTES resultará no aumento da resposta amperométrica (voltamograma azul, Fig. 1a) e redução do R_{CT} (curva azul, Fig. 1b) devido à formação do éster NHS com suas cargas positivas na superfície da MAM, em conjunto com o aumento da condutividade favorecida pelas nanopartículas magnéticas (KELEŞTEMUR; ALTUNBEK; CULHA, 2017). A adição dos peptídeos T-PTA resultou no novo fechamento dos picos no voltamograma (voltamograma verde, Fig. 1a), indicativo da ligação dos peptídeos às nanopartículas por meio do glutaraldeído.

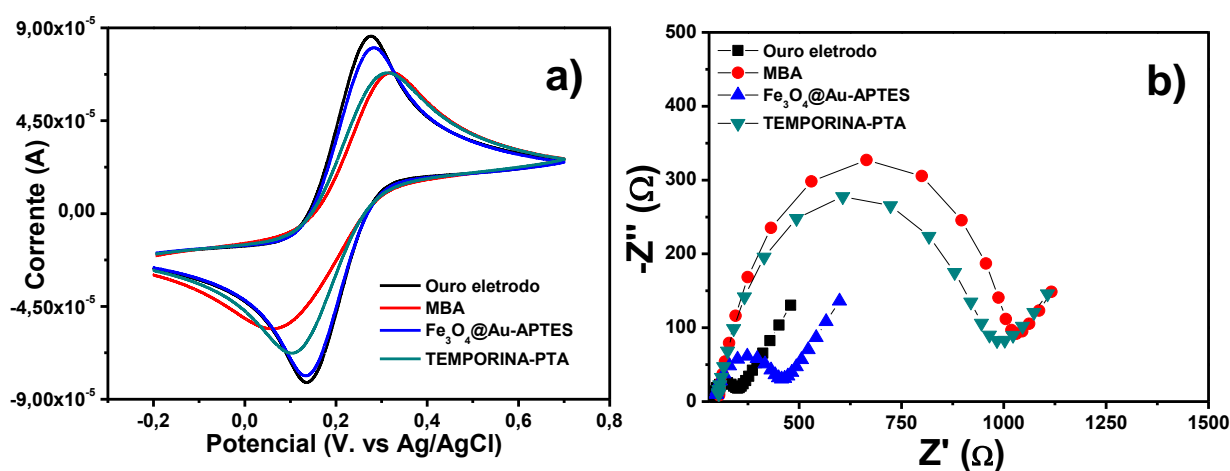


Figura 1 – Avaliação voltamétrica (a) e impedimétrica da montagem da plataforma sensora MBA_ $Fe_3O_4@Au$ -APTES_T-PTA.

Os testes para detecção dos microorganismos-alvo ocorreram pela adição de 5 μ L da suspensão em diferentes concentrações (10^1 a 10^5 UFC.mL) durante 5 minutos, seguido da limpeza do eletrodo para remoção das células não aderidas. Um padrão diferente foi observado para cada microorganismo.

A Fig. 2 a e b mostram a resposta impedimétrica referente à detecção de *A. baumannii* e *C. tropicalis*, respectivamente. Ambos microorganismos apresentaram limite de detecção de 10^1 UFC.mL, porém pode-se observar uma maior R_{CT} apresentada para todas as concentrações de *A. baumannii* aderida à superfície do sistema sensor. Tal característica se deve ao peptídeo T-PTA apresentar uma estrutura extremamente catiônica, atraindo a bactéria Gram-negativa com sua carga eletronegativa de superfície com maior facilidade em comparação com leveduras do gênero *Candida* spp (KUMAR; KIZHAKKEDATHU; STRAUS, 2018). Em adição, a estrutura amidada do T-PTA (FFGSVLKLIPKIL-NH₂) aprimora a interação eletrostática com microorganismos, promovendo a estabilização da estrutura helical para inserção na bicamada lipídica (STRANDBERG et al., 2007). Diferentemente do *A. baumannii*, a levedura *C. tropicalis* dispõe de uma membrana fosfolipídica zwitteriônica em associação com o ergosterol, resultando em uma carga neutra em sua superfície, reduzindo, portanto, a atração eletrostática do T-PTA (MALANOVIC; LOHNER, 2016).

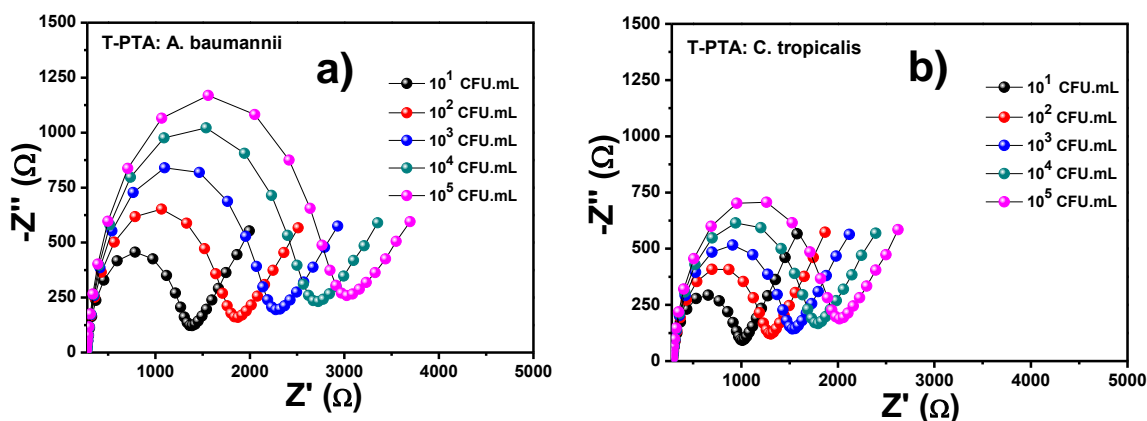


Figura 2 – Avaliação impedimétrica da detecção de *A. baumannii* (a) e *C. tropicalis* (b) pelo sistema sensor MBA_Fe₃O₄@Au-APTES_T-PTA.

4. CONCLUSÃO

Um biossensor eletroquímico composto por monocamadas automontadas, nanopartículas magnéticas e peptídeo antimicrobiano bioinspirado T-PTA foi desenvolvido para a detecção de bactérias e fungos. O limite de detecção de 10 UFC.mL foi apresentado para *A. baumannii* e *C. tropicalis*, destacando a sensibilidade do sistema proposto. Maior resposta eletroquímica foi demonstrada para a detecção da bactéria Gram-negativa devido às características físico-químicas do peptídeo utilizado, bem como características estruturais de ambos os microorganismos. O biossensor proposto apresenta-se como uma promissora alternativa de teste para detecção de microorganismos patogênicos em água ou soluções.

5. REFERÊNCIAS

- ALHAMLAN, F. S.; AL-QAHTANI, A. A.; AL-AHDAL, M. N. Recommended advanced techniques for waterborne pathogen detection in developing countries. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 2, p. 128–135, 2015.
- CONLON, J. M. et al. Characterization of antimicrobial peptides from the skin secretions of the Malaysian frogs, *Odorrana hosii* and *Hylarana picturata* (Anura:Ranidae). **Toxicon**, v. 52, n. 3, p. 465–473, 2008.
- EBRAHIMINEZHAD, A. et al. Impact of amino-acid coating on the synthesis and characteristics of iron-oxide nanoparticles (IONs). **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 33, n. 12, p. 3957–3962, 2012.
- ENSAFI, A. A. An introduction to sensors and biosensors. In: **Electrochemical Biosensors**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. p. 1–10.
- HASAN, A.; PANDEY, L. M. Self-assembled monolayers in biomaterials. In: **Nanobiomaterials: Nanostructured Materials for Biomedical Applications**. [s.l.] Elsevier Ltd., 2018. p. 137–178.
- KELEŞTEMUR, S.; ALTUNBEK, M.; CULHA, M. Influence of EDC/NHS coupling chemistry on stability and cytotoxicity of ZnO nanoparticles modified with proteins. **Applied Surface Science**, v. 403, p. 455–463, 2017.



- KOBAYASHI, H. et al. Limiting false-positive polymerase chain reaction results: detection of DNA and mRNA to differentiate viable from dead bacteria. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 64, n. 4, p. 445–447, 2009.
- KUMAR, P.; KIZHAKKEDATHU, J. N.; STRAUS, S. K. Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. **Biomolecules**, v. 8, n. 1, 2018.
- LAMOTH, F. et al. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. January, p. i4–i13, 2018.
- MA, Y. X. et al. Considerations and Caveats in Combating ESKAPE Pathogens against Nosocomial Infections. **Advanced Science**, v. 7, n. 1, 2020.
- MADURAVEERAN, G.; SASIDHARAN, M.; GANESAN, V. Electrochemical sensor and biosensor platforms based on advanced nanomaterials for biological and biomedical applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 103, n. December 2017, p. 113–129, 2018.
- MALANOVIC, N.; LOHNER, K. Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1858, n. 5, p. 936–946, 2016.
- MICHAEL THRUSFIELD. **Veterinary epidemiology**. 4. ed. [s.l.] JOHN WILEY & SONS, 2018. v. 24
- PERCIVAL, S. et al. **Microbiology of Waterborne Diseases: Microbiological Aspects and Risks**. 2. ed. [s.l.] Elsevier, 2014.
- QIAO, Z. et al. Advances in antimicrobial peptides-based biosensing methods for detection of foodborne pathogens: A review. **Food Control**, v. 112, 2020.
- RAMÍREZ-CASTILLO, F. et al. Waterborne Pathogens: Detection Methods and Challenges. **Pathogens**, v. 4, n. 2, p. 307–334, 2015.
- RETA, N. et al. Nanostructured Electrochemical Biosensors for Label-Free Detection of Water- and Food-Borne Pathogens. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 10, n. 7, p. 6055–6072, 2018.
- RIOOL, M. et al. Antimicrobial Peptides in Biomedical Device Manufacturing. **Frontiers in Chemistry**, v. 5, n. August, p. 1–13, 2017.
- SAFAVIEH, M. et al. Advances in Candida detection platforms for clinical and point-of-care applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 441–458, 2017.
- SALEHIZADEH, H. et al. Synthesis and characterization of core-shell Fe₃O₄-gold-chitosan nanostructure. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 10, n. 3, p. 1–7, 2012.
- SILVA JUNIOR, A. G. et al. A simple nanostructured impedimetric biosensor based on clavanin a peptide for bacterial detection. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 255, p. 3267–3274, 2018.
- STRANDBERG, E. et al. Influence of C-terminal amidation on the antimicrobial and hemolytic activities of cationic α -helical peptides. **Pure and Applied Chemistry**, v. 79, n. 4, p. 717–728, 2007.

6. AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados e orientadores Prof. César Andrade, Profa. Maria Danielly e Dr. Isaac Morales pelo apoio e avaliação dos experimentos. Em adição, agradeço à CAPES pela bolsa em pesquisa.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

INFLUÊNCIA DE ÍONS METÁLICOS SOBRE A ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA DE PROTEASES EXTRAÍDAS DE SEMENTES DE *GLIRICIDIA SEPIUM*

M. T. T. do COUTO¹, A. V. da SILVA², R. M. P. B. COSTA³, J. P. de OLIVEIRA⁴, T. P. NASCIMENTO², A. C. L. LEITE¹ e A. L. F. PORTO²

¹Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas;

²Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Laboratório de Tecnologia de Produtos Bioativos;

³Universidade de Pernambuco, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Avanços em Biotecnologia de Proteínas;

⁴Instituto Agrônomo de Pernambuco.

E-mail para contato: torresc.milena@gmail.com

RESUMO – As proteases fibrinolíticas são enzimas que atuam degradando diretamente os coágulos de fibrina, essas enzimas podem ser extraídas de plantas e são candidatas promissoras na indústria farmacêutica, entretanto o conhecimento sobre a ação de co-fatores que possam proporcionar um aumento ou inibição de sua atividade enzimática é fundamental. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi de investigar a influência de íons metálicos sob a atividade fibrinolítica de proteases extraída de sementes de *Gliricidia sepium*. Foi obtido um extrato bruto a partir do pó do endosperma, o qual foi filtrado, centrifugado e precipitado com sulfato e cloreto de amônio (0 – 40%). Em seguida foram realizadas a quantificação de proteína e as atividades proteásica e fibrinolítica. Por fim, o extrato precipitado foi exposto a diferentes íons metálicos: que foram incubados a 37°C por 60 min. A atividade específica da protease fibrinolítica foi aumentada a partir da precipitação com sulfato de amônio (19,48 U/mg) em comparação ao cloreto (4,66 U/mg) e o extrato bruto (1,97 U/mg). As proteases precipitadas com sulfato tiveram sua atividade aumentada na presença de Zn⁺⁺, Fe⁺⁺, Na⁺ e Ca⁺⁺, já o íon Cu⁺⁺ reduziu essa atividade. Dessa forma foi possível obter proteases a partir do extrato bruto de sementes de *Gliricidia* e precipitadas por sulfato que demonstraram atividade fibrinolítica e uma melhora na sua atividade enzimática na presença de alguns íons favorecendo as condições ideais de sua ação.

Palavras-chave: *Gliricidia sepium*, íons metálicos, protease fibrinolítica.

ABSTRACT - Fibrinolytic proteases are enzymes that act by directly degrading fibrin clots, these enzymes can be extracted from plants and are promising candidates in the pharmaceutical



industry, however the knowledge about the action of cofactors that can provide an increase or inhibition in their enzymatic activity is fundamental. In this sense, the objective of this work was to investigate the metal ions' influence on the fibrinolytic activity of proteases extracted from *Gliricidia sepium*'s seeds. A crude extract was obtained from the endosperm powder, which was filtered, centrifuged and precipitated with sulfate and ammonium chloride (0 - 40%). Then, protein quantification and also proteinase and fibrinolytic activities were performed. Finally, the precipitated extract was exposed to different metal ions: which were incubated at 37° C for 60 min. The specific activity of fibrinolytic protease was mostly increased by ammonium sulfate precipitation (19.48 U/mg) compared to chloride (4.66 U/mg) and crude extract (1.97 U/mg). The proteases precipitated with sulfate had their activity increased in the presence of Zn^{++} , Fe^{++} , Na^{+} and Ca^{++} , whereas the Cu^{++} ion reduced this activity. In such manner it was possible to obtain proteases from the crude extract of *Gliricidia* seeds that were precipitated by sulfate, which demonstrated fibrinolytic activity and an improvement in its enzymatic activity in the presence of some ions favoring the ideal conditions of its action.

Keywords: *Gliricidia sepium*, metallic ions, fibrinolytic protease.

1. INTRODUÇÃO

As proteases são enzimas que catalisam a quebra de proteínas através da hidrólise das ligações peptídicas. Atualmente, as proteases representam 60% do mercado total de enzimas. Elas abrangem uma ampla gama de aplicações industriais como indústrias de alimentos, farmacêuticas e de lavanderia, esse mercado deve crescer 7,8% até 2020 e atingir um valor de US\$ 6,3 bilhões (SHARMA et al., 2017). Essas enzimas estão presentes nas plantas e foram associadas a inúmeros processos biológicos atuando nas mais diversas temperaturas e amplas faixas de pHs, tornando essas proteases vegetais candidatas promissoras para diversos usos na biotecnologia e na medicina (PEPE et al, 2018). A *Gliricidia sepium* pertence à família Leguminosae e subfamília Faboideae, é uma árvore de porte médio nativa do México e da América Central cultivada extensamente devido à sua grande diversidade de usos (ALLEN E ALLEN, 1981; DRUMOND E CARVALHO FILHO, 1999). Ela apresenta uma alta produção de sementes que continuam viáveis por até 12 meses se armazenadas corretamente (REIS, 2012).

Dentre as proteases com aplicações terapêuticas destacam-se as proteases fibrinolíticas que são utilizadas como um dos tratamentos mais eficazes para a trombose. A primeira geração de terapia com enzimas fibrinolíticas começou com a descoberta da estreptoquinase na década de 1930 (KUMAR et al., 2020). Existem inúmeros medicamentos, entretanto eles possuem alguns efeitos colaterais como: riscos de sangramento, alta toxicidade, reações alérgicas entre outros, um desses exemplos é o ativador do plasminogênio tecidual (tPa) que é um dos medicamentos mais utilizados no tratamento do infarto agudo do miocárdio, mas está associado a distúrbios hemorrágicos cerebrais (CALDWELL et al. 2006; NASCIMENTO, et al., 2017).

As enzimas elas podem ser reguladas por outras moléculas ou íons são os chamados cofatores enzimáticos que atuam aumentando, diminuindo ou inibindo a atividade de uma enzima (NELSON E COX, 2014). Nesse sentido para o uso eficaz nas indústrias, as proteases precisam ser estáveis e ativas, portanto, há uma demanda crescente por enzimas com uma estabilidade e caracterização bem definida. Dessa forma o objetivo do nosso trabalho foi o de avaliar a influência de íons metálicos sobre a atividade de proteases extraídas do endosperma das sementes de *Gliricidia sepium* e precipitadas por sulfato de amônio.



2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparação do extrato bruto

O endosperma da semente de *Gliricidia sepium* foi separado e moído em pó fino, cujo extrato foi obtido a 100 rpm por 4 horas à 25°C em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6. Em seguida, o extrato foi filtrado e transferido para tubos Falcon de 50 mL e finalmente centrifugado a 10,000 ×g por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi denominado então como extrato bruto (EB) e utilizado para as demais análises bioquímicas.

2.2 Precipitação com sulfato e cloreto de amônio

As proteases presente no extrato bruto foram inicialmente precipitadas com os sais cloreto e sulfato de amônio ambos na faixa de precipitação (0 - 40%) por 4 horas em banho de gelo, em seguida cada amostra de acordo com o sal utilizado para a precipitação foi centrifugada a 10,000 ×g por 15 min e o precipitado ressuspensão em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6.

2.3 Determinação da atividade proteásica

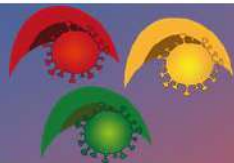
A determinação da atividade proteásica foi realizada pelo método de GINTHER (1979). Uma alíquota de 150 µL das proteases extraídas e precipitadas por sulfato de amônio foi misturada com 250 µL do substrato (azocaseína 1%) em tubos de Eppendorfs (1,5 mL; Kasvi, Curitiba, Brasil), essa reação foi então incubada em temperatura ambiente no escuro por 1 hora, passado esse tempo foi adicionado 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10 % . Em seguida, a mistura da reação foi centrifugada (3.000 xg por 15 min) e o sobrenadante (800 µL) foi homogeneizado com 200 µL de tampão NaOH 1,8 N. Para determinação da atividade as amostras foram lidas na absorbância de 420 nm, e a atividade enzimática foi definida como um aumento de 0,01 na absorbância.

2.4 Determinação da atividade fibrinolítica

A atividade fibrinolítica foi determinada pelo método espectrofotométrico descrito por WANG et al. (2011). Primeiro, 0,4 mL de fibrinogênio a 0,72 % foi acrescentado em um tubo de ensaio com 0,1 mL de tampão fosfato 245 mM (pH 7) e incubado a 37 °C por 5 min. Em seguida, foram adicionados 0,1 mL de uma solução de trombina a 20 U/mL. A solução foi incubada a 37 °C por 10 min, e posteriormente foram adicionados 0,1 mL das proteases extraídas e precipitadas por sulfato de amônio, a incubação continuou a 37 °C. Esta solução foi então homogeneizada após 20 e 40 min. Aos 60 min, 0,7 mL de ácido tricloroacético 0,2 M (TCA) foram adicionados para interromper a reação. A mistura foi então centrifugada a 15.000 × g por 10 min e em seguida, 1 mL do sobrenadante foi coletado e a absorbância a 275 nm foi medida. Neste ensaio, 1 unidade de degradação de fibrina (UF) foi definida como um aumento de 0,01 por minuto.

2.5 Determinação de proteínas

O conteúdo total de proteínas das amostras foi determinado de acordo com Bradford (1976), sendo utilizado o Coomassie Brilliant Blue G-250 como corante, a albumina de soro bovino (BSA) foi utilizada como proteína padrão para a curva de calibração. Cada experimento foi realizado em triplicata, e os resultados após correção contra amostras em branco foram expressos como valores médios.



2.6 Efeito dos íons metálicos na atividade da protease

As proteases extraídas e precipitadas por sulfato de amônio foram avaliadas na presença de íons metálicos descritos como inibidores ou ativadores da atividade proteásica. O extrato precipitado (250 µL) foi exposto aos seguintes íons (250 µL): zinco (Zn^{++}), magnésio (Mg^{++}), cobre (Cu^{++}), ferro (Fe^{++}), cálcio (Ca^{++}), sódio (Na^+) e potássio (K^+) todos na concentração de 5,0 mM, no controle foi substituído a solução de íons por água destilada (250 µL) sendo a reação incubada a 37 °C por 60 min e posteriormente determinada a atividade proteásica conforme descrito no item 2.3.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos estudos de precipitação do extrato das sementes de *Gliricidia sepium* foi avaliado que a precipitação com cloreto de amônio promoveu uma atividade específica de 4,66 U/mg de atividade fibrinolítica, enquanto que com sulfato de amônio foi de 19,48 U/mg ou seja bem superior ao cloreto e ao valor obtido inicialmente no extrato bruto (1,97 U/mg).

O efeito de diferentes íons metálicos foi investigado na atividade residual da protease a fim de fornecer informações sobre possíveis ações de íons metálicos como moduladores positivos ou negativos sobre a atividade da enzima como pode ser visto na Figura 1.

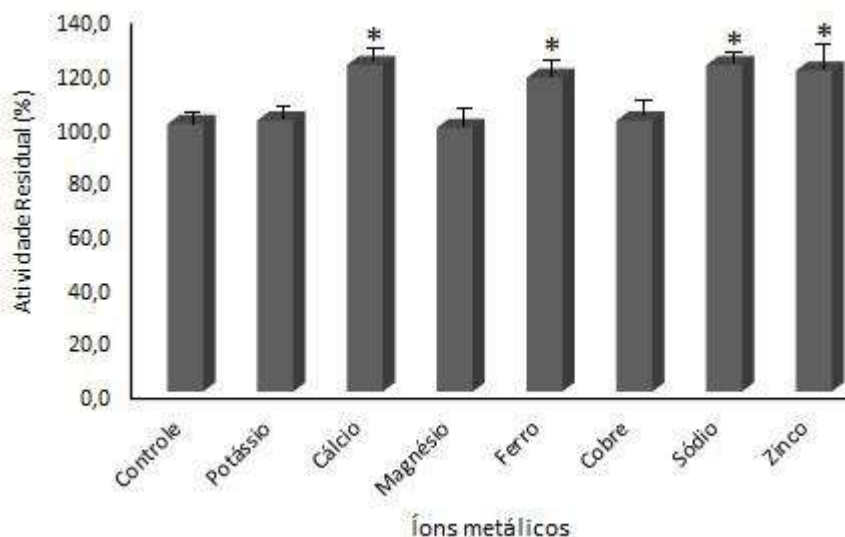


Figura 1 – Efeito de íons metálicos na atividade proteásica das enzimas extraídas e precipitadas por sulfato de amônio (0 – 40%). *Efeitos estatisticamente significativos (valor $P < 0,05$).

Pode-se observar que a atividade proteásica foi significativamente melhorada na presença de Zn^{++} , Fe^{++} , Na^+ e Ca^{++} , corroborando os resultados de Costa e Silva et al. (2018) que identificou o Fe^{++} como um indutor da atividade de uma protease produzida por *Chlorella vulgaris*. Já Taneja et al. (2017) avaliando a enzima obtida por *Serratia sp.* também apresentou melhora na atividade proteásica na presença de Na^+ , porém esta foi inibida por Fe^{++} e Ca^{++} . Cátions como Na^+ ocorrem comumente no sistema vivo, de modo que seu efeito estimulador sobre a atividade enzimática favorece seu potencial terapêutico (TANEJA et al., 2017).

De acordo com Siritapetawee et al. (2014) Zn^{++} e Ca^{++} promoveram alterações na atividade



da enzima produzida por *Euphorbia cf. lactea*, identificando o Ca^{++} como ativador da atividade proteolítica por estabilizar a estrutura dessa protease. Já o Zn^{++} , único metal presente nas seis classes de enzimas (oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerasas e ligases), inibiu a atividade. Várias enzimas vegetais importantes como anidrase carbônica e superóxido dismutase são estruturalmente ligadas ao Zn^{++} (ZHANG et al., 2012). Nascimento et al. (2017) obteve resultados diferentes dos apresentados no nosso trabalho, sendo o Ca^{++} e o Zn^{++} inibidores diretos na atividade proteásica da protease fibrinolítica produzida pelo fungo *Mucor subtilissimus* UCP 1262. Há a probabilidade de que o Zn^{++} e o Ca^{++} estejam envolvidos no mecanismo catalítico que implica na ligação de grupos carboxila pelas as enzimas fibrinolíticas, alterando seu sítio ativo (HUANG et al., 2013).

A influência do Mg^{++} não foi considerada significativa ($p= 0,58$ ou seja maior que 0,05), assim como foi visto por Thu et al. (2020) em uma serino protease de *Bacillus subtilis*. Nesse mesmo estudo foi identificada uma atividade inibitória extensa do íon Cu^{++} , enquanto nos nossos resultados a influência inibitória desse íon foi mais sutil.

4. CONCLUSÃO

Dessa forma, conclui-se que as proteases extraídas de sementes de *Gliricidia sepium* e precipitadas por sulfato de amônio garantiu uma maior seletividade na separação das proteases em relação a outras enzimas, proteínas e contaminantes presentes no extrato bruto e que os íons metálicos estudados afetaram diretamente a atividade enzimática das proteases fibrinolíticas presentes.

5. REFERÊNCIAS

ALLEN, O. N.; ALLEN, E. K. The Leguminosae: A Source Book of Characteristics, Uses and Nodulation. Univ of Wisconsin Press, 1981.

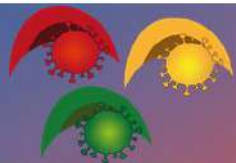
BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem*, v. 72, p. 248–254, 1976.

COSTA E SILVA, P. E.; DE BARROS, R. C.; ALBUQUERQUE, W. W. C.; BRANDÃO, R. M. P.; BEZERRA, R. P.; PORTO, A. L. F. In vitro thrombolytic activity of a purified fibrinolytic enzyme from *Chlorella vulgaris*, *J Chrom B*, v. 1092, p. 524-529, 2018.

DA SILVA, L. H. M.; LOH, W. Sistemas Aquosos Bifásicos: Fundamentos e Aplicações Para Partição/Purificação de Proteínas. *Quím. Nova*, v. 29, p. 1345–1351, 2006.

DRUMOND, M. A.; CARVALHO FILHO, O. M. Introdução e avaliação de *Gliricidia sepium* na região semi-árida do Nordeste Brasileiro. In: QUEIRÓZ, M. A.; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Ed.) *Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro*, v. 1. Petrolina: Embrapa Semi-Árido /Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999.

GINTHER, C. L. Sporulation and the production of serine protease and cephamycin C by



Streptomyces lactamdurans. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 15, p. 522–526, 1979.

HUANG S.; PAN S.; CHEN G. et al. Biochemical characteristics of a fibrinolytic enzyme purified from a marine bacterium, *Bacillus subtilis* HQS-3. *Int J Biol Macromol*, v. 62, p. 124–130, 2013.

KUMAR, S. S.; HARIDAS, M.; ABDULHAMEED, S. A novel fibrinolytic enzyme from marine *Pseudomonas aeruginosa* KU1 and its rapid in vivo thrombolysis with little haemolysis, *Int J Biol Macromol*, v. 162, p. 470-479, 2020.

NASCIMENTO, T.P.; SALES, A.E.; PORTO, T.S. et al. Purification, biochemical, and structural characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Mucor subtilissimus* UCP 1262. *Bioproc Biosyst Eng*, v. 40, p. 1209–1219, 2017.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger principles of biochemistry, 6^a ed. Nova York: W.H. Freeman, 2014.

REIS, R. C. R. et al. Physiological quality of *Gliricidia sepium* (Jacq.) Steud. (Leguminosae - Papilionoideae) seeds subjected to different storage conditions. *Rev. Árvore*, Viçosa, v. 36, n. 2, p. 229-235, Apr. 2012.

SHARMA, K. M.; KUMAR, R.; PANWAR, S.; KUMAR, A. Microbial Alkaline Proteases: Optimization of Production Parameters and Their Properties. *J Genet Eng Biotechnol.*, v. 15, p. 115–126, 2017.

PEPE, A.; GUEVARA, M. G.; TITO, F. R. Potential Use of Plant Proteolytic Enzymes in Hemostasis. in: *Biotechnological Applications of Plant Proteolytic Enzymes*. Switzerland: Springer, cap. 6, p. 129-141, 2018.

SIRITAPETAWE, J., LIMPHIRAT, W., KANTACHOT, C. & KONGMARK, C. The Effects of Metal Ions in *Euphorbia cf. lactea* Latex on the Fibrinogenolytic Activity of a Plant Protease. *Appl Biochem Biotech*, v. 175, n. 1, p. 232–242, 2014.

TANEJA, K., BAJAJ, B. K., KUMAR, S. et al. Production, purification and characterization of fibrinolytic enzyme from *Serratia* sp. KG-2-1 using optimized media. *3 Biotech*, v. 7, n. 3, p 184, 2017.

THU, N.T.A. et al. Characterizations and fibrinolytic activity of serine protease from *Bacillus subtilis* c10. *Curr Pharm Biotechno*, v. 21, n. 2, p. 110-116, 2020.

WANG, S. L.; WU, Y. Y.; LIANG, T. W. Purification and biochemical characterization of a nattokinase by conversion of shrimp shell with *Bacillus subtilis* TKU007. *New biotech* v. 28, n. 2, p. 196–202, 2011.



ZHANG, L.; CONWAY, J. F.; THIBODEAU, P. H. Calcium-induced Folding and Stabilization of the *Pseudomonas aeruginosa* Alkaline Protease. *J Biol Chem*, v. 287, p. 4311–4322, 2012.

6. AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e o Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA).



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

PURIFICAÇÃO DE PROTEASES EXTRAÍDAS DE TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) DE INTERESSE BIOMÉDICO E FARMACÊUTICO: APLICAÇÃO DA PARTIÇÃO TRIFÁSICA

V.M. OLIVEIRA¹, N.F.B. SILVA^{1,2}, B.A.M. COSTA¹ e A.L.F. PORTO¹

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, DMFA, Laboratório de Tecnologia de Produtos Bioativos, LABTECBIO.

² Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Curso de Graduação em Engenharia de Pesca, Departamento de Pesca e Aquicultura. PIBIC CNPq/UFRPE.

E-mail para contato: vagne_melo@hotmail.com

RESUMO – O alto custo na produção de alguns medicamentos tem incentivado a busca por matérias-primas alternativas para a indústria farmacêutica, principalmente aquelas relacionadas com processos de cicatrização. Soluções empregadas na reparação tecidual comumente apresentam collagenases em sua constituição. Sabendo-se que os resíduos da pesca são fontes promissoras de proteases, este trabalho objetivou purificar proteases colagenolíticas de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) usando a partição trifásica (TPP). Para tanto, vísceras intestinais foram maceradas, homogeneizadas, centrifugadas e aquecidas. Em seguida, foram particionadas, na relação extrato e solvente (*t*-butanol) em diferentes proporções (1.0: 0.5, 1.0: 1.0, 1.0: 1.5 e 1.0: 2.0), com concentração fixa de 30% de sulfato de amônia. As variáveis analisadas foram recuperação e fator de purificação. De acordo com os resultados, foram encontrados maior recuperação (122,45 e 111,54%) e fator de purificação (3,37 e 3,06) na interfase (1,0: 0,5) para os ensaios proteolíticos totais e de proteases com atividades colagenolíticas, respectivamente. Os resultados sugerem o uso dessas proteases com propriedades colagenolíticas como fonte alternativa para o segmento farmacêutico visando a preparação de pomadas cicatrizantes de baixo custo e de forma sustentável.

Palavras-chave: enzima, cicatrização, pomadas, resíduos.

ABSTRACT– The high cost of producing some medications has encouraged the search for alternative raw materials for the pharmaceutical industry, especially those related to healing processes. Solutions used in tissue repair commonly present collagenases in their constitution. Knowing that fishery residues are promising sources of proteases, this work aimed to purify collagenolytic proteases from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using three-phase partitioning (TPP). Therefore, intestinal viscera were macerated, homogenized, centrifuged and heated. Then, they were partitioned, in the extract and solvent (*t*-butanol) ratio in different proportions (1.0: 0.5, 1.0: 1.0, 1.0: 1.5 and 1.0: 2.0), with a fixed concentration of 30% ammonium sulfate. The variables



analyzed were recovery and purification factor. According to the results, greater recovery (122.45 and 111.54%) and purification factor (3.37 and 3.06) were found in the interphase (1.0: 0.5) for the total proteolytic assays and proteases with collagenolytic activities, respectively. The results suggest the use of these proteases with collagenolytic properties as an alternative source for the pharmaceutical segment in order to prepare low-cost healing ointments and sustainably.

Keywords: enzyme, healing, ointments, waste.

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Associação Brasileira da Piscicultura (Peixe BR), a tilapicultura (produção de tilápia) lidera o crescimento da produção na piscicultura. Com produção de 432.149 t, a Tilápia representou 57% de toda a piscicultura brasileira em 2019. No ano anterior, a espécie participou com 54,1%. O resultado de 2019 foi 7,96% superior ao de 2018, comprovando a preferência nacional pela espécie (Peixe BR, 2020).

Por ser a espécie de produção mais empregada, tem surgido a preocupação com o destino dos resíduos (cabeça, pele, escamas, barbatanas, nadadeiras, vísceras internas como estômago, intestino, fígado, bexiga natatória, entre outros), que quando descartados inadequadamente, acabam se tornando um problema ambiental grave (Ideia *et al.*, 2019). Em contrapartida, resíduos de peixes têm sido constantemente relatados como fontes promissoras de biomoléculas proteicas, muitas de interesse dos segmentos biomédicos e farmacêuticos, podendo subsidiar esses setores em substituição as matérias-primas de fontes microbianas (muitas de alto custo, causadoras de processos alérgicos e patogênicos), principalmente de proteases, um grupo de enzimas de alta relevância no mercado global de enzimas (Oliveira *et al.*, 2017; Gurumallesh *et al.*, 2019).

As proteases digestivas são enzimas que possuem inúmeras aplicações industriais, vindo dessa premissa sua importância, e podem ser obtidas de diferentes fontes (animal, microbianas, vegetal) (Andevári *et al.*, 2019; Gurumallesh *et al.*, 2019). Dentre as proteases estão: tripsinas, quimotripsinas e collagenases (Oliveira *et al.*, 2017; Bhagwat; Dandge, 2018; Candiotti *et al.*, 2018), facilmente recuperadas a partir dos resíduos da pesca e aquicultura de água doce (Oliveira *et al.*, 2020), de espécies tropicais e neotropicais (Alencar *et al.*, 2003). Comercialmente, as proteases com propriedades colagenolíticas são empregadas nas formulações terapêuticas devido a sua influência no processo de migração celular e também no remodelamento do colágeno, importantes no processo cicatricial (Bhagwat; Dandge, 2018), além disso, na hidrólise do colágeno, gerando fragmentos bioativos, os peptídeos de colágeno (Giordano *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2018; Haq *et al.*, 2020).

Uma das formas de extrair e purificar proteases do pescado tem sido o uso do particionamento em sistema trifásico, conhecido como TPP, em que são utilizados um solvente e um sal (Kuepethkaew *et al.*, 2017; Phong *et al.*, 2018). Assim, este trabalho objetivou extrair e purificar proteases inespecíficas e proteases com atividades colagenolíticas de vísceras intestinais de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), visando sua utilização como matéria-prima alternativa no segmento farmacêutico auxiliando na preparação de soluções cicatrizantes.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Resíduos utilizados como matéria-prima

Os resíduos sólidos orgânicos utilizados foram provenientes de exemplares de tilápia-do-



Nilo (*Oreochromis niloticus*). Vísceras digestivas intestinais (50 g) foram adquiridas na Base de Pesca e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE. As vísceras foram higienizadas e conduzidas acondicionadas em isopor com gelo ao Laboratório de Tecnologia de Produtos Bioativos, LABTECBIO, UFRPE, para serem processadas a posterior. A espécie utilizada está registrada no Patrimônio Genético Brasileiro n°A25441A.

2.2 Preparação do extrato bruto enzimático e dosagem de proteínas totais

A extração de proteases colagenolíticas a partir dos resíduos de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) foi realizada de acordo com por Oliveira *et al.* (2020). A razão de vísceras para tampão de extração (0,05 M de Tris-HCl, pH 7,5, contendo 5 mM de CaCl₂) foi de 1:5 (p/v). Todas as vísceras intestinais recolhidas foram homogeneizadas separadamente durante 5 minutos, em um homogeneizador ajustado a velocidade de 10,000-12,000 rpm (4°C) (IKA RW 20D S32, China). O homogeneizado foi então centrifugado (centrífuga Sorvall Superspeed RC-6, Carolina do Norte, EUA) a 12.000 x g durante 30 minutos (4°C). O sobrenadante foi aquecido a 45°C durante 30 minutos e, em seguida, colocados em gelo para arrefecimento rápido. Sua atividade enzimática foi mensurada antes e após o aquecimento. Este procedimento teve por objetivo desnaturar proteases de baixa resistência térmica e ativar zimogênios trípticos. A concentração de proteína total foi determinada de acordo com Smith *et al.* (1985).

2.3 Atividade proteolítica total

A atividade proteolítica total foi determinada usando o substrato azocaseína, em microplacas e em leitor ELISA. Em duplicata, utilizando tubos de microcentrífuga, 50 µl de azocaseína a 1% (p/v) (Sigma), preparado em 0,2 M Tris-HCl pH 7,5, foi incubado com 30 µL de extrato por 60 minutos a 25 °C. Adicionalmente, 240µL de 10% (p/v) de ácido tricloroacético (TCA) foram adicionados para parar a reação. Após 15 minutos em repouso, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 8,000 x g. Em seguida, 70 µl do sobrenadante foram adicionados a 130 µL de NaOH 1 M em uma placa de ELISA e a absorbância da mistura foi mensurada a 450 nm. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima para hidrolisar a azocaseína, dando um aumento de 0,001 unidades de absorbância por minuto (Alencar *et al.*, 2003).

2.4 Determinação da atividade colagenolítica

As propriedades colagenolíticas foram determinadas de acordo com Oliveira *et al.* (2019), usando azocoll como substrato. Uma mistura de reação, que contém 5 mg de azocoll, 500µl de 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) que continha CaCl₂ 5 mM e 500 µl de extrato enzimático, foram incubados a 55°C durante 30 minutos, sob agitação constante e em triplicata. Posteriormente, foram adicionados 200µl de ácido tricloroacético (TCA) e incubadas para parar a reação. Após 10 minutos, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g durante 10 minutos a 4°C. A leitura da amostra foi realizada com espectrofotômetro em um comprimento de onda de 520 nm.

2.5 Purificação usando o particionamento em sistema trifásico (TPP)

A TPP foi realizada conforme descrito por Oliveira *et al.* (2020). O efeito da relação de extrato bruto em *t*-butanol foi estudado. Inicialmente, o *t*-butanol foi adicionado ao extrato nas diferentes proporções (v/v) do extrato bruto em *t*-butanol (1,0: 0,5; 1,0:1,0; 1,0:1,5 e 1,0:2,0), com uma concentração constante de (NH₄)₂SO₄ de 30% (p/v). A solução foi bem misturada e submetida à centrifugação a 5,000 × g durante 10 minutos para facilitar a separação das fases. A camada

aquosa inferior e o precipitado interfacial foram recolhidos e dialisados em água destilada durante a noite a 4°C. Após a diálise, as amostras foram analisadas quanto à atividade de proteases totais, o teor de proteína total e a atividade colagenolítica.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato bruto obtido após as etapas de maceração, homogeneização, centrifugação e aquecimento dos resíduos viscerais de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) apresentou valores de proteínas totais, atividade proteolítica total, atividade colagenolítica volumétrica e a específica de 2,75 mg/mL, 8,47 U/mL, 372,66 U/mL e de 135,51 U/mg, respectivamente. Esses valores foram tomados como parâmetros comparativos durante o processo de purificação usando o sistema de partição em suas fases aquosas (SDFA), partição trifásica (TPP) através da razão extrato bruto / solvente (*t*-butanol), e os métodos cromatográficos empregados.

De acordo com os dados, foram encontrados maior recuperação (122,45 e 111,54%) e fator de purificação (3,37 e 3,06) na interfase da razão 1,0: 0,5 para os ensaios com proteases e com proteases com atividades colagenolíticas, respectivamente. A proporção de solvente necessário para a recuperação de proteases totais e de proteases com atividades colagenolíticas pode ser visualizada na Figura 1.

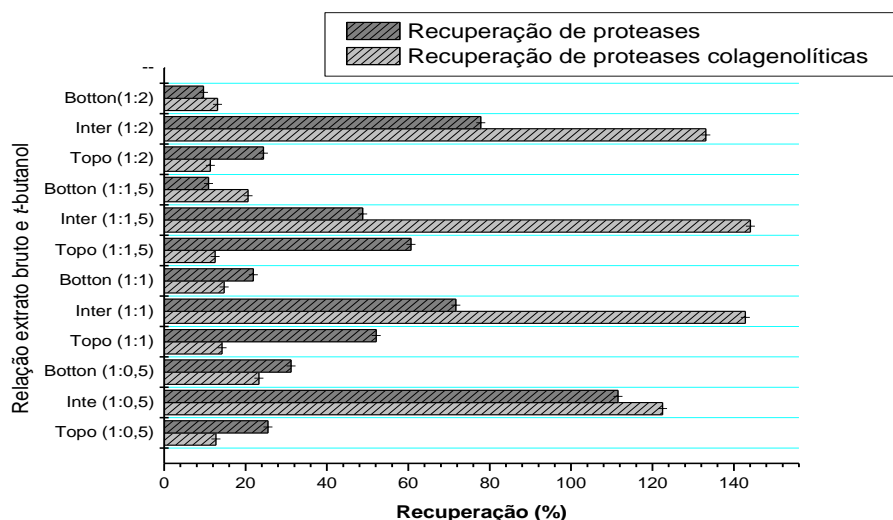


Figura 1 – Recuperação de proteases totais e de proteases com atividades colagenolíticas usando a partição trifásica.

Foi observado durante os ensaios que o aumento da concentração de solvente contribuiu para com a diminuição no valor de recuperação e, principalmente, no fator de purificação tanto das proteases inespecíficas quanto da protease com atividade colagenolítica analisadas, como pode ser visualizado na Figura 2. Para ambas as situações, o menor volume de solvente contribuiu para melhor precipitação das proteínas e assim o particionamento facilitando a separação das moléculas-alvo, muito devido aos efeitos sinérgicos do aumento da concentração do *t*-butanol e a saturação do (NH₄)₂SO₄(Singh *et al.*, 2001).

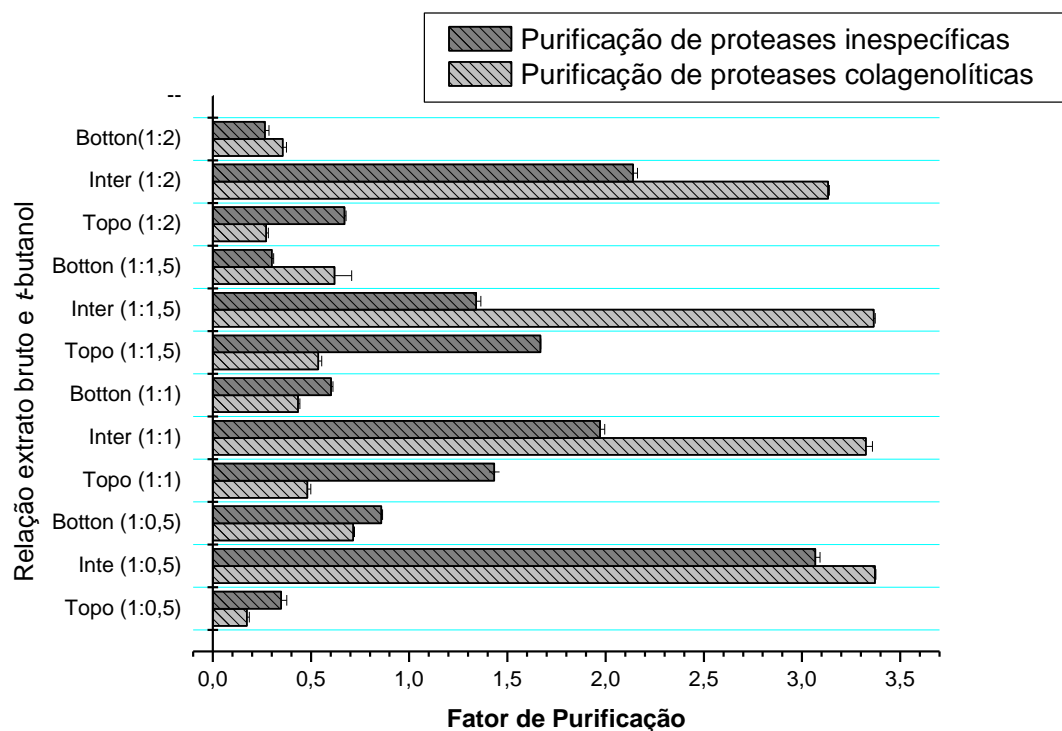


Figura 2 – Fator de purificação das proteases inespecíficas e de proteases com propriedades colagenolíticas usando a partição trifásica.

Resultados similares foram encontrados no particionamento trifásico de proteases a partir de vísceras de peixe-gato gigante (*Pangasianodon gigas*) em que a razão extrato bruto /*t*-butanol ideal foi 1,0: 0,5 (Rawdkuen *et al.*, 2012) e no particionamento de proteases colagenolíticas de tucunaré (*Cichla ocellaris*) na mesma razão extrato bruto/*t*-butanol (Oliveira *et al.*, 2020), indicando a potencialidade desse do TPP na recuperação de proteases tendo como matéria-prima as vísceras intestinais descartadas no beneficiamento da indústria aquícola.

4. CONCLUSÃO

Proteases de interesse farmacêutico foram extraídas e purificadas com sucesso usando a partição trifásica. A técnica utilizada mostrou-se útil e valiosa, podendo ser empregada em larga escala. Ainda, com essa prática, é possível agregar valor aos resíduos da exploração pesqueira e fornecer ao mercado global de proteínas uma fonte alternativa e sustentável de proteases e de proteases com propriedades colagenolíticas, um tipo de enzima altamente requerida em processos cicatriciais.

5. REFERÊNCIAS

ALENCAR, R.B.; BIONDI, M.M.; PAIVA, P.M.G.; VIEIRA, V.L.A.; CARVALHO, L.B. JR.; BEZERRA, R.S. Alkaline proteases from digestive tract of four tropical fishes. *Braz. J. Food*



Technol., v.6, n.2, p. 279–284, 2003.

ANDEVARI, G. T.; REZAEI, M.; TABARSA, M.; RUSTAD, T. Extraction, partial purification and characterization of alkaline protease from rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*) viscera. *Aquaculture*, v.500, p.458-463, 2019.

BHAGWAT, P.; DANDGE, P. Collagen and collagenolytic proteases: A review. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, v.15, p. 43-55, 2018.

CANDIOTTO, F. B.; FREITAS-JÚNIOR, A. C. V.; NERI, R. C. A.; BEZERRA, R. S.; RODRIGUES, R. V.; SAMPAIO, L. A.; TESSER, M. B. Characterization of digestive enzymes from captive Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. *Brazilian J. Biol.*, v. 78, n. 2, p.281-288, 2018.

GIORDANO, D.; COSTANTINI, M.; COPPOLA, D.; LAURITANO, C.; NÚÑEZ PONS, L.; RUOCCO, N.; DI PRISCO, G.; IANORA, A.; VERDE, C. Biotechnological applications of bioactive peptides from marine sources. *Adv. Microb. Physiol.*, v. 73, p.171-220, 2018.

GURUMALLESH, P.; ALAGU, K.; RAMAKRISHNAN, B.; MUTHUSAMY, S. A systematic reconsideration on proteases. *Int. J. Biol. Macromol.*, v.128, p. 254-256, 2019.

HAQ, M.; HO, T.C.; AHMED, R.; GETACHEW, A.T.; CHO, Y.-J.; PARK, J.-S.; CHUN, B.-S. Biofunctional properties of bacterial collagenolytic protease-extracted collagen hydrolysates obtained using catalysts-assisted subcritical water hydrolysis. *J. Ind. Eng. Chem.*, v.81, p.332-339,2020.

IDEIA, P.; PINTO, J.; FERREIRA, R.; FIGUEIREDO, L.; SPÍNOLA, V.; CASTILHO, P. C. Fish processing industry residues: A review of valuable products extraction and characterization methods. *Waste and Biomass Valori.*, p. 1-24, 2019.

KUEPETHKAEW, S.; SANGKHARAK, K.; BENJAKUL, S.; KLOMKLAO, S. Use of TPP and ATPS for partitioning and recovery of lipase from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hepatopancreas. *J. Food Sci. Technol.*, v. 54, p. 3880–3891, 2017.

OLIVEIRA, V.M.; NASCIMENTO, T.P.; ASSIS, C.R.D.; BEZERRA, R.S.; PORTO, A.L.F. Study on enzymes of industrial interest in digestive viscera: Greater amberjack (*Seriola dumerili*). *J. Coast. Life Med.*, v. 5, n. 6, p. 233-238, 2017.

OLIVEIRA, V.M.; ASSIS, C.R.D.; SILVA, J.C.; SILVA, Q.J.; BEZERRA, R.S.; PORTO, A. L.F. Recovery of fibrinolytic and collagenolytic enzymes from fish and shrimp byproducts: potential source for biomedical applications. *Bol. Inst. Pesca*, v. 45, p. 1-10, 2019.

OLIVEIRA, V.M.; CUNHA, M.N.C.; ASSIS, C.R.D.; SILVA, J.M.; NASCIMENTO, T.P.;



SANTOS, J.F.; DUARTE, C.A.L.; MARQUES, D.A.V.; BEZERRA, R.S.; PORTO, A.L.F. Separation and partial purification of collagenolytic protease from peacock bass (*Cichla ocellaris*) using different protocol: Precipitation and partitioning approaches. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, p. 101509, 2020.

PEIXE BR - Associação Brasileira da Piscicultura. *Anuário 2020 Peixe BR da Piscicultura*. 136 p. Disponível em: <<https://www.peixebr.com.br/anuario-2020/>>. Acesso em: 23 maio. 2020.

PHONG, W.N.; SHOW, P.L.; CHOW, Y.H.; LING, T.C. Recovery of biotechnological products using aqueous two phase systems. *J. Biosci. Bioeng.*, v. 16, p. 273–281, 2018.

RAWDKUEN, S.; VANABUN, A.; BENJAKUL, S. Recovery of proteases from the viscera of farmed giant catfish (*Pangasianodon gigas*) by three-phase partitioning. *Process Biochem.*, v. 47, n.12, 2566–2569, 2012.

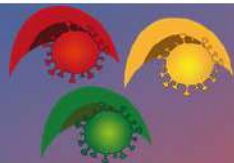
SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, v.150, n. 1, p. 76–85, 1985.

SINGH, R.K.; GOURINATH, S.; SHARMA, S., ROY, I.; GUPTA, M.N.; BETZEL, C.; SRINIVASAN, A.; SINGH, T.P. Enhancement of enzyme activity through three-phase partitioning: crystal structure of a modified serine proteinase at 1.5 Å resolution. *Protein Eng Des Sel*, v.14, n.5, p.307–313, 2001.

WU, R.B.; WU, C.L.; LIU, D.; YANG, X.H.; HUANG, J.F.; ZHANG, J.; LIAO, B.; HE, H.L. Antioxidant and anti-freezing peptides from salmon collagen hydrolysate prepared by bacterial extracellular protease. *Food Chem.*, v. 248, p. 346–352, 2018.

6. AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – código 88887.175810/2018-00. Os autores agradecem também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Universidade Federal Rural de Pernambuco pela bolsa de PIBIC de Nilson Silva.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

DETECÇÃO IMPEDIMÉTRICA DE MICRORGANISMOS BASEADA EM NANOTUBOS DE CARBONO E TEMPORINA PTA

D. O. BARBOSA¹, A. G. SILVA JUNIOR^{1,2}, S. R. SÁ¹, R. G. LIMA-NETO³, L. MIGLIOLO⁴,
M. D. L. OLIVEIRA^{1,2} e C. A. S. ANDRADE^{1,2}

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica, Recife/PE, Brasil;

² Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, UFPE, Recife/PE, Brasil;

³ Departamento de Medicina Tropical, UFPE, Recife/PE, Brasil;

⁴ Universidade Católica Dom Bosco, UCDB, Campo Grande/MS, Brasil.

E-mail para contato: diegoolibar3@gmail.com

RESUMO – Apesar do constante avanço na área médica e biomédica, infecções hospitalares continuam sendo uma ameaça à saúde pública a nível mundial. Pacientes em permanência prolongada no ambiente clínico e constante uso de dispositivos invasivos como cateteres apresentam maior risco de infecção por microrganismos como bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, resultando em quadro clínico piorado, e nos casos mais graves, morte. Visando trazer uma nova perspectiva de detecção de microrganismos diante das técnicas tradicionais como meios de cultura e métodos imunoenzimáticos, biossensores eletroquímicos surgem como alternativa inovadora. No presente trabalho uma plataforma biossensora constituída por monocamadas automontadas de cisteamina (CYS), nanotubos de carbono multicamadas (MWCNTs) e peptídeo antimicrobiano temporina-PTA (T-PTA) foi desenvolvida, com objetivo de detectar bactérias em amostras líquidas. A técnica espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e voltametria cíclica (VC) foram utilizadas na avaliação da montagem do sensor e na detecção microbiana. Os resultados eletroquímicos indicaram limite de detecção de 10 unidades formadoras de colônia por mL ($UFC\ mL^{-1}$) para *Acinetobacter baumannii* e *Bacillus subtilis*, destacando a proposta submetida como promissora alternativa complementar às técnicas de detecção de microrganismos, provando ser estável e sensível na detecção de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Palavras-chave: Sensor; microrganismo; T-PTA; impedância; voltametria.

ABSTRACT - Despite constant advances in the medical and biomedical fields, hospital infections remain a worldwide threat to public health. Long-term patients in the clinical setting and constant use of invasive devices such as catheters report an increased risk of infection by microorganisms



*such as Gram-positive and Gram-negative bacteria, resulting in a worsening of clinical status, and in the most severe cases, death. In order to bring a new perspective for the detection of microorganisms against traditional techniques such as culture media and immunoenzymatic methods, electrochemical biosensors appear as an innovative alternative. In the present work, a biosensor platform consisting of self-assembled monolayers of cysteamine (CYS), multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) and the antimicrobial peptide temporin-PTA (T-PTA) was developed, aiming to detect bacteria in liquid samples. The electrochemical impedance spectroscopy (EIE) and cyclic voltammetry (VC) technique were used in the evaluation of the sensor assembly and in the microbial detection. The electrochemical results showed a limit of detection of 10 colony-forming units per mL (CFU mL⁻¹) for *Acinetobacter baumannii* and *Bacillus subtilis*, highlighting the proposal as a promising alternative to complement microorganism detection techniques, proving to be stable and sensitive in the detection gram-positive and gram-negative bacteria.*

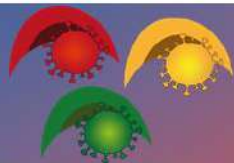
Keywords: Sensor; microorganism; T-PTA; impedance; voltammetry.

1. INTRODUÇÃO

Infecções hospitalares (IH) são conhecidas como infecções adquiridas no ambiente hospitalar, ou outras instituições de saúde, por pacientes sob tratamento médico. Frequentemente, dispositivos invasivos como cateteres, equipamentos de ventilação mecânica, sondas, etc. são os mais associados a casos de IH, entretanto, o transporte de microrganismos na relação médico-paciente ou paciente-parente que não passaram por sanitização adequada das mãos também se destacam como uma maneira de contribuir com o agravamento do quadro clínico do paciente. Como resultado, o tempo prolongado no ambiente acarretará em maior probabilidade de coinfeções e aumento nos gastos públicos (e privados) de insumos em saúde (KHAN; AHMAD; MEHBOOB, 2015; LAX; GILBERT, 2015). Portanto, se torna essencial o desenvolvimento de novos métodos para detecção da presença de microrganismos em ambientes hospitalares.

As técnicas convencionais de detecção de microrganismos como cultivo de bactérias em meios de cultura, testes bioquímicos, ensaios imunoenzimáticos como o *ELISA* e testes moleculares para o cultivo microbiano são necessários de 24 a 72 horas para um resultado parcial, além da frequência de reações cruzadas em testes utilizando enzimas, além do custo elevado de testes como a reação em cadeia de polimerase (PCR) (LÓPEZ et al., 2009; TERATO et al., 2014). Na busca por alternativas que apresentem sensibilidade, rápida detecção e baixo-custo, biossensores trazem uma perspectiva inovadora e aplicável na detecção de microrganismos de interesse clínico (FURST; FRANCIS, 2019).

Biossensores eletroquímicos são dispositivos analíticos caracterizados pela simplicidade, elevada sensibilidade, rápida detecção de analitos e possibilidade de miniaturização, uma vez que utilizam em sua constituição nanopartículas e moléculas bioativas (ENSAFI, 2019). Basicamente, um biossensor é constituído por um elemento sensor biológico, com objetivo de interagir diretamente com o analito-alvo e um transdutor físico-químico, cujo papel é produzir um sinal elétrico proporcional a concentração do analito presente na amostra clínica. Como elementos sensores, as opções mais utilizadas envolvem anticorpos, oligonucleotídeo, DNA/RNA, enzimas, proteínas e peptídeos (PERUMAL; HASHIM, 2014). Em adição, a integração de nanopartículas como as de ouro (AuNPs), prata (AgNPs), nanotubos de carbono multicamadas (MWCNTs) etc. auxiliam na condução da corrente elétrica entre a sonda redox (frequentemente abordando o uso



da solução de ferro-ferricianeto de potássio) e o substrato sensor, resultando em aumento na sensibilidade da técnica eletroquímica (MINEA, 2019). Dentre as moléculas biológicas para imobilização no transdutor, podemos destacar os peptídeos antimicrobianos (PAM) para identificação de bactérias.

PAM são componentes do sistema imune inato de diversos animais, insetos, vegetais, etc. Adentrando uma era “pós antibiótica”, visando a utilização de novas estratégias no combate a resistência a antimicrobianos, PAMs se destacam como opção viável e efetiva no combate a microrganismos (MAHLAPUU et al., 2016). Além da reconhecida atividade antimicrobiana, PAMs dispõem de propriedades imunomodulatórias e na área diagnóstica, descobriu-se sua capacidade de aplicação como elementos de biorreconhecimento em biossensores, principalmente no que diz respeito a detecção de microrganismos (HOYOS-NOGUÉS; GIL; MAS-MORUNO, 2018). A estrutura altamente catiônica desses peptídeos tem elevada afinidade com a membrana de microrganismos, carregada negativamente, resultando na interação entre si. Tais características de permeabilização da membrana bacteriana foi abordada em diferentes trabalhos, almejando a detecção eletroquímica de microrganismos de interesse clínico utilizando PAM como elementos sensores (ANDRADE et al., 2015; SILVA JUNIOR et al., 2018).

Dessa forma, o trabalho proposto teve como objetivo o desenvolvimento de uma plataforma biossensora baseada em monocamadas automontadas de cisteamina (CYS), MWCNTs e o PAM temporina-PTA (T-PTA) para a detecção de bactérias em amostras líquidas, utilizando pequena quantidade da amostra (5µL). Os microrganismos empregados no estudo foram o *Bacillus subtilis* (Gram-positivo) e *Acinetobacter baumannii* (Gram-negativa). A interação T-PTA/bactéria foi avaliada através das técnicas voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

CYS, MWCNTs, 1-etil-3-(3dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS) foram adquiridos pela Sigma-Aldrich (EUA). O ferri ($K_3[Fe(CN)_6]$) e ferrocianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]$), fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico foram obtidos da VETEC (Brasil). O T-PTA (FFGVLKLIPKIL-NH₂) foram prospectados e passaram por um processo de síntese baseando-se na técnica N-9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) e posteriormente purificado por método cromatográfico (HPLC). Água deionizada ultrapura foi utilizada durante todas etapas experimentais, sendo obtida pelo sistema de purificação Milli-Q (Billerica, EUA).

Montagem da plataforma biossensora

O eletrodo de trabalho com disco de ouro ($\phi = 2$ mm) passou por um processo de limpeza utilizando NaClO (~ 15 min), seguido de banho ultrassônico em água deionizada. Tal processo tem como objetivo retirar impurezas da superfície de ouro para que haja um recobrimento efetivo pelos componentes do sistema sensor. Em seguida, foi realizada uma análise via VC e EIE. Após a obtenção de um voltamograma padrão e espectro de impedância de eletrodo com superfície de ouro limpo, a montagem do biossensor foi iniciada.

A modificação da superfície do eletrodo de trabalho inicia-se com a imersão do mesmo em uma solução de CYS (20 mM), onde foi avaliada a formação de monocamadas automontadas em



diferentes períodos de tempo. Em seguida, houve a adição das MWCNTs por 20 min (100 mg.mL), onde os agentes acopladores EDC:NHS foram aplicados por 5 minutos para ativação dos grupos carboxílicos livres se ligarem aos grupamentos amina livres na monocamada de CYS. Finalmente, o T-PTA (1 mg mL⁻¹) foi adsorvido ao eletrodo (10 min) contendo a camada de CYS_MWCNTs. EDC:NHS foram novamente utilizados, viabilizando uma ligação estável entre as MWCNTs carboxiladas e aminas livres na estrutura peptídica. Por fim, o sistema sensor CYS_MWCNTs_T-PTA pôde ser direcionado aos testes de biorreconhecimento de microrganismos.

Cultura bacteriana e experimentos eletroquímicos

As bactérias *A. baumannii* e *B. subtilis* foram semeadas em ágar Mueller Hinton (24 h, 37°C). Em seguida, as células bacterianas foram colhidas, lavadas e ressuspendidas em solução salina esterilizada (0,9%), onde também foram divididas em diferentes concentrações (10¹ a 10⁶) de unidades formadoras de colônia por mL (UFC mL⁻¹), seguindo a escala de McFarland por meio de um espectrofotômetro (densidade óptica 600 nm – OD600).

A avaliação eletroquímica de reconhecimento microbiano foi realizado gotejando os microrganismo nas concentrações citadas durante 10 min (24 °C ± 2 °C). Após o tempo determinado, o eletrodo é lavado com água deionizada para remoção das células não ligadas, sendo, portanto, finalmente aos testes de VC e EIE.

O estudo foi realizado utilizando um potenciostato/galvanostato µAutolab PGSTAT 128N (Ecochemie, Holanda) utilizando o software NOVA 1.11 e o programa OriginPro8 para análise dos gráficos. Os experimentos foram realizados em uma célula eletroquímica contendo 20 mL de 10 mM [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻ (1:1, v/v) utilizado como par redox, onde foram imersos três eletrodos: eletrodo de trabalho com superfície de ouro (substrato de montagem do biossensor), eletrodo de referência de Ag/AgCl saturado em KCl 3M e contra-eletrodo de platina, se encontrando no interior de uma gaiola de Faraday para maior estabilidade dos testes. As análises voltamétricas foram realizadas no potencial -0,2 a 0,7 V (velocidade de varredura = 50 mV s⁻¹) e as análises impedimétricas ocorreram na frequência de 100 mHz a 100 kHz e potencial de onda senoidal de 10 mV.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre diversas técnicas utilizadas para o desenvolvimento de biossensores, podemos destacar a VC e EIE. Tais técnicas permitem obter informações das reações eletroquímicas que ocorrem na interface eletrodo-solução. Desta forma, VC e EIE são ferramentas úteis no processo de avaliação de modificação de superfície de eletrodos.

O processo de montagem do sistema sensor pode ser observado na Fig. 1. Inicialmente, foram realizados estudos de adsorção da CYS em diferentes molaridades e diferentes períodos de tempo. As análises indicaram 20 mM e 15 min de adsorção a concentração e tempo ideal para saturação da superfície do eletrodo e obtenção da monocamada automontada de CYS. Pode-se observar uma diminuição dos picos catódicos e anódicos após a adsorção da CYS (voltamograma vermelho, Fig. 1a) e aumento do semicírculo de Cole-Cole (curva vermelha, Fig. 1b), causada pela forte ligação do grupo tiol (-SH) a superfície de ouro, ação desencadeada por um processo de quimissorção espontânea com perda do hidrogênio molecular, resultando na ligação Au-S (XUE et al., 2014).

Em seguida, os agentes EDC NHS foram utilizados visando a ativação do grupo carboxílico dos MWCNTs para uma ligação mais estável aos grupamentos amina livres na CYS recobrando o

ouro do eletrodo. Devido às cargas neutras do éster NHS, associado a condutividade das nanopartículas utilizadas, a resposta voltamétrica resultou no aumento dos picos anódicos e catódicos (voltamograma verde, Fig. 1a) e redução do diâmetro do semicírculo (curva verde, Fig. 1b) (KELEŞTEMUR; ALTUNBEK; CULHA, 2017). Por fim, após a nova adição do EDC:NHS para promover uma ligação estável dos grupos carboxílicos do MWCNTs aos grupamentos amina do N-terminal do T-PTA, resultando nos picos de oxidação e redução (voltamograma azul, Fig. 1a) e na diminuição no espectro impedimétrico (curva azul, Fig. 1b).

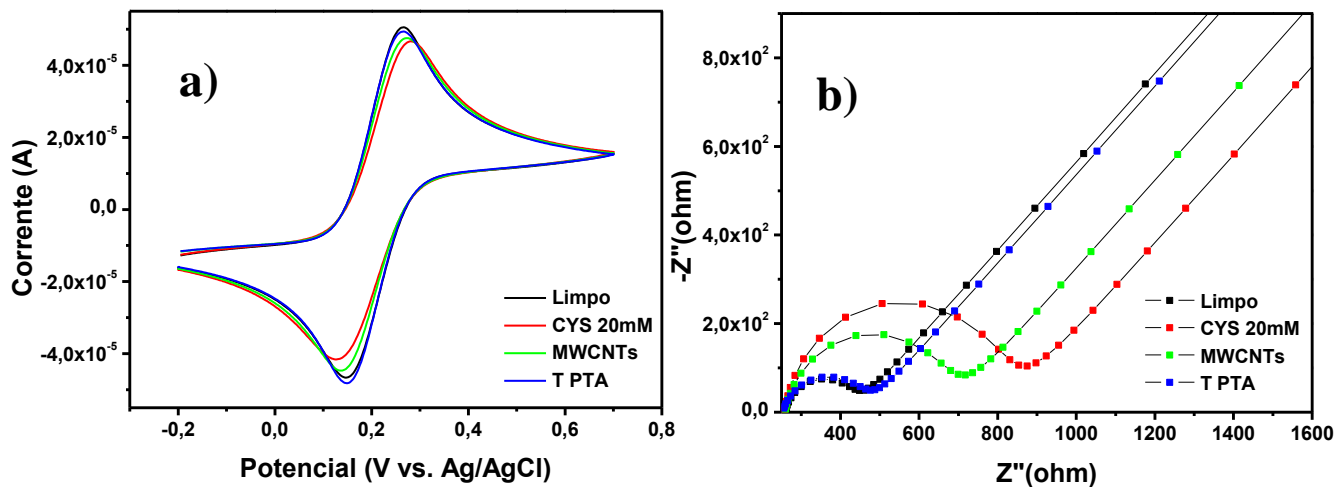


Figura 1 – Avaliação voltamétrica (a) e impedimétrica (b) do processo de montagem do sistema sensor.

Após a comprovação da obtenção da plataforma biossensora CYS_MWCNTs_T-PTA, a mesma foi submetida aos testes de detecção das bactérias *A. baumannii* (Fig. 2a) e *B. subtilis* (Fig. 2b) com avaliação através da EIE.

Como esperado, o diâmetro do semicírculo de Cole-Cole aumenta gradualmente acompanhando o aumento da concentração dos microrganismos (10^1 a 10^5 UFC mL^{-1}). A interação eletrostática inicial entre o peptídeo (catiônico) e bactérias (aniônico) favorece a permeabilidade da parede celular bacteriana, onde o T-PTA com sua estrutura em α -hélice insere-se a membrana fosfolipídica (HOYOS-NOGUÉS et al., 2016; QIAO et al., 2020). Os resultados obtidos indicam maior sensibilidade do sensor para microrganismos Gram-positivas.

Para ambas bactérias, a plataforma sensora CYS_MWCNTs_T-PTA apresentou limite de detecção de 10^1 UFC mL^{-1} , destacando a sua sensibilidade. Diferentes de técnicas de cultivo de bactérias em meios de cultura e testes bioquímicos essa técnica apresenta resultados em poucas horas, sendo indicados para o diagnóstico rápido.

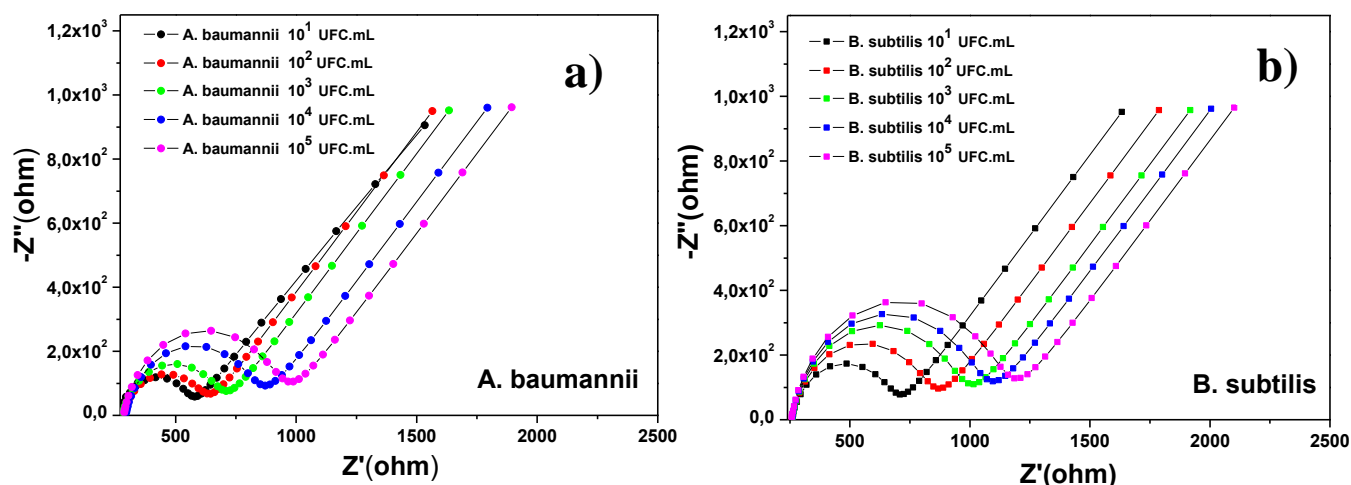


Figura 2 - Avaliação impedimétrica da detecção da bactéria *A. baumannii* (a) e *B. subtilis* (b) pelo sistema sensor CYS_MWCNTs_T-PTA.

4. CONCLUSÃO

A plataforma biossensora formada por monocamadas automontadas de CYS, inserção de MWCNTs e ancoragem do peptídeo T-PTA mostrou-se estável e sensível na detecção de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O limite de detecção apresentado para ambos microrganismos (10^1 UFC mL⁻¹) destacam a sensibilidade do sistema proposto. Novos testes serão realizados com outros microrganismos, incluindo novas espécies de bactérias e fungos patogênicos do gênero *Candida sp.* O biossensor desenvolvido se destaca como promissora alternativa na detecção complementar de microrganismos de interesse clínico.

5. REFERÊNCIAS

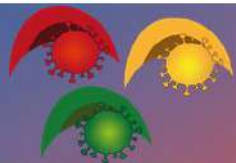
- ANDRADE, C. A. S. et al. Nanostructured sensor based on carbon nanotubes and clavamin A for bacterial detection. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 135, p. 833–839, 2015.
- ENSAFI, A. A. An introduction to sensors and biosensors. In: **Electrochemical Biosensors**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. p. 1–10.
- FURST, A. L.; FRANCIS, M. B. **Impedance-Based Detection of Bacteria** *Chemical Reviews* American Chemical Society, , 9 jan. 2019.
- HOYOS-NOGUÉS, M. et al. Impedimetric antimicrobial peptide-based sensor for the early detection of periodontopathogenic bacteria. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 86, p. 377–385, 2016.
- HOYOS-NOGUÉS, M.; GIL, F. J.; MAS-MORUNO, C. Antimicrobial peptides: Powerful biorecognition elements to detect bacteria in biosensing technologies. **Molecules**, v. 23, n. 7, p. 1–24, 2018.
- KELEŞTEMUR, S.; ALTUNBEK, M.; CULHA, M. Influence of EDC/NHS coupling chemistry on stability and cytotoxicity of ZnO nanoparticles modified with proteins. **Applied Surface Science**, v. 403, p. 455–463, 2017.



- KHAN, H. A.; AHMAD, A.; MEHBOOB, R. Nosocomial infections and their control strategies. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 7, p. 509–514, 2015.
- LAX, S.; GILBERT, J. A. Hospital-associated microbiota and implications for nosocomial infections. **Trends in Molecular Medicine**, v. 21, n. 7, p. 427–432, 2015.
- LÓPEZ, M. M. et al. Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses? **Current issues in molecular biology**, v. 11, n. 1, p. 13–46, 2009.
- MAHLAPUU, M. et al. Antimicrobial peptides: An emerging category of therapeutic agents. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, n. DEC, p. 1–12, 2016.
- MINEA, A. A. A review on electrical conductivity of nanoparticle-enhanced fluids. **Nanomaterials**, v. 9, n. 11, 2019.
- PERUMAL, V.; HASHIM, U. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 12, n. 1, p. 1–15, 2014.
- QIAO, Z. et al. Advances in antimicrobial peptides-based biosensing methods for detection of foodborne pathogens: A review. **Food Control**, v. 112, 2020.
- SILVA JUNIOR, A. G. et al. A simple nanostructured impedimetric biosensor based on clavanin a peptide for bacterial detection. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 255, p. 3267–3274, 2018.
- TERATO, K. et al. Preventing intense false positive and negative reactions attributed to the principle of ELISA to re-investigate antibody studies in autoimmune diseases. **Journal of Immunological Methods**, v. 407, p. 15–25, 2014.
- XUE, Y. et al. Quantifying thiol–gold interactions towards the efficient strength control. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 1–9, 2014.

6. AGRADECIMENTOS

A PROPESQ/UFPE pela bolsa PIBITI. Ao CNPq pelo fomento da pesquisa.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

MEMBRANAS NANOESTRUTURADAS HIERARQUICAMENTE PARA PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS DE ZIKAV

I. A. M. FRIAS^{1,2}, C. A. S. ANDRADE^{1,2} e M. D. L. OLIVEIRA^{1,2}

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica;

² Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica;

E-mail para contato: iamfrias@outlook.com

RESUMO – Neste trabalho apresentamos os resultados das atividades relacionadas com a aplicação prática das membranas desenvolvidas para recuperação de anticorpos. Descrevemos a produção das fibras que foi otimizada em condições controladas de temperatura e umidade, além disso, detalhamos o novo procedimento de reticulação. As membranas foram caracterizadas por espectroscopia no infravermelho (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e sua porosidade foi calculada pelo método de substituição de solvente. O uso das membranas como filtros para seringa foi facilitado pelo uso de uma máquina automática de recorte. A imobilização das estruturas virais foi conseguida pela ativação química dos grupos carbóxilo e sua posterior união às aminas primárias presentes na proteína. Os processos de captura e liberação de anticorpo, assim como os lavados de equilíbrio foram otimizados. A captura específica e dessorção dos anticorpos foram monitorados por espectroscopia de fluorescência. Os nossos resultados mostram que a membrana conjugada covalentemente com a sonda viral foi capaz de recuperar 30 µg de anticorpo anti-ZikaV por ciclo de captura. A dessorção do anticorpo foi conseguida com uma eficiência de 98%. Outrossim, após a dessorção do anticorpo, a membrana pode ser restaurada para continuar com pelo menos 3 ciclos de captura, conseguindo assim capturar até 85 µg de anticorpo.

Palavras-chave: Eletrofiação, nanofibras, imunoglobulinas.

ABSTRACT – In this work, we present the practical application of membranes developed for antibody recovery. We describe the fiber production that has been optimized under controlled conditions of temperature and humidity; in addition, we detail a new crosslinking procedure. The membranes were characterized by infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM) and their porosity was calculated using the solvent replacement method. The use of membranes as syringe filters was facilitated by the use of an automatic clipping machine. Immobilization of viral structures was achieved by chemical activation of the carboxyl groups and



their subsequent union with the primary amines present in the protein. The antibody capture and release processes, as well as the equilibrium washings, have been optimized. The specific capture and desorption of the antibodies were monitored by fluorescence spectroscopy. Our results show that the membrane covalently conjugated to the viral probe was able to recover 30 μg of anti-ZikaV antibody per capture cycle. Desorption of the antibody was achieved with 98% efficiency. Furthermore, after desorption of the antibody, the membrane can be restored to continue with at least 3 capture cycles, thus managing to capture up to 85 μg of antibody.

Keywords: Electrospinning, nanofibers, immunoglobulins.

1. INTRODUÇÃO

Embora o fenômeno da eletrofiação vem sendo explorado tecnologicamente desde os anos 70, nos últimos 10 anos têm aparecido aplicações inovadoras em quanto ao desenvolvimento de membranas de afinidade para captura de organismos celulares e a separação de moléculas biologicamente ativas. Contudo, dado que as membranas são materiais que apresentam uma grande área de contato, seus usos são mais bem direcionados na captura inespecífica de substâncias por complementaridade físico-química às propriedades dos polímeros empregados na eletrofiação (relação catiônica-aniônica, por exemplo).

Em outros trabalhos, os pesquisadores têm conseguido capacidades de captura inespecífica que vão desde 5.6 até 18 μg de proteína/mg de membrana (Ma e Ramakrishna, 2008; Kurimoto et al., 2018). Devido à praticidade oferecida por estes materiais, neste trabalho estudamos a constituição de uma blenda polimérica de PVA/Alginato empregada para criação de membranas de nanofibras eletrofiadas. As membranas foram estabilizadas com um tratamento de reticulação (crosslinking) realizado com glutaraldeído. Após este tratamento, as membranas são dotadas das propriedades físico-químicas e dos grupos químicos necessários para realizar a imobilização covalente das proteínas virais. As membranas serviram para imobilizar a sonda viral pela metodologia EDC/NHS com maior sucesso e reprodutibilidade. Esta membrana PVAIg/PAni/Víriion foi empregada para estudar a captura específica de anticorpos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Reagentes: Poli vinil álcool MW 89000-98000 99% hidrolisado, Alginato de sódio, glicina, hidrócloro de etilcarbodiimida (EDC) e hidróxissuccinimida (NHS) foram comprados da Sigma Aldrich, Estados Unidos. Ácido clorídrico (HCl) e glutaraldeído foram comprados da Dinâmica, Brasil. A sonda viral e o Anticorpo Anti-ZikaV foram recebidos do Departamentos de Virologia e Terapia Experimental do Instituto Aggeu Magalhães.

2.2. Preparo das soluções de PVA/Alginato: A produção de nanofibras PVA + Alginato foi realizada a partir da mistura de duas soluções, uma de PVA e outra de alginato. Para a solução de PVA, 16g de PVA foram solubilizados em 100g de água milli-Q sob aquecimento até 80C. Para a solução de alginato, 2g de alginato foram solubilizados em 100 g de água milli-Q em temperatura ambiente. Finalmente, ambas as soluções foram misturadas na seguintes proporções 10g PVA para 10g alginato, 13.34g da solução de PVA para 6.66g da solução de alginato, e 6.66g PVA para 13.34g alginato.

2.3. Parâmetros de eletrofiação: O sistema de eletrofiação consta de uma fonte de alta tensão, uma placa coletora metálica aterrada recoberta com papel alumínio, e uma agulha de injeção



(spinnerette) cilíndrica 16G sem ponta, conectada a uma mangueira de alimentação acoplada a uma bomba de infusão. A produção de fibras foi realizada em temperatura de 21 °C e entre 40-50% umidade. Os parâmetros de eletrofiação foram ajustados para 24kV, com tempo de processamento de 3-6 horas, numa velocidade de injeção de 0.5µL/min a 1µL/min. A distância de trabalho entre a agulha e a placa coletora foi de 13 cm.

2.4. Reticulação das fibras PVA + Alginato: Para esta etapa foi utilizada uma solução contendo 99 mL de álcool metílico, 1 ml de glutaraldeído 25% e 100 µL de ácido clorídrico 37%. A solução foi resfriada durante 30 min. As nanofibras ainda no papel alumínio foram colocadas na solução e deixadas sob refrigeração. Após 2 dias, as fibras foram retiradas da solução e lavadas com água ultrapura para sua imediata utilização.

2.5. Preparação das membranas: Após o processo de reticulação, as membranas foram enxaguadas com água e imediatamente depositadas sobre um filtro de papel whatman grau 3. As membranas foram colocadas dentro de uma estufa na temperatura de 50 °C por 60 min. Logo depois, foram cortadas em pequenos discos com uma cortadora automática Brother ScanCut CM300 e colocadas num filtro para seringa, onde foi testada sua integridade e capacidade para passagem de água. Permitindo a passagem de água, as amostras foram lavadas com 600 mL de água para retirar o glutaraldeído e detritos da reticulação, a limpeza da membrana foi verificada por espectroscopia UV-Vis entre os comprimentos de onda 200 e 340 nm.

2.6. Caracterização das membranas: A porosidade foi calculada pelo método de substituição de solvente, para isto, as membranas foram cortadas e deixadas a secar dentro de um dessecador por 7 dias. As fibras foram pesadas em dois tempos, a primeira vez secas e logo após terem passado 1h submersas em água para permitir sua completa hidratação. O cálculo foi realizado de acordo à seguinte equação: $\text{Porosidade} = (M_2 - M_1) / \rho V$, onde M1 e M2 são respectivamente a massa da fibra antes e depois a hidratação, ρ é densidade absoluta do solvente de hidratação e V é o volume da fibra hidratada. A composição química das membranas foi caracterizada por espectroscopia de infravermelho de refletância atenuada (FTIR-ATR), usando um espectrofotômetro UVVIS (Shimadzu UV2600) com suporte de um cristal de seleneto de zinco (ZnSe) e medindo a porcentagem de transmitância (%T) de 700 a 4000 cm⁻¹ com um passo de 4 cm⁻¹.

A topografia e morfologia das membranas foi estudada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) realizada em um microscópio Shimadzu Tescan MIRA3.

2.7. Imobilização da sonda viral: As membranas foram funcionalizadas com 800 µL de uma solução EDC 0.05M / NHS 0.1M (1:1) durante 30 min. Passado este tempo, as membranas foram lavadas com 600 mL de água, verificando sua limpeza por UV-Vis. Em seguida, a membrana foi imersa em 500 µL de uma solução 500 µg/mL de sonda viral por 90 min. Finalmente a fibra foi lavada com 600 mL de água ou a té confirmar sua limpeza por Uv-Vis (200-340 nm).

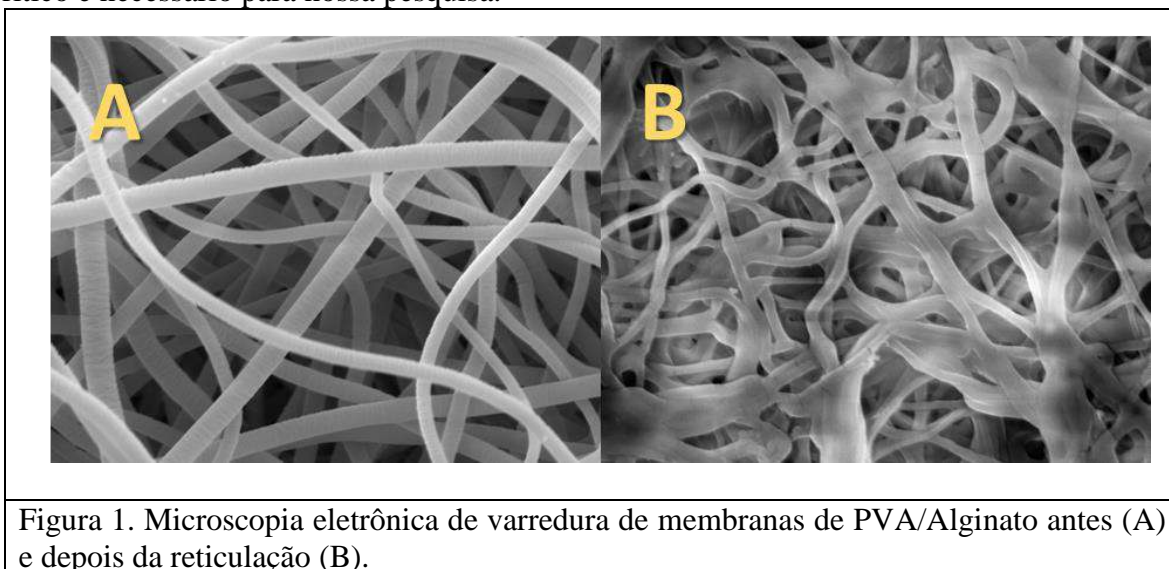
2.8. Captura e Dessorção do anticorpo Anti-ZikaV: A membrana funcionalizada com a sonda viral foi usada como filtro para seringa com a intenção de capturar com ela os anticorpos anti-ZikaV. Inicialmente, a membrana foi exposta a 3 mL de uma solução aquosa de anticorpo anti-ZikaV com uma concentração inicial de 40 µg/mL. A solução foi recirculada várias vezes através da membrana com ajuda de uma seringa e, a cada passagem, a captura foi monitorada por espectroscopia de fluorescência. Após a absorção do anticorpo, a membrana foi lavada com 3mL de água seguindo o mesmo procedimento de recirculação. Posteriormente, a dessorção do anticorpo capturado foi promovida pela passagem repetida de 3mL de uma solução de tampão PBS ajustado em um pH de 3.15 e monitorada igualmente por espectroscopia de fluorescência.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização das membranas PVA/Alginato

A produção de fibras PVA/Alginato sob condições controladas de temperatura e umidade trouxe bons resultados em quanto a qualidade e padronização. Todas as membranas tiveram uma espessura de 0.2 ± 0.01 mm e diâmetro de 14 ± 0.4 cm sem apresentar anéis vazios. Devido à mudança das condições, a caracterização morfológica foi necessária. Na **Figura 1** são apresentadas as imagens obtidas por MEV.

Anteriormente, quando a temperatura e umidade não eram controladas, precisávamos escolher com muita cautela as fibras a serem empregadas em nossos experimentos pois muitas vezes apresentavam defeitos tais como heterogeneidades na área de preenchimento (principalmente encontrados em forma de anéis ou distribuições aleatórias). As microscopias mostradas na **Figura 1** correspondem as fibras antes (1A) e depois da reticulação (1B). Podemos observar que a morfologia encontrada em todas as novas fibras analisadas é muito similar da de aquelas fibras que deviam ser selecionadas com cautela, demonstrando assim que o controle de temperatura e umidade é crítico e necessário para nossa pesquisa.



Do mesmo modo a composição química das fibras se manteve na produção das novas fibras. A **Figura 2** mostra como a banda em 1735 cm^{-1} , característica das vibrações do grupo carbonila fica evidente após o tratamento de reticulação (**Figura 2b**).

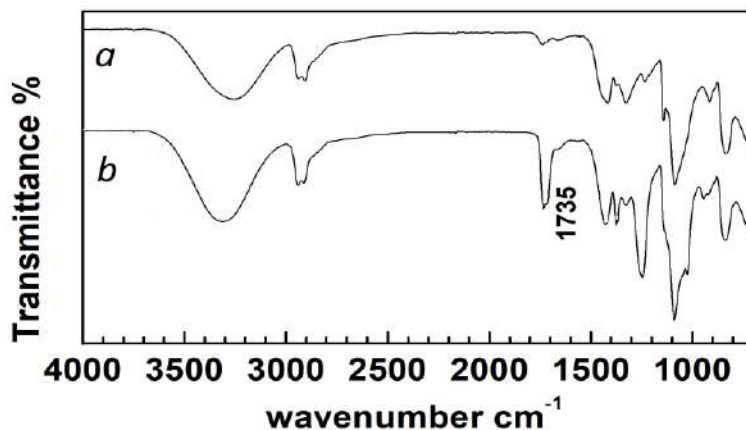
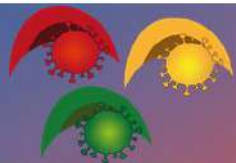


Figura 2. Espectros de transmissão de infravermelho das membranas PVA/Alginato antes (a) e depois da reticulação (b).

O cálculo de porosidade resultou em uma porcentagem de 85.98 ± 0.16 , resultado que também está dentro do esperado. Como nas análises prévias nunca foram obtidas porosidades acima de 90 %, podemos considerar este um bom resultado. Uma alta porosidade está diretamente relacionada com a sua capacidade de processamento de amostra, entre maior a porosidade, maior será sua área e o volume de amostra a ser processado por vez. Isso quer dizer que colunas de captura de anticorpos feitas com este tipo de materiais precisarão de menos material para reter uma maior quantidade de anticorpo.

3.2.Imobilização da Sonda Viral

Para diminuir as diferenças de captura advindas de aumentos drásticos na quantidade de material filtrante, as membranas foram previamente pesadas escolhendo unicamente aquelas com massa de $0.60 \pm 0,02$ g. Para prosseguir com a immobilização da sonda, as membranas foram colocadas dentro de um porta filtro de disco para seringa **Figura 3**. A lavagem com 600 mL de água foi realizada com ajuda de uma seringa de 20mL. Uma vez verificado que não houvesse vazamentos laterais, as fibras foram funcionalizadas preenchendo o porta filtro progressivamente com as soluções descritas na **seção 2.7**. Todas as soluções e lavados foram realizadas sem retirar as membranas do porta filtro.

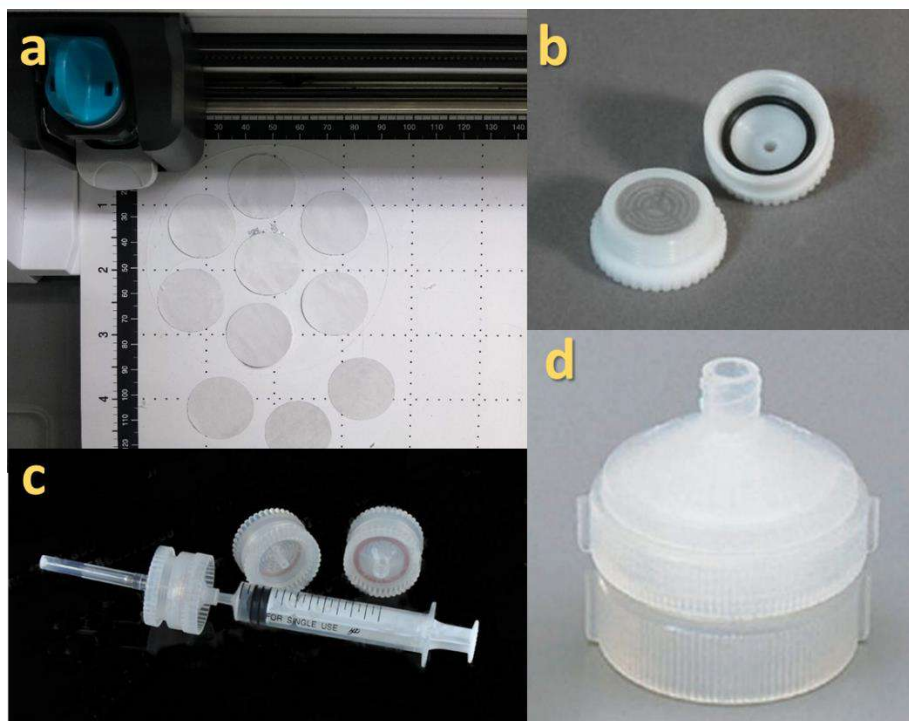


Figura 3. Recorte das membranas reticuladas (a) porta filtro para membrana aberto (b), membrana dentro do porta filtro e com a seringa conectada para realizar o preenchimento, lavado, captura e dessorção (c), preenchido com as soluções de funcionalização (d).

A partir da solução de sonda viral na concentração de $500 \mu\text{g/mL}$, calculamos que $50 \pm 0,5\mu\text{g}$ de sonda foram imobilizados covalentemente na membrana, sendo assim, a razão de imobilização é de $0,08 \mu\text{g}$ de sonda por cada micrograma de membrana filtrante. Em se tratando de um sistema de captura específico 1:1, esta quantidade de massa imobilizada se converte então em nosso limite máximo possível de anticorpo a ser capturado. Finalmente as membranas foram lavadas 3 vezes com 3 mL de água, garantindo ausência de sonda livre pela ausência de fluorescência durante os lavados.

3.3. Captura do anticorpo Anti-ZikaV

As membranas conjugadas com a sonda viral, foram imediatamente empregadas para capturar o anticorpo anti-ZikaV. Na **Figura 4** são mostrados os resultados de captura do anticorpo. Nossos resultados de captura indicam que após 4 passagens da solução de anticorpo, a massa de anticorpo capturado é estabilizada próxima de $30 \mu\text{g}$. O tempo que leva realizar esta captura é menor do que 5 min e, embora não chegue ao máximo esperado de captura ($50 \mu\text{g}$), o material capturado pode ser facilmente recuperado por lavagens em pH ácido, deixando a membrana restaurada para continuar realizando outro ciclo de captura.

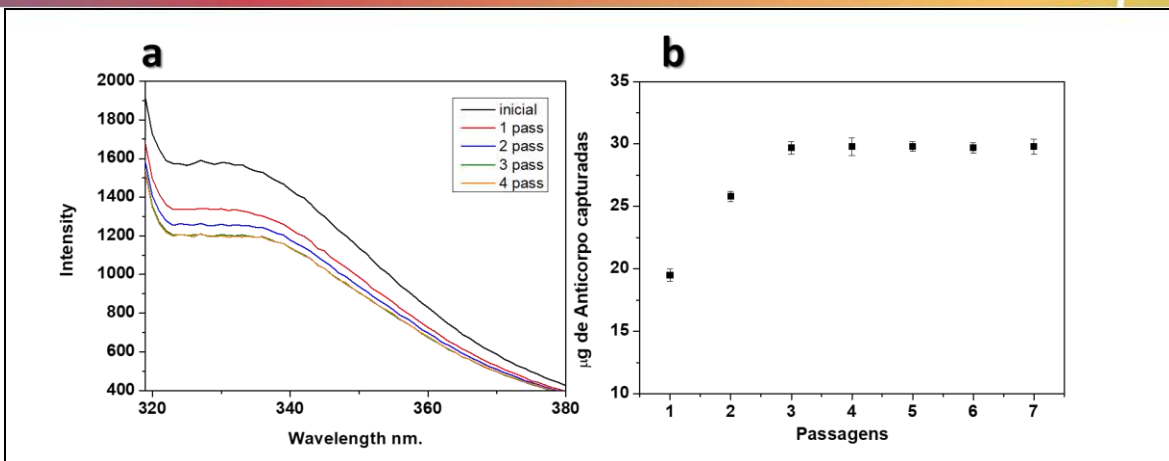


Figura 4. Espectros de fluorescência da solução de anticorpo após cada passagem (a) massa de anticorpo capturada gradualmente após cada passagem (b).

Na **Figura 5** apresentamos os resultados de dessorção do anticorpo capturado. A recuperação do anticorpo foi realizada em 3 mL de PBS ajustado em pH 3.5. O mesmo volume foi recirculado pela membrana para concentrar nele o anticorpo recuperado. Foram necessárias 9 passagens do volume para conseguir recuperar o anticorpo capturado na etapa anterior. O tempo de dessorção é de aproximadamente 5 min, sem contar o tempo necessário para realizar as medidas de fluorescência entre cada passagem. O recuperação de material capturado foi de 98%.

A captura de biomoléculas depende da difusão do material entre os poros, assim, biomoléculas grandes não se movimentam facilmente entre os poros, obrigando a aumentar o percurso de difusão. Esta mudança provoca resistência à transferência de massa, diminuindo assim a eficiência devido a que grandes biomoléculas interagem unicamente com a região central da membrana. Desse modo, a dessorção do anticorpo dificilmente será exatamente de 100 %.

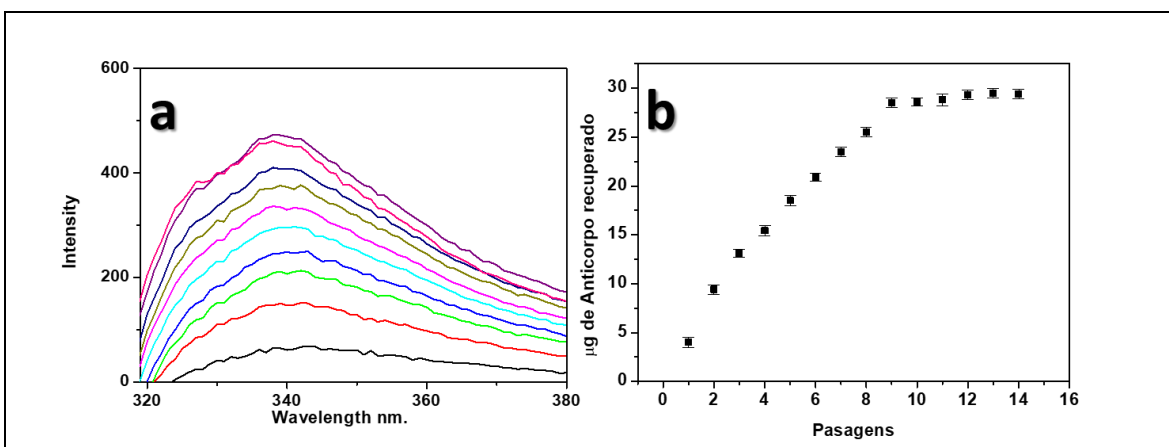
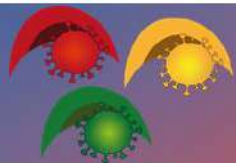


Figura 5. Espectros de fluorescência do volume de PBS pH3.5 usado na dessorção do anticorpo (a) e massa de anticorpo acumulada gradualmente após cada passagem (b).

Após da dessorção, as membranas foram lavadas com 20 mL de PBS pH 3.5, posteriormente com 50 mL de PBS pH 7.24 e finalmente com 50 mL de água para equilibrar a salinidade. Este procedimento foi realizado em cada membrana após cada ciclo de captura. Na **Figura 6** são mostrados os resultados em triplicata do acumulado de anticorpo recuperado após a



captura do anticorpo. Após 3 ciclos de uso da mesma membrana, nossos resultados mostram a factibilidade de usar as novas membranas como dispositivos de captura específica de anticorpos. A cada ciclo de captura, a massa de anticorpo absorvido foi de aproximadamente 30 μg , conseguindo recuperar em três ciclos um total de 85 μg . A membrana apresentou boa resposta de captura durante os três ciclos todavia, o desvio padrão da captura foi incrementando em cada ciclo para $\pm 0.4 \mu\text{g}$, $\pm 0.6 \mu\text{g}$ e $\pm 0.8 \mu\text{g}$ correspondentemente, ao mais provável devido ao desgaste da membrana.

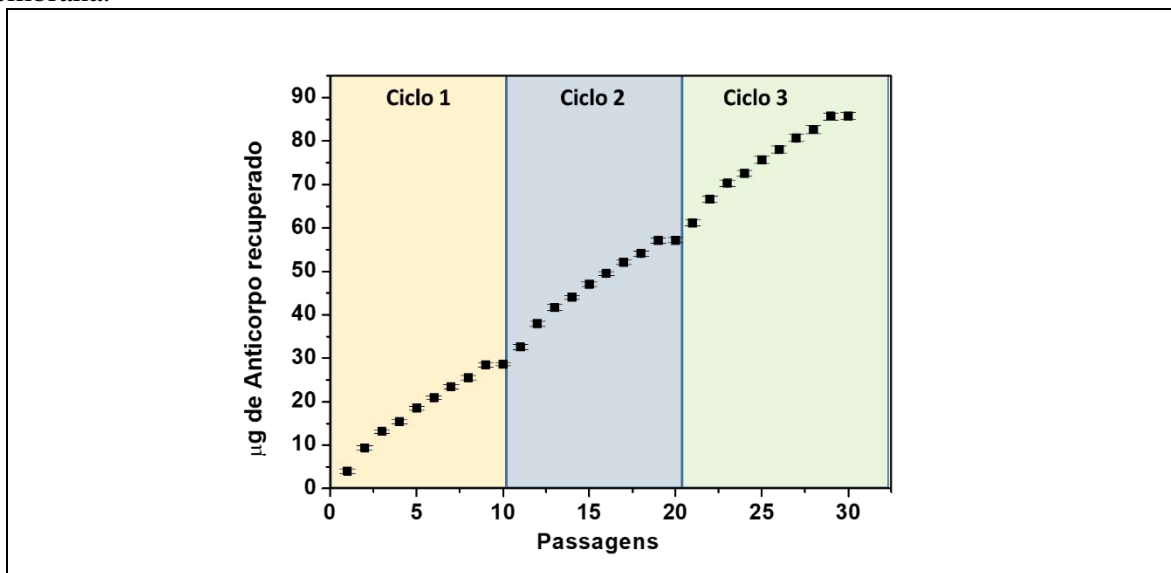


Figura 6. Massa de anticorpo acumulada gradualmente após cada passagem durante três ciclos de equilíbrio, captura e dessorção.

4. CONCLUSÃO

A capacidade de captura das membranas de purificação específica pode ser considerada alta quando comparada com colunas comerciais de purificação de proteínas. Os resultados aqui apresentados são prometedores em quanto a obtenção de um dispositivo que pode ser facilmente implementado e utilizado em laboratórios ou indústrias dedicadas a recuperação de biomoléculas a partir de soluções diluídas. O dispositivo de filtração é de uso facilitado pois é preparado inteiramente no laboratório, sendo unicamente necessário fazer passar a amostra através dele. Os testes de captura de anticorpos a partir de amostras biológicas complexas, tais como soro e sangue são desejáveis para testar o uso real deste tipo de membranas nanoestruturadas.

5. REFERÊNCIAS

KURIMOTO, R. et al. Selective adsorption of globulin on nanofiber meshes for immunoadsorption therapy. *New Journal of Chemistry*, v. 42, n. 4, p. 2916-2922, 2018.

MA, Z.; RAMAKRISHNA, S. Electrospun regenerated cellulose nanofiber affinity membrane functionalized with protein A/G for IgG purification. *Journal of Membrane Science*, v. 319, n. 1-2, p. 23-28, 7/1/ 2008.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos à FACEPE e a CAPES pela bolsa de Pós-Doutorado outorgada no programa PNPd e o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Biotecnologia e Nanotecnologia em Saúde

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO IMPEDIMÉTRICA DE DENGUE BASEADO EM CAPTURA MAGNÉTICA

P. H. W. EMILIANO¹, I. A. M. FRIAS², A. G. SILVA JUNIOR², C. A. S. ANDRADE^{1,2} e M. D. L. OLIVEIRA^{1,2}

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica;

² Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica;

E-mail para contato: cesar.sandrade@ufpe.br

RESUMO – A dengue é uma arbovirose transmitida pela picada do mosquito fêmea de gênero *Aedes*, principalmente das espécies *A. aegypti* e *A. albopictus*. Classificado como doença tropical, este patógeno apresenta alta taxa de morbidade e mortalidade. Neste trabalho, nanopartículas magnéticas foram funcionalizadas covalentemente com a lectina Concanavalina A (NPMagConA) para avaliar sua capacidade de capturar partículas virais dos 4 sorotipos da dengue. Após o processo de captura, o material foi atraído magneticamente em direção ao eletrodo de trabalho do sistema eletroquímico para então realizar a medida impedimétrica. A morfologia superficial das nanopartículas magnéticas foi estudada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) enquanto que o processo de interação entre elas e a lectina foi analisada por espectroscopia UV-visível. A imobilização de ConA e a captura de partículas virais foi estudada por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS). Após tratar as amostras com o sistema NPMagConA, o sistema biossensor exibiu diferentes valores de detecção de resistência à transferência de carga (R_{ct}) para os 4 sorotipos, sendo DENV1 (20,2 k Ω), DENV2 (28,4 k Ω), DENV3 (16,5 k Ω), DENV4 (17,3 k Ω). Nossos resultados apontam que o sistema biossensor desenvolvido é capaz de diferenciar o sorotipo de vírus da Dengue presente nas amostras.

Palavras chave: Dengue, Biossensor, Eletroquímica, Magnetismo.

ABSTRACT – Dengue is an arbovirus transmitted by the bite of the female mosquito of the *Aedes* genus, mainly *A. aegypti* and *A. albopictus*. Classified as a tropical disease, this pathogen presents high morbidity and mortality rates. In this work, magnetic nanoparticles were covalently functionalized with the lectin Concanavalin A (NPMagConA) to evaluate their ability to capture viral particles from the 4 different dengue serotypes. After the capture process, the material was magnetically attracted towards the working electrode of the electrochemical system to then perform the impedimetric measurement. The surface morphology of the magnetic nanoparticles was studied by scanning electron microscopy (SEM) while the interaction process between them and the lectin was analyzed by UV-visible spectroscopy. ConA immobilization and viral particle



capture was studied by electrochemical impedance spectroscopy (EIS). After treating the samples with the NPMagConA system, the biosensor system exhibited different charge transfer resistance (R_{ct}) detection responses for the 4 serotypes, being DENV1 (20.2 k Ω), DENV2 (28.4 k Ω), DENV3 (16.5 k Ω), DENV4 (17.3 k Ω). Our results indicate that our biosensor system is capable of differentiating the serotype of Dengue virus present in the samples.

Keywords: Dengue, Biosensor, Electrochemistry, Magnetic field.

1. INTRODUÇÃO

A dengue é uma arbovirose transmitida pela picada do mosquito fêmea do gênero *Aedes*, principalmente das espécies *A. aegypti* e *A. albopictus*. A dengue compreende quatro sorotipos diferentes (DENV1-2-3-4) e, após a picada de um mosquito fêmea infectado, o vírus passa por um curto período de incubação até o surgimento dos primeiros sintomas, os quais incluem: febre, mialgia, vômitos, trombocitopenia entre outros. Na maioria dos casos, o indivíduo normalmente melhora dentro de três a sete dias, no entanto, algumas vezes a doença pode evoluir para dengue hemorrágica e síndrome do choque, apresentando complicações graves como derrame pleural, danos no sistema nervoso central, comprometimento de órgãos (Simmons et al., 2012). Nos últimos 10 anos este patógeno apresentou alta taxa de morbidade e mortalidade, sendo responsável pela maioria dos casos de infecções ocasionadas por flavivírus.

A infecção ocasionada poder ser diagnosticada pela forte relação que existe entre a severidade da patologia e a carga de partículas virais presentes no tecido (Avirutnan et al., 2006). De acordo com (Pokidysheva et al., 2006) no capsídeo viral do DENV existem dois sítios glicosilados ricos em manose que determinam o processo de virulência (Asn 67 e 153). Ademais, a infecção viral promove a liberação de glicoproteínas não estruturais (NS) características para cada um dos sorotipos virais. Portanto, a identificação dessas glicoproteínas (estruturais ou não estruturais) no diagnóstico clínico-laboratorial da dengue é realizado convencionalmente por meio de ensaios imunoenzimáticos (ELISA), porém seu uso é dificultado pela ocorrência de reações cruzadas com as glicoproteínas de outros arbovírus. Devido a isso, rotinas de diagnóstico baseadas em ensaios moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) vem sendo estabelecidas a nível laboratorial, contudo estes métodos dependem de infraestrutura especializada e pessoal altamente qualificado para serem realizados. Como alternativa, os biossensores são dispositivos compostos por um elemento de transdução com um elemento de reconhecimento biológico incorporado para realizar a detecção de analito biológicos específicos, destacam-se as enzimas, anticorpos, hormônios, lectinas, entre outras. As lectinas são proteínas ou glicoproteínas obtidas principalmente de plantas e bactérias. Estas possuem a capacidade de se ligar a carboidratos simples ou conjugados, fazendo com que as mesmas se tornem ótimas ferramentas para o desenvolvimento de biossensores, (Sharon & Lis 2003).

A Concanavalina A (Con A) é uma lectina glicose-manose, obtida da *Canavalia ensiformis* (feijão de porco) que tem sido empregada com sucesso em estudos de imobilização de proteínas do DENV. Cada monômero apresenta capacidade de ligação com carboidratos e sítios metálicos. Com o avanço da nanotecnologia, a exploração de nanopartículas tem conseguido muito espaço no desenvolvimento de biossensores pois apresentam propriedades químicas, físicas e eletrônicas assim como elevada relação área-volume (Espinoza-Castañeda et al., 2015). Dentre as principais nanopartículas, destacam-se as de óxido de ferro, já que elas possuem características magnéticas já que podem ser recuperadas pela aplicação de campo magnético.



No tocante ao elemento transdutor, o método de impedância eletroquímica tem sido amplamente utilizado devido a seu potencial de detecção assim como a sua capacidade de fornecer informação sobre o processo de bioreconhecimento que ocorre na interface do eletrodo de trabalho (Oliveira et al, 2011). Neste trabalho o objetivo foi desenvolver um biossensor eletroquímico original baseado na detecção impedimétrica de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com ConA empregadas para capturar partículas virais (Figura 1). Para realizar a medida de impedância, agulhas convencionais foram usadas como eletrodo de trabalho e contra eletrodo. Após o processo de captura, o sistema NPMagConA foi atraído magneticamente em direção ao eletrodo de trabalho criando uma interface na ponta da agulha. A presença do material viral capturado nas partículas magnéticas por ação da ConA, propiciou a comparação do sinal elétrico diferenciado para cada um dos sorotipos DENV.

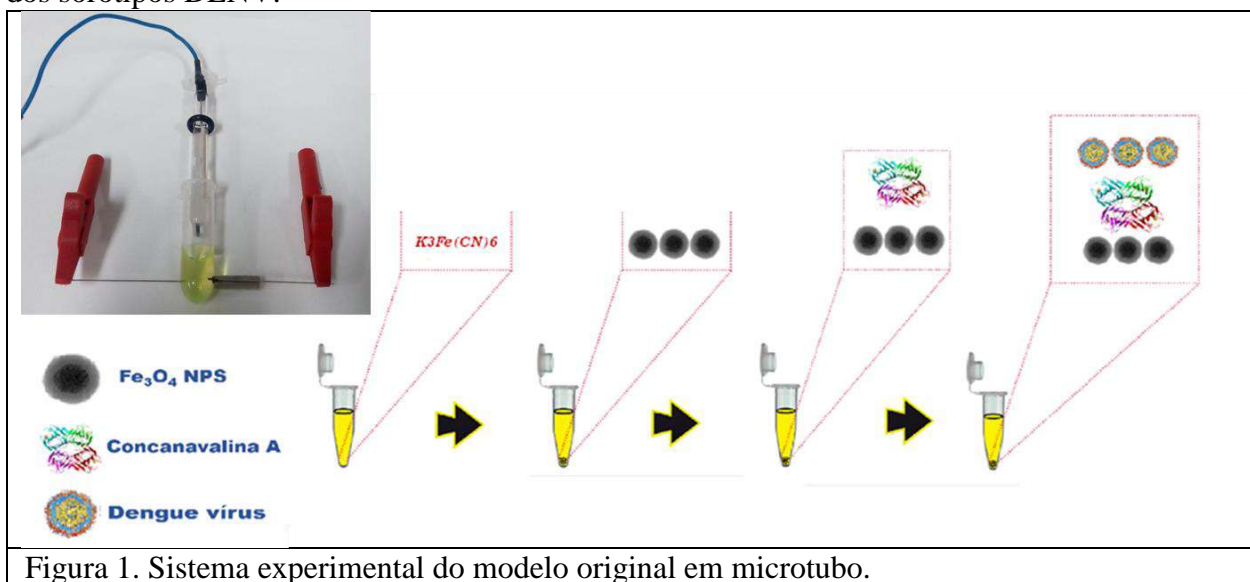


Figura 1. Sistema experimental do modelo original em microtubo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais: Ácido meso-2,3 dimercaptosuccínico (DMSA), 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC), N-hidroxissuccinimida, ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$), concanavalina A, ferrocianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]$), fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) e fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), foram adquiridos da Sigma Aldrich Co. (St Louis, USA). A água ultrapura usada para a preparação das soluções foi obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q Plus (Billerica, EUA). As amostras virais foram cedidas pelo Departamento de Virologia e Terapia Experimental do Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz (Recife, Brasil).

2.2. Síntese e modificação química das partículas magnéticas: As partículas de óxido de ferro (NPMag) foram preparadas adicionando lentamente uma solução de NH_4OH (1,5 M) a uma solução de $FeSO_4:FeCl_3$ (0,1 M: 0,5 M) até obtenção de uma solução escura (pH 8) mantida sob agitação durante 12 h. O material resultante foi separado magneticamente. Para modificação química, 0,01 g de NPMag foram dispersos em uma solução de DMSA (0,3 M) preparada em DMSO (10 mL) e agitada a temperatura ambiente durante 24 h. Passado este tempo, a mistura foi lavada 5 vezes com etanol sob separação magnética para finalmente secar e as partículas a 60 °C durante 12 h.

2.3. Caracterização eletroquímica: A espectroscopia de impedância eletroquímica foi realizada em um Potenciostato/Galvanostato Autolab PGSTAT 128N controlado por um computador através do software de interfaceamento NOVA 1.8 (Metrohm Autolab, The Netherlands). A análise foi realizada dentro de um microtubo contendo 1 mL de uma solução de ferro-ferricianeto de potássio $[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1:1) a 10mM em PBS (pH 7,4), atuando como sonda redox. Os espectros de impedância foram registrados em uma faixa de frequência de 100 mHz a 100 KHz com um potencial de amplitude alternada de 10 mV.

2.4. Ajuste matemático dos resultados impedimétricos: Os dados obtidos durante caracterização de EIS na forma de diagrama de Nyquist foram ajustados matematicamente para um circuito equivalente. Como resultado foram obtidos os parâmetros elétricos dos elementos de circuito que representam a dupla camada elétrica (Resistencia a transferência de carga (R_{ct}), capacitância (C_{dl}) e impedância de Warburg).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Microscopia eletrônica de varredura

Na Figura 2 são apresentadas as imagens capturadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Podemos observar as características morfológicas do material magnético. Fora da fase líquida, a aglomeração de nanopartículas magnéticas resulta na formação de partículas micrométricas.

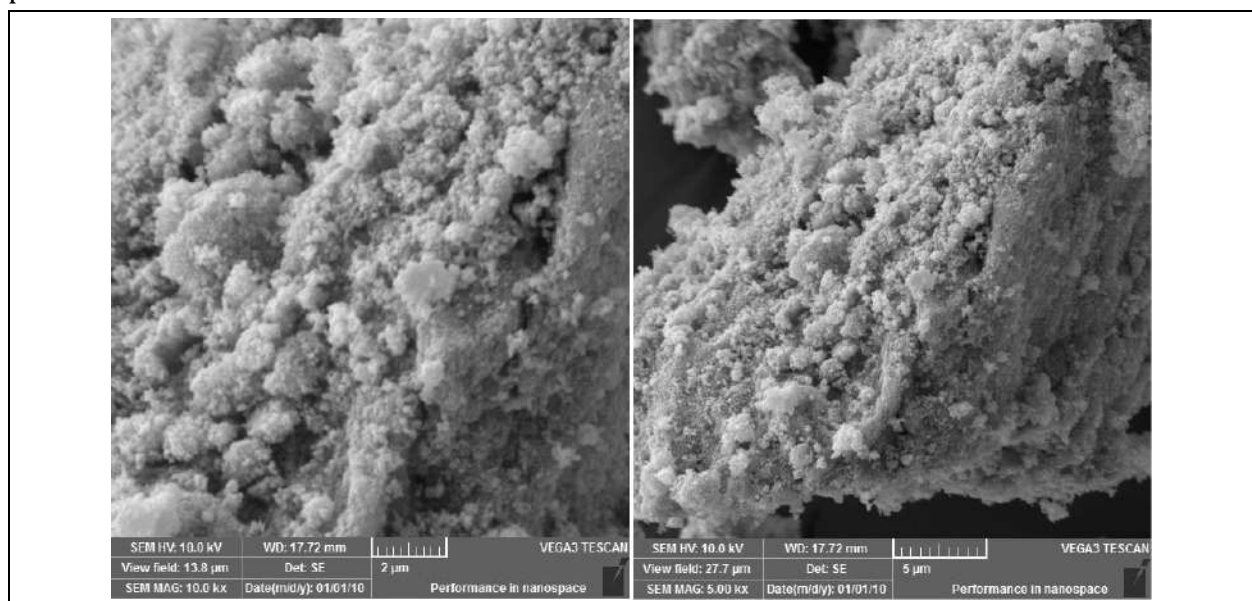


Figura 2 – Microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas magnéticas

3.2. Espectroscopia por UV-visível

Para avaliar a imobilização covalente de ConA na superfície das NPMag, foi criada uma curva de calibração correspondente à absorção de soluções de diferente concentração da lectina. O estudo foi realizado dentro da região de 200 a 400 nm, sendo o máximo de absorção em 280 nm. As curvas obtidas são características do homotetrâmero de ConA, mostrando a integridade da lectina, o gráfico de regressão linear apresentou um valor de r^2 de 0,9976 (B).

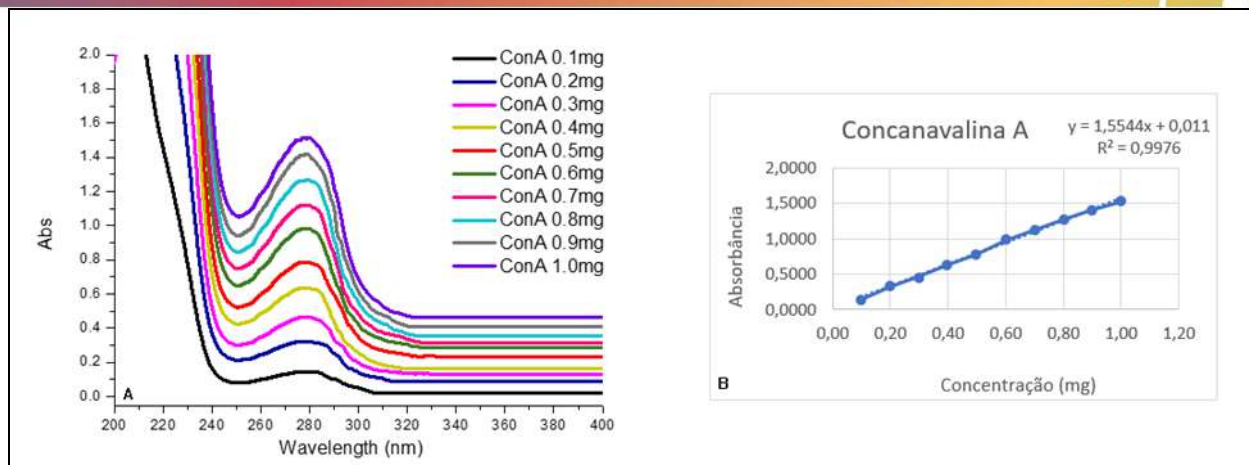


Figura 3 – Espectros de absorção no UV-visível na região de 200 – 400 nm para diferentes concentrações de Concanavalina A (a) e gráfico de regressão linear da curva de calibração criada.

Na Figura 4, são apresentados os resultados da interação entre a lectina e nanopartículas magnéticas para a criação do sistema NPMagConA. Inicialmente, 1 mg de NPMag foram adicionadas em uma solução 0.5 mg/mL de Con A. Após a interação foi possível observar uma diminuição significativa da absorbância na faixa espectral correspondente a 0.25 mg lectina, corroborando a imobilização covalente da lectina na superfície do material magnético.

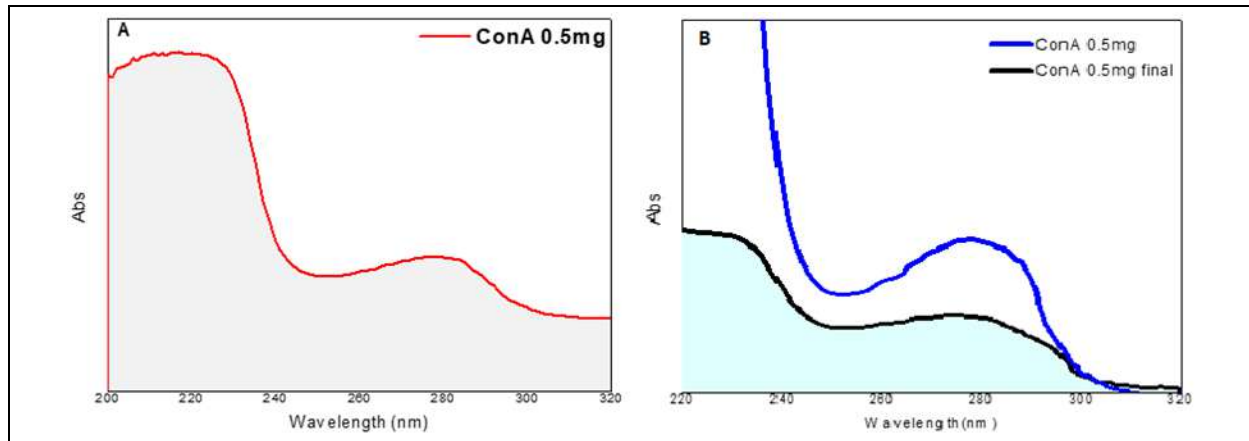


Figura 4 – Espectro de absorção no UV-visível numa região de 200 – 320 nm para solução Concanavalina A em uma concentração específica (a) e espectro da mesma solução após interação com as nanopartículas de óxido de ferro (b).

3.3. Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS)

Na figura 5 são mostrados os gráficos de Nyquist correspondentes ao montagem do sistema biossensor (impedância imaginaria vs impedância real). Inicialmente pode ser observado que a magnitude do semicírculo obtido para o sistema unicamente com a sonda redox (estrelas azuis) aumenta ao atrair as nanopartículas magnéticas (círculos laranjas). Posteriormente, ao atrair as nanopartículas magnéticas funcionalizadas (NPMagConA) a magnitude do semicírculo aumenta



consideravelmente (quadrados verdes). Estes incrementos tem a ver diretamente com o aumento do R_{ct} , assim, a resposta R_{ct} inicial da sonda redox é de 4.000Ω . A resposta R_{ct} obtida para as nanopartículas magnéticas foi de 9.000Ω e a resposta das mesmas após a imobilização da ConA aumentou para 15.000Ω . Como pode ser inferido, o aumento da resistência está relacionado com o aumento de massa sobre a ponta do eletrodo de trabalho.

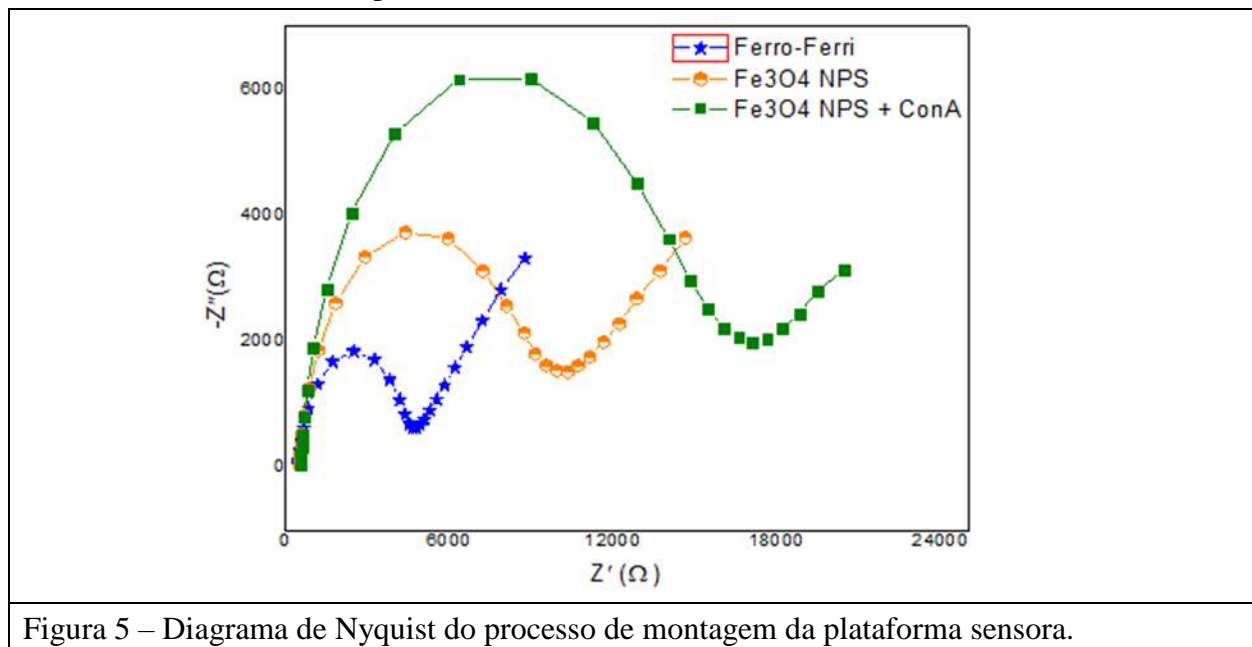


Figura 5 – Diagrama de Nyquist do processo de montagem da plataforma sensora.

Na Figura 6 são apresentados os resultados da biointeração do sistema NPMagConA com as amostras de partículas virais. Os resultados obtidos demonstram a existência de diferenças na composição glicômica da superfície dos 4 sorotipos virais. De maneira similar à imagem anterior, podemos observar que cada sorotipo ocasionou uma resposta impedimétrica diferente. Pelo cálculo do R_{ct} obtivemos os seguintes valores, para DENV1 (20.000Ω), DENV2 (28.400Ω), DENV3 (16.500Ω) e DENV4 (17.300Ω).

Os resultados obtidos sugerem que a densidade de sítios glicosilados com manose é diferente para os 4 sorotipos. Desta maneira, o DENV2 seria o sorotipo que apresentando maior R_{ct} teria uma maior quantidade de sítios manose, seguido pelo DENV1, o DENV4, e, o DENV3, seria o sorotipo com menor quantidade de manose. Nesta linha de raciocínio, é importante destacar que a intensidade da resposta impedimétrica é o resultado direto do aumento de massa do sistema NPMagConA ocasionado pela captura de partículas virais, e que, a captura ocorre por meio da interação da concanavalina A com os sítios manose encontrados na superfície dos vírus. Deste modo, embora houve diferença na intensidade da resposta dos sorotipos, o aumento de seus R_{ct} em comparação com a plataforma base (NPMagConA) indica que o biossensor conseguiu identificar os quatro sorotipos da dengue e que mais ainda, os consegue discriminar em base à intensidade de sua resposta.

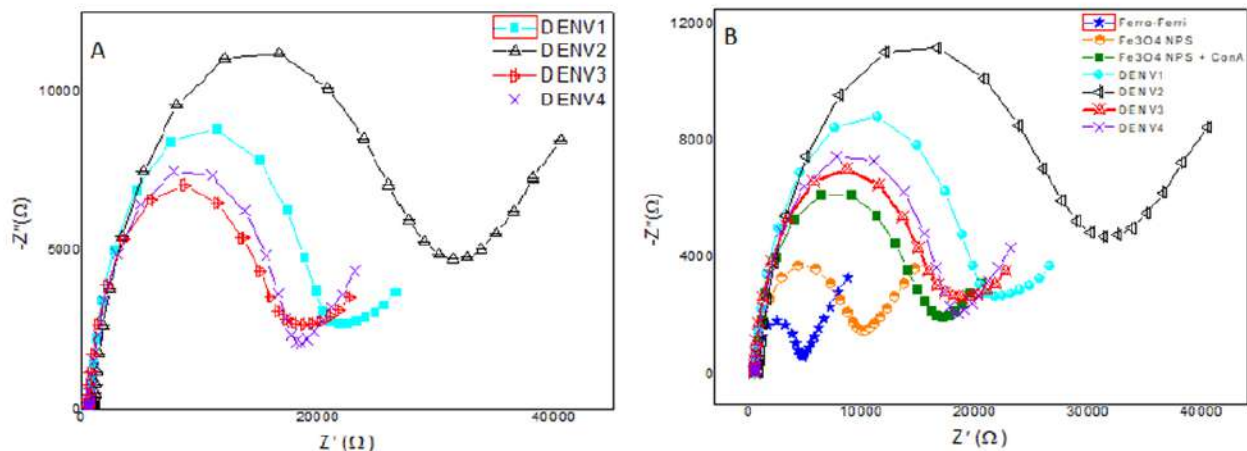


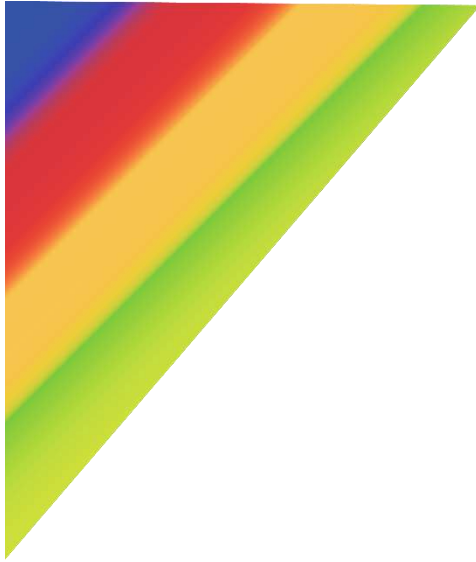
Figura 6 – Diagrama de Nyquist com a resposta isolada dos quatro sorotipos da dengue (A) e resposta dos sorotipos frente a plataforma base do biossensor (B).

4. CONCLUSÃO

Neste trabalho, apresentamos um sistema biossensor eletroquímico original baseado na detecção impedimétrica de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com ConA empregadas para capturar partículas virais. Devido a sua natureza particulada e a seu método de transdução, o sistema biossensor pode ser facilmente miniaturizado para microvolumes dentro de dispositivos de microfluídica. A detecção do vírus da Dengue é simples e a metodologia descrita permite identificar até o sorotipo de Dengue presente na amostra. Testes de captura a partir de amostras biológicas complexas, tais como soro e sangue são desejáveis para testar o uso real deste tipo de biossensor, o tornando uma ferramenta promissora para atuar no diagnóstico rápido de Dengue assim como do sorotipo da cepa infectante.

5. REFERÊNCIAS

- Avirutnan, P. N. Punyadee, S. Noisakran, C. Komoltri, S. Thiemmecca, K. Auethavornanan, A. Jairungsri, R. Kanlaya, N. Tangthawornchaikul, C. Puttikhunt, et al., Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *Journal Infectious Diseases*, 193:1078–1088 2006.
- Espinoza-Castañeda, M., A. de la Escosura-Muñiz, and A. Merkoçi. Nanoparticle/Nanochannels-Based Electrochemical Biosensors Chapter 1. Introduction, in *Electrospinning for High Performance Sensors*, Springer. P. 205-223. 2015.
- Oliveira, M.D.L. et al. Detection of dengue virus serotypes on the surface of gold electrode based on Cratylia mollis lectin affinity. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 155, p. 789-795, 2011.
- Pokidysheva, E., et al., Cryo-EM reconstruction of dengue virus in complex with the carbohydrate recognition domain of DC-SIGN. *Cell*. 124(3): p. 485-493. 2006.
- Sharon, N. & Lis, H., Lectins. 2ª ed: Kluwer Academic Publishers. 31. 2003.
- Simmons, C.P., et al. Dengue. *N. Engl. J. Med.* 366 (15), 1423–1432. 2012.



CONTROLE DE QUALIDADE NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA



ÁREA DE SUBMISSÃO: Controle de Qualidade e Indústria Farmacêutica

AVALIAÇÃO DA REPRODUTIBILIDADE FÍSICO-QUÍMICA LOTE A LOTE EM COMPRIMIDOS DE HIDROCLOROTIAZIDA GENÉRICOS

K. W. L. da SILVA¹, E. H. de A. PEREIRA¹, S. de S. SILVA¹, F. M. da SILVA¹, L. C. L.
BARROS¹ e A F O. SANTOS¹

¹ Centro Universitário Cesmac, Farmácia Escola, Curso de Farmácia.

E-mail para contato: yrohwrak@outlook.com

RESUMO – A hidroclorotiazida é um fármaco diurético pertencente à classe dos tiazídicos, amplamente utilizado em casos de hipertensão arterial sistêmica devido à sua eficácia terapêutica e seu baixo custo. Segundo as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos o fabricante é o responsável pela qualidade dos medicamentos por ele fabricados. O estudo teve como objetivo avaliar a reprodutibilidade lote a lote em comprimidos genéricos de hidroclorotiazida. Foram adquiridas comercialmente nove amostras de medicamentos genéricos dos laboratórios A, B e C, sendo três lotes de cada laboratório. As amostras foram submetidas a ensaios físico-químicos de qualidade recomendados pela Farmacopeia Brasileira 6ª edição: peso médio, dureza, friabilidade, desintegração e doseamento. Os resultados dos testes para todos os produtos analisados atenderam as especificações farmacopeicas, apresentando resultados satisfatório e reprodutivos para as diferentes fabricantes e seus respectivos lotes.

PALAVRAS-CHAVE: Controle de qualidade; Medicamentos bioequivalentes; Indústria farmacêutica.

ABSTRACT – Hydrochlorothiazide is a diuretic drug belonging to the thiazide class, widely used in cases of systemic arterial hypertension due to its therapeutic efficacy and low cost. According to the Good Manufacturing Practices of Medicines the manufacturer is responsible for the quality of the medicines manufactured by him. The study aimed to evaluate batch-to-batch reproducibility in generic hydrochlorothiazide tablets. Nine samples of generic drugs were purchased commercially from laboratories A, B and C, three of which were from each laboratory. The samples were submitted to quality physicochemical tests recommended by the Brazilian Pharmacopoeia 5th edition: average weight, hardness, friability, disintegration and dosing. The test results for all analyzed products met the pharmacopoeia specifications, presenting satisfactory and reproductive results for the different manufacturers and their respective batches.



KEY WORDS: *Quality control; Bioequivalent drugs; Pharmaceutical industry.*

1. INTRODUÇÃO

A hidroclorotiazida é um diurético pertencente à classe dos tiazídicos, sintetizada na década de 50, amplamente utilizada devido à sua eficácia terapêutica e seu baixo custo. Possui alta disponibilidade oral e efeito de longa duração, é bem absorvida pelo trato gastrointestinal e não sofre metabolização ao ser excretada pela urina (SILVA; LOURECAO; FILHO; FATIBELLO, 2015). Vários fármacos podem ser utilizados na terapia anti-hipertensiva, dentre eles estão os diuréticos, onde se inclui a hidroclorotiazida (FERREIRA et al., 2013).

No Brasil, a hidroclorotiazida é comercializada nas concentrações de 25 mg e 50 mg, segundo as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos o fabricante é o responsável pela qualidade dos medicamentos por ele fabricados, tendo por objetivo assegurar que os mesmos sejam adequados aos fins a que se destinam, cumpram com os requisitos estabelecidos em seu registro e não coloquem os pacientes em risco por apresentarem segurança, qualidade ou eficácia inadequada (BRASIL, 2010).

No âmbito industrial, o controle de processo está cada vez mais sincronizado com outras operações, tais como controle de fabricação e aplicações de gerenciamentos de projetos. O sistema de garantia da qualidade de fabricação de medicamentos deve assegurar que sejam realizados todos os controles necessários nas matérias-primas, produtos intermediários e produto a granel bem como outros controles (NUNES NETO et al., 2010).

Um dos pilares cadeia produtiva de medicamentos é o desenvolvimento de formulações que possibilitem a produção em escala industrial de medicamentos que mantenham as características de qualidade, apresentando reprodutibilidade lote a lote de forma a contribuir para um tratamento eficaz e seguro. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a reprodutibilidade, através de testes físico-químicos, de lotes de comprimidos de hidroclorotiazida genéricos disponíveis no mercado.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Controle de Qualidade Físico-Químico de medicamentos na Farmácia Escola do Centro Universitário Cesmac localizado na cidade de Maceió/AL. No período de agosto de 2016 a julho de 2017.

A amostra foi constituída por comprimidos contendo 25 mg de hidroclorotiazida adquiridos durante o período de setembro a dezembro de 2019 em farmácias comunitárias localizadas também na cidade de Maceió, levando em consideração a aquisição de três lotes diferentes para três fabricantes a serem analisados, totalizando nove amostras. Todos o estudo foi realizado com as amostras comerciais dentro dos prazos de validade.

Os pesquisadores avaliaram a reprodutibilidade lote a lote dos medicamentos adquiridos, seguindo os ensaios de qualidade preconizados pela Farmacopeia Brasileira VI edição (2019):

Peso médio: Foram pesados em balança analítica 20 comprimidos de cada lote, individualmente. Os valores obtidos foram usados para determinar o peso médio, o desvio padrão e o coeficiente de variação entre os comprimidos (BRASIL, 2019).

Dureza: Foram selecionados 10 comprimidos de cada lote para avaliar a resistência ao esmagamento ou à ruptura sob pressão radial, utilizando de um durômetro de mola para medir a força necessária para esmagá-los. O valor médio das medidas foi expresso em newtons (N/kgf) (BRASIL, 2019).



Friabilidade: Pesou-se 20 comprimidos de cada lote, no qual foram submetidos ao friabilômetro por 4 minutos. Logo após, os comprimidos foram removidos e pesados novamente para determinação do percentual de perda de pó (BRASIL, 2019).

Desintegração: Foram utilizados 6 comprimidos de cada lote, cada comprimido foi inserido individualmente em um dos 6 tubos da cesta de desintegração. Para determinar o tempo de desintegração, as amostras foram submetidas a movimentos de imersão em água a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. O resultado expresso foi a média de 6 determinações (BRASIL, 2019).

Doseamento: Foram pesados e pulverizados 20 comprimidos de cada lote, posteriormente foi pesado quantidade do pó, equivalente a 30 mg de hidroclorotiazida para dissolução em 50 mL de hidróxido de sódio 0,1 M agitando-se por 20 minutos. Logo após completou-se o volume para 100 mL com o mesmo solvente, homogeneizou-se e filtrou-se. Na sequência, a preparação foi diluída em água até concentração de 0,0015% (p/v). As absorvâncias das soluções foram lidas em 273 nm, utilizando água para ajuste do zero (BRASIL, 2019).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do peso médio, dureza, friabilidade, desintegração e doseamento dos comprimidos de hidroclorotiazida genérico avaliados, estão descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Resultados obtidos dos testes de peso médio, dureza, friabilidade, desintegração e doseamento para os comprimidos de hidroclorotiazida dos fabricantes A, B e C com seus respectivos lotes analisados.

Fabricantes	Lotes	Peso médio (mg)	Dureza (kgf)	Friabilidade (%)	Desintegração (minutos)	Doseamento (%)
A	A1	119,39	4,5	0,35	1' 29"	99,2
	A2	121,32	4,4	0,45	2' 51"	101,6
	A3	119,49	3,9	0,58	1' 30"	99,5
B	B1	123,80	5,0	0,38	7' 57"	100,2
	B2	125,73	5,1	1,20	1' 28"	100,8
	B3	123,00	5,5	1,00	11' 58"	100,9
C	C1	121,61	5,8	0,18	1' 26"	97,2
	C2	119,96	5,1	0,43	1' 58"	95,5
	C3	119,32	4,9	0,79	6' 58"	96,0

A determinação do peso é um dos métodos gerais aplicados a medicamentos. Comprimidos não revestidos com peso médio de 80 a 120 mg, podem apresentar uma variação individual de peso no valor de $\pm 7,5\%$. Conforme a **Tabela 1**, todas as amostras atenderam às especificações para este parâmetro. Os testes se aplicam as formas farmacêuticas sólidas em dose unitária, acondicionadas em recipientes para esse mesmo fim e àquelas destinadas a doses múltiplas. Essa medida nos permite verificar se todos os comprimidos de um determinado lote apresentam uma uniformidade de peso. Em uma amostra que tenha o peso médio aceitável, poderão existir comprimidos com peso superior ou inferior ao normal (BRASIL, 2019).

As durezas dos comprimidos avaliados, frente aos lotes estudados, estão evidenciadas na **Tabela 1**. Todos os valores foram semelhantes entre lotes, bem como entre fabricantes, demonstrando assim uma boa reprodutibilidade e uniformidade, tanto entre lotes, como entre os fabricantes. A importância deste teste está em verificar se o comprimido possui resistência aos



choques mecânicos, como revestimento, esmagamento, embalagem e transporte (VAZ; FERREIRA; OLIVEIRA, 2011). Vale salientar que a Farmacopeia Brasileira define o teste de dureza como informativo, ficando a critério do fabricante. Contudo que tais resultados não demonstrem interferência na absorção do fármaco pelo organismo, devendo desintegrar e dissolver para tornar-se biodisponível.

Em relação ao teste de friabilidade (**Tabela 1**), foi possível observar uma perda de pó baixa para a maioria dos lotes analisados, refletindo a alta resistência a abrasão dos comprimidos (CORREIA et al., 2015). No entanto, dois lotes (B2 e B3) apresentaram uma perda um pouco maior, sendo inferior a 1,5%, atendendo ao preconizado na farmacopeia. Esse resultado permite dizer que o desgaste foi pouco e adequado a exigência farmacopeica (BRASIL, 2019). É importante salientar que valores acima do permitido podem comprometer a eficácia terapêutica do medicamento (GIL, 2010).

Os resultados do teste de desintegração (**Tabela 1**) revelaram que todas os fabricantes e lotes avaliados dos comprimidos analisados desintegraram completamente dentro do limite de tempo estabelecido (30 minutos) com a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019). Os lotes B1, B3 e C3 chamaram a atenção por apresentar um tempo de desintegração maior em relação as demais amostras analisadas. O trabalho de Correia et al. (2015) também encontrou diferenças no tempo de desintegração em diferentes fabricantes de comprimidos de hidroclorotiazida e atribuíram aos diferentes tipos de desintegrantes utilizados e/ou a diferença no quantitativo desses desintegrantes.

Como apresenta a **Tabela 1**, no teor de princípio ativo entre lotes, do mesmo laboratório, observa-se semelhanças no resultado, mostrando que mesmo com pequenas variações na desintegração, as amostras apresentaram boa uniformidade de conteúdo em relação a homogeneidade de distribuição do princípio ativo na mistura. Para os resultados obtidos com o fabricante C, foi possível observar que o lote C2 apresentou teor próximo ao limite mínimo permitido. Frente as especificações farmacopeicas todos os fabricantes apresentaram teor dentro dos limites estabelecidos, faixa aceitável de 93 a 107%.

4. CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos na pesquisa, foi possível concluir que todas as amostras de comprimidos de hidroclorotiazida, os fabricantes e os diferentes lotes avaliados, atenderam as especificações farmacopeicas, confirmando a reprodutibilidade e a qualidade atestada para produto frente aos parâmetros avaliados.

5. REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Brasília, *Diário Oficial [da] União*, Brasília, 18 de abril de 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira. 6. ed. Brasília: Anvisa, 2019. v. 1.

CORREIA, L. F. et al. Avaliação da equivalência farmacêutica de comprimidos de hidroclorotiazida disponíveis no mercado do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Farmácia*, Rio de Janeiro, v. 96, n. 2, p. 1266-1284, 2015.



FERREIRA, T. F. et al. Estudo comparativo da influência dos excipientes na qualidade de hidroclorotiazida 25 mg em medicamentos referência e genéricos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada*, Araraquara, v. 34, n. 1, p. 63-68, 2013.

GIL, E. S. *Controle físico-químico de qualidade de medicamentos*. 3. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2010.

NUNES NETO, P. A. et al. Controle estatístico de processo aplicado ao monitoramento de envase de tintura de iodo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 75-81, 2010.

SILVA, L. P.; LOURENCAO, B. C.; FILHO-FATIBELLO, O. Determinação volumétrica simultânea de besilato de anlodipino e hidroclorotiazida em amostras de urina sintética utilizando um eletrodo de diamante dopado com boro. *Química Nova*, São Paulo, v. 38, n. 6, p. 801-806, 2015.

VAZ, L. B.; FERREIRA, V. A.; OLIVEIRA, A. C. E. Avaliação da qualidade de comprimidos de ácido ascórbico comercializados nas farmácias de Timóteo-MG. *Farmácia & Ciência*, Rio de Janeiro, v. 02, n. 1, p. 1-9, 2011.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Controle de Qualidade e Indústria Farmacêutica

DESENVOLVIMENTO DE GEL-CREME FOTOPROTETOR COM AÇÃO REPELENTE

K. W. L. da SILVA¹, D. C. de S. GOMES¹, M. das D. V. da SILVA¹, I. M. N. GONÇALVES¹ e F. S. DABBUR¹

¹ Centro Universitário Cesmac, Farmácia Escola, Curso de Farmácia.

E-mail para contato: yrohwrak@outlook.com

RESUMO – O Brasil é um país de clima tropical. Decorrente sua localização geográfica e condições socioambientais têm problemas que estão relacionados diretamente com a pele da população, como a radiação solar que ocasiona alto índice de câncer de pele e arboviroses transmitidas através da picada de mosquitos vetores. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma formulação gel-creme com ação fotoprotetora e repelente, bem como, avaliar sua estabilidade acelerada. Foi realizado um estudo experimental, através do desenvolvimento farmacotécnico da amostra e após a obtenção, a amostra foi submetida a estresse de temperaturas de 5, 25 e 45 °C e analisadas nos Tempos 0, 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 dias. Os testes físico-químicos realizados foram: aspecto, cor, odor, pH, centrifugação, densidade aparente, espalhabilidade; e sensoriais in vitro: pegajosidade, deslizamento e residual branco. O aspecto da amostra manteve-se sem alteração apenas no T0. Foram observadas alterações de cor e odor a partir do T45 evoluindo para a separação no T180. O pH inicial da amostra foi de 6,71, variando de 6,31 a 8,60. A densidade foi diminuindo ao logo dos tempos de análise. As análises evidenciaram pouca pegajosidade, deslizamento maior que 200 movimentos circulares e residual branco. Importante a realização de testes de eficácia dos conservantes, eficácia do Fator de Proteção Solar (FPS), Fator de Proteção UVA (FP-UV) e teste de repelência contra insetos.

Palavras-chave: Radiação solar; Protetores solares; Cosméticos; Estabilidade de cosméticos; Repelentes de insetos.

ABSTRACT - Brazil is a country with a tropical climate. Due to their geographical location and socio-environmental conditions, it have problems that are directly related to the skin of the population, such as solar radiation that causes a high rate of skin cancer and arboviruses transmitted through the bite of vector mosquitoes. The aim of this work was to develop a gel-cream formulation with photoprotection and repellent action, and to evaluate its accelerated stability. An experimental study was carried out through the pharmacotechnical development of the sample and after obtaining it, the sample was subjected to temperature stress of 5, 25 and 45 °C and analyzed at Times 0, 30, 45, 60, 90, 120, 150 and 180 days. The physicochemical tests performed were: aspect, color, odor, pH, centrifugation, apparent density, spreadability; in vitro: stickyness, slip and white residual. The sample aspect remained unchanged only in T0. Color and odor



changes were observed from T45 evolving to separation in T180. The initial sample pH was 6.71, ranging from 6.31 to 8.60. The density was decreasing at the time of analysis. The analyses showed less stickiness, sliding greater than 200 circular movements and white residual. It is important to do preservatives challenge test, effectiveness of the Sun Protection Factor (FPS), UVA Protection Factor (FP-UV) and insect repellency test.

Key words: Solar radiation; Sunscreen; Cosmetics; Cosmetics stability; Insect repellents

1. INTRODUÇÃO

A agressão solar é acumulativa e irreversível e pode produzir alterações das fibras de colágeno e de elastina. Dessa forma a classe médica, farmacêutica e as indústrias cosméticas têm procurado conscientizar a população do risco da exposição solar e a depleção da camada de ozônio na estratosfera, pode resultar em maior radiação ultravioleta na atmosfera terrestre (CORRÊA, 2012).

O surto das viroses transmitidas pelos mosquitos do gênero *Aedes* (dengue, chikungunya e zika) no Brasil, tem levado a um alerta de nível mundial, principalmente pelas graves consequências posteriores. O que tem ocasionado um aumento no consumo de repelentes, para evitar a picada dos insetos hematófagos (INFESTAÇÃO DO *Aedes aegypti* BATE RECORDE EM PERNAMBUCO, 2016).

Dessa forma buscou-se produzir um produto cosmético que protegesse os usuários da radiação solar (UVA e UVB), e dos mosquitos hematófagos, em embalagens fracionáveis que irá facilitar o dia-a-dia dos usuários. Objetivo desse projeto foi desenvolver e avaliar a estabilidade acelerada um gel-creme fotoprotetor hidratante com repelente.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo experimental foi executado na Farmácia Escola do Centro Universitário Cesmac. O desenvolvimento farmacotécnico foi realizado através do estudo na literatura, pesquisa, estudo crítico e aquisição das matérias-primas, cálculos e método de preparação. Os ativos escolhidos foram filtros solares inorgânicos amplamente utilizados, *Titanium Dioxide* e *Zinc Oxid* micronizados, que formam uma película fotoprotetora transparente contra raios UVA/B (FERREIRA, 2010; CORRÊA, 2012) e o repelente de insetos extraído de *Carapa guianensis* Aubl. (BATISTUZZO; ITAYA; ETO, 2011). A formulação (**Tabela 1**) foi definida após a preparação em escala de um projeto piloto e manipulada seguindo as Boas Práticas de Manipulação em Farmácias (BRASIL, 2007). Também foi adquirida uma amostra industrializada, para efetuar uma análise comparativa.



Tabela 1 – Fórmula do gel-creme com ação fotoprotetora e repelente.

Componentes (INCI Name)	Função
<i>Methylparaben, Propylparaben</i>	Conservante
<i>Propylene Glycol</i>	Umectante
<i>Glycerin</i>	Umectante
<i>Aqua</i>	Veículo
<i>Ammonium Acryloyldimethyl-taurate / VP copolimer</i>	
<i>Rapeseed Oil Sorbitol Esters</i>	Emulsificante
<i>Paraffinum Liquidum</i>	
<i>Isopropyl Palmitate</i>	
<i>Petrolatum</i>	Emoliente
<i>BHT</i>	Antioxidante/Conservante
<i>Ammonium Acryloyldimethyltaurate / VP copolimer</i>	Dispersante/Geleificante
<i>Disodium EDTA</i>	Quelante
<i>Titanium Dioxide</i>	Ativo
<i>Zinc Oxid</i>	Ativo
<i>Carapa Guianensis Seed Oil</i>	Ativo

Fonte: BATISTUZZO; ITAYA; ETO, 2011; CORRÊA, 2012; FERREIRA, 2010.

Legenda: INCI: *International Nomenclature of Cosmetic Ingredient*.

Avaliação inicial

Após 24 horas de obtenção da amostra manipulada, efetuou-se a análise de Tempo (T) 0, as duas amostras foram submetidas à testes físico-químicos: características organolépticas (cor, aspecto e odor), pH, centrifugação, densidade aparente (BRASIL, 2004; BRASIL, 2008), espalhabilidade (KNORST, 1991); e sensoriais in vitro: pegajosidade (ISAAC et al., 2008), deslizamento (NUNES, 2011) e residual branco (SEIXAS, 2014).

Avaliação da estabilidade acelerada das amostras

Posteriormente, as amostras manipulada e industrializada, foram fracionadas e armazenadas em embalagens de polietileno brancas, respeitando o espaço para trocas gasosas, durante 90 dias, nas temperaturas ambiente ($24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$); estufa ($40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$); e geladeira ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$). Os testes foram realizados nos Tempos 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 dias (BRASIL, 2004).

Análises físico-químicas

Características organolépticas

Aspecto: As amostras foram observadas visualmente para detecção de sinais de instabilidade, em relação ao padrão estabelecido inicialmente no T0 (BRASIL, 2004; BRASIL, 2008).

Cor: As amostras foram observadas visualmente em temperatura ambiente, sob a luz natural (sol) e artificial (branca) (BRASIL, 2004; BRASIL, 2008).

Odor: A verificação do odor das amostras acondicionadas no material de embalagem foi realizada diretamente através do olfato (BRASIL, 2004; BRASIL, 2008).



pH: Foi preparada uma diluição de 10 % (p/v) em água purificada e realizada leitura direta (BRASIL, 2008).

Centrifugação: Foram pesadas 5,0 g de e foram centrifugados a 3000 rpm por 30 minutos (BRASIL, 2004).

Densidade aparente: Foi determinada a razão entre a massa e o volume (BRASIL, 2004; BRASIL, 2008).

Espalhabilidade: Foi posicionada uma placa de vidro (suporte) em cima de um papel milimetrado. Foi pesado 0,5 g da amostra e colocada no centro. Outra placa de vidro de peso pré-determinado foi colocada sobre a amostra. Após 1 minuto foi realizada a leitura dos diâmetros abrangidos pela amostra em posição vertical e horizontal. O procedimento foi repetido acrescentando-se outras placas de peso pré-determinado sucessivamente, em intervalos de 1 minuto. A medição foi efetuada a temperatura ambiente ($25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$), e os resultados obtidos foram aplicados na **Fórmula 1**, onde, E_i = espalhabilidade da amostra (mm^2); d = Diâmetro médio; $\pi = 3,1416$ (KNORST, 1991).

$$E_i = \frac{d^2 \cdot \pi}{4}$$

Fórmula 1 – Equação utilizada para determinar a espalhabilidade.

Fonte: KNORST, 1991.

Foram construídos gráficos em Microsoft Office Excel®, versão 365 para verificar o comportamento da amostra.

Análises sensoriais in vitro

Pegajosidade: Foi aplicada 0,005 g de cada amostra em placas de silicone, e com o dedo indicador, com luvas, foram realizados movimentos de toque sobre a placa (ISAAC et al., 2008).

Deslizamento: Esse teste foi realizado através de uma adaptação da metodologia usada por Nunes (2011). Foi pesada 0,05 g da amostra e aplicada no centro de uma placa de silicone e com o auxílio do dedo indicador foram realizados movimentos leves e circulares que foram contados até o produto não deslizar mais na placa.

Residual branco: Placas de silicone com coloração preta foram demarcadas em 4 quadrantes e a quantidade de 0,07 g de amostras foram pesadas e aplicadas sobre a placa. Cada amostra foi espalhada de forma homogênea na placa com movimentos circulares e suaves. A análise visual da placa de silicone foi realizada após 30 minutos da aplicação para garantir que as amostras estivessem secas (SEIXAS, 2014).

Análise de dados

Os dados obtidos foram registrados em um instrumento de coleta de dados e posteriormente tabulados na planilha eletrônica do Microsoft Office Excel®, versão 365.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a obtenção das amostras foi realizada uma análise inicial, juntamente com uma amostra padrão, nos quesitos, químicos, físicos e sensoriais constituindo os resultados do Tempo 0 no **Quadro 1** estabelecendo assim os parâmetros para comparação com os outros tempos do estudo de estabilidade acelerada.



Quadro 1 – Resultados das análises físico-químicas e sensoriais in vitro do T0 ao T60.

Tempo/Temperatura	AP-T0	T0	T30			T45			T60		
	25°C	25°C	5°C	25°C	45°C	5°C	25°C	45°C	5°C	25°C	45°C
Aspecto	Hom.	Hom.	PCS	PCS	Con.	Nor.	Prec.	Con.	Nor.	Nor.	Con.
Cor (LF)	BR	BR	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
Cor (LV)	BR	BR	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	AS	SA
Odor	CAE	CAE	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
pH (potenciômetro)	6,71	7,96	8,60	8,04	8,02	8,90	8,60	8,40	8,44	7,85	8,24
Centrifugação	NHS	NHS	NHS	NHS	NHS	NHS	NHS	HS	NHS	NHS	HS
Densidade (g/mL)	1,03	1,04	1,02	1,01	0,99	1,02	0,99	0,92	1,01	0,94	0,82
Ei	21,65	15,41	18,40	16,33	15,88	18,70	18,86	13,72	15,83	15,91	11,64
Pegajosidade	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP
Deslizamento (MC)	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
Residual branco	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR

Quadro 2 – Resultados das análises físico-químicas e sensoriais in vitro do T90 ao T180 (continuação).

Tempo/Temperatura	T90			T120			T150			T180		
	5°C	25°C	45°C	5°C	25°C	45°C	5°C	25°C	45°C	5°C	25°C	45°C
Aspecto	Nor.	Pre.	Pre.	Nor.	Pre.	Pre.	Nor.	Pre.	Pre.	PCS	PCS	Con.
Cor (LF)	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
Cor (LV)	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
Odor	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
pH (potenciômetro)	6,65	7,98	7,78	7,99	7,12	7,68	7,80	8,67	8,05	7,13	8,70	6831
Centrifugação	NHS	NHS	HS	NHS	NHS	HS	NHS	NHS	HS	NHS	NHS	HS
Densidade (g/mL)	1,01	0,87	0,78	1,00	0,82	0,69	0,98	0,79	0,63	0,96	0,75	0,59
Ei	22,40	17,95	5,44	20,83	20,51	4,09	17,57	14,45	4,08	11,95	9,24	3,33
Pegajosidade	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP
Deslizamento (MC)	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
Residual branco	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR

Legenda: LF: Luz Fluorescente; LV: Luz Visível; AP: Amostra Padrão; Hom.: Homogênea; PCS: Precipitada com Separação de Fases; Con.: Consistente; Nor.: Normal; Prec.: Precipitada; BR: Branca; SA: Sem Alteração; CAE: Característico da Essência; NHS: Não Houve Separação; HS: Houve Separação; Pouco Pegajoso; MC: Movimentos Circulares; DR: Deixou Residual.

Conforme o **Quadro 1 e Quadro 2**, é possível verificar que o aspecto físico da amostra armazenada na apresentou-se precipitada do T30, evoluindo para a separação das fases no T180 e a amostra armazenada na geladeira manteve-se sem alteração até o tempo de análise final. Em relação ao odor e a cor, a amostra manteve-se sem alteração durante odo o tempo de análise.

Diversos fatores: processos oxidativos, pH, temperatura, excipientes e ativos; podem induzir alterações na cor e no odor da amostra, revelando a importância de utilizar sistemas antioxidantes eficientes (LIMA, 2009; ZANON, 2010).

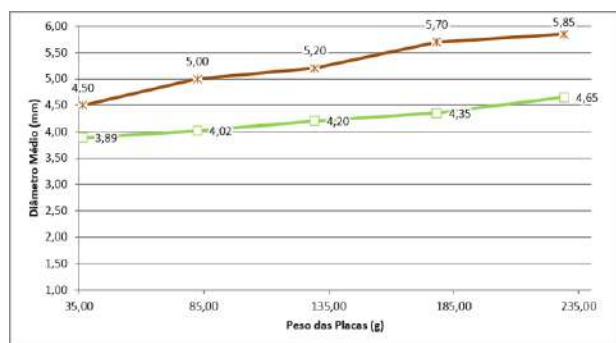
O pH da formulação permite verificar reações não visíveis a olho nu, podendo indicar problemas de estabilidade ou da interação de excipientes e ativos, podendo sugerir a ocorrência de reações de hidrólise, oxidação ou de contaminação bacteriana (BRASIL, 2004; AULTON, 2005). O pH inicial da amostra foi de 6,71 apresentou o mesmo comportamento com variações do pH de 6,31 a 8,70. Foi possível verificar que o pH da amostra foi alcalinizando ao longo do tempo. De acordo com Rebello (2011) $\text{pH} > 8,00$ pode desestruturar a queratina ou remover o excesso de sebo, resultando em ressecamento da pele.

O teste de centrifugação, que tem como objetivo antecipar os sinais de instabilidade (LARENTES, 2009), demonstrou (**Quadro 1 e Quadro 2**) que apenas as amostras, armazenadas na estufa apresentaram sinais de instabilidade quando submetidas ao teste de centrifugação a partir do T45.

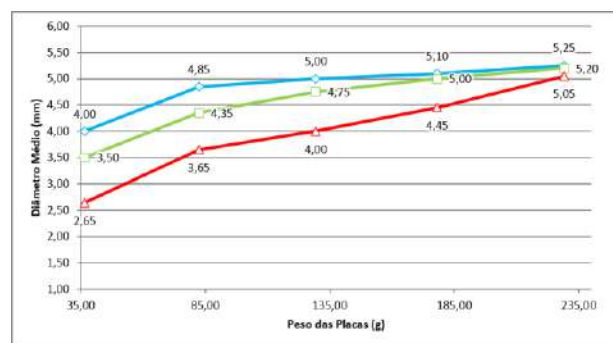
Houve separação em todas análises das amostras armazenadas a temperatura ambiente e na geladeira. Os compostos ativos adicionados na formulação possuíam características oleosas adicionados na formulação podem ter contribuído com a agregação das gotículas oleosas, visto que na base gel-creme utilizada foram adicionados ativos oleosos em maior quantidade do que os ativos aquosos (ZANON, 2010).

Densidade é um parâmetro importante para determinar a embalagem primária de envase (MARTINS, 2015). Conforme resultados, as amostras armazenadas na a 45 °C tiveram os valores menores, sendo explicada por uma possível incorporação de ar no instrumento de análise.

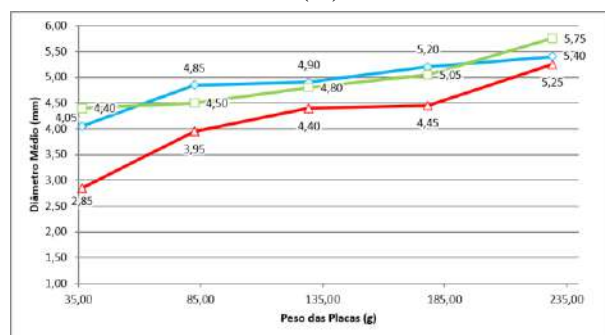
Ao longo dos tempos de análise das amostras verificou-se que a espalhabilidade da amostra foi diminuindo sobre a superfície da placa (**Figura 1**), devido ao espessamento apresentado principalmente a partir do T90 e nas amostras armazenadas na estufa. Esse aumento de viscosidade pode dificultar a retirada do produto da embalagem e aplicação do produto na pele (OLIVEIRA, 2009; CORDEIRO et al., 2013). Vale ressaltar que fotoprotetores devem ter uma espalhabilidade adequada para que o consumidor possa aplicar 2 mg de produto por cada 1 cm² de pele, alcançando o FPS e FP-UVA informados pelo fabricante (SILVA et al., 2009).



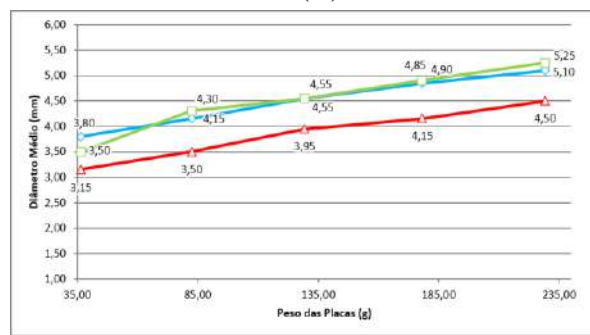
(A)



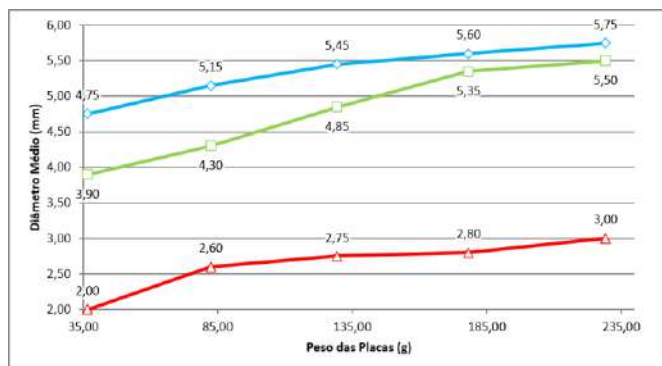
(B)



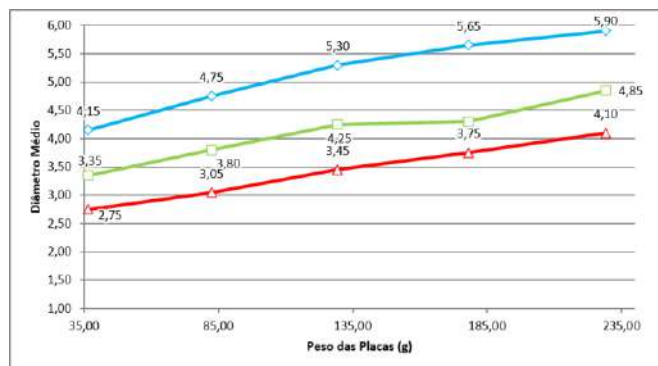
(C)



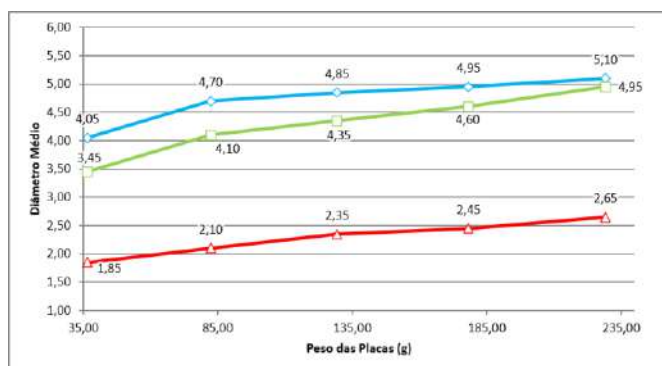
(D)



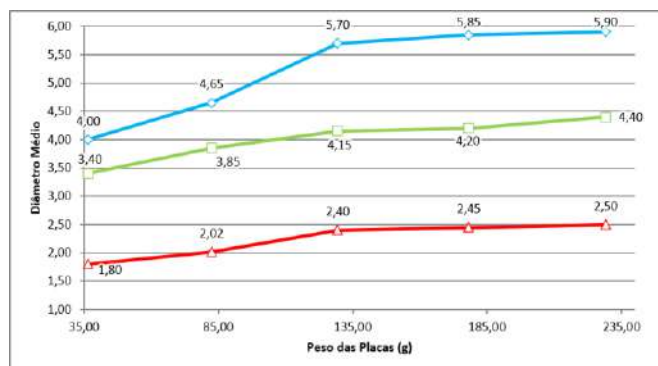
(E)



(F)



(G)



(H)

Figura 1 – Gráficos da espalhabilidade nos tempos 0(A), 30(B), 45(C), 60(D), 90(E), 120 (F), 150 (G) e 180 (H).

Legenda: Amostra Padrão - Temperatura ambiente: ; Geladeira: ; Temperatura Ambiente: ; Estufa: .

Visualizando o **Quadro 1** e **Quadro 2**, é possível verificar que em todos os tempos de análise, as amostras apresentaram-se com pouca pegajosidade. No quesito deslizamento as amostras armazenadas em temperatura ambiente e geladeira, apresentaram deslizamento maior que 200 movimentos circulares.

Os resultados do residual branco detectados 30 minutos após a aplicação das amostras na placa escura evidenciaram que em todas as análises, as amostras apresentaram residual branco. Tal efeito é obtido pela presença dos filtros inorgânicos (*Titanium Dioxide* e *Zinc Oxide*), que formam uma barreira que refletem à radiação ultravioleta (ALMEIDA; BAHIA, 2003; LIMA; SERRA, 2013). O residual apresentado pelos filtros inorgânicos está relacionado com o índice refrativo que deve ser 2,6 (WANG; BALAGULA; OSTERWALDER, 2010; RUSCINC, 2018).

4. CONCLUSÃO

A obtenção do produto ocorreu com êxito, desde o planejamento até a obtenção do produto acabado, sendo uma inovação no mercado cosmético. Entretanto, para uma possível comercialização, sugere-se a adição de tensoativos que mantenham as gotículas das fases mais



ligadas entre si e/ou a utilização de componentes hidrofílicos. Testes como análise microbiológica e eficácia dos conservantes devem ser realizados, bem como testes de eficácia do Fator de Proteção Solar (FPS), Fator de Proteção UVA (FP-UV) e teste de repelência contra insetos.

5. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, I. F.; BAHIA, M. F. Reologia: interesse e aplicações da área cosmético-farmacêutica. *Cosmetic & Toiletries*, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 96-100, 2003.
- AULTON, M. E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- BATISTUZZO, J. A. O.; ITAYA, M.; ETO, Y. *Formulário médico-farmacêutico*. 4. ed. São Paulo: Pharmabooks Editora, 2011.
- BRASIL. *Guia de estabilidade de produtos cosméticos*. 2. ed. Revista. Brasília: ANVISA, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. RDC Nº 67, DE 8 DE OUTUBRO DE 2007. Dispõe sobre Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais e Oficiais para Uso Humano em Farmácias. *Diário Oficial [da] União*, 9 out. 2007.
- BRASIL. *Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos*. 2. ed. Revista. Brasília: ANVISA, 2008.
- CORDEIRO, M. S. F. et al. Desenvolvimento tecnológico e avaliação da estabilidade de gel dermatológico a partir do óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe). *Revista Brasileira de Farmácia*, Rio de Janeiro, v. 94, n. 2, p. 148-153, 2013.
- CORRÊA, M. A. *Cosmetologia ciência e técnicas*. São Paulo: LIVRARIA E EDITORA MEDFARMA, 2012.
- FERREIRA, A. O. *Guia prático da farmácia magistral*. 4. ed. São Paulo: Pharmabooks Editora, 2010. v. 1.
- INFESTAÇÃO DO *Aedes aegypti* BATE RECORDE RECORDE EM PERNAMBUCO. [online]. Pernambuco. 2016. Disponível em: <<http://g1.globo.com/pernambuco/noticia/2016/02/infestacao-do-aedes-aegypti-bate-recorde-em-pernambuco.html>>. Acesso em: 29 nov. 2019.
- ISAAC, V. L. B. et al. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, Araraquara, v. 29, n. 1, p. 81-96, 2008.
- KNORST, M. T. *Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato concentrado de *Achyrocline satureioides* Lam. DC. COMPOSITAE (MARCELA)*. 1991. 257 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1991.



- LARENTES, I. A. *Avaliação preliminar da estabilidade de cremes fotoprotetores de farmácias magistrais*. 2009. 36 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Faculdade Integrada da Grande Fortaleza, 2009.
- LIMA, A. J. *Caracterização e atividade antioxidante da jaboticaba [Myrciaria cauliflora (Mart.) O. Berg]*. 2009. 175 f. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.
- LIMA, J. F.; SERRA, O. A. Cerium phosphate nanoparticles with low photocatalytic activity for UV light absorption application in photoprotection. *Dyes and Pigments*, [S. l.], v. 97, p. 291-296, 2013.
- MARTINS, D. B. *Desenvolvimento e testes de estabilidade de protetor labial com vitamina e*. 2015. 51 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2015.
- NUNES, P. M. P. *Estudo fitoquímico e atividades biológicas do óleo da semente de Citrus sinensis (L) Osbeck e sua aplicação na área cosmética*. 2011. 177 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- OLIVEIRA, A. Z. M. *Desenvolvimento de formulações cosméticas com ácido hialurônico*. 2009. 100 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Farmacêutica) – Universidade do Porto, Porto, 2009.
- REBELLO, T. *Guia de produtos cosméticos*. 9. ed. São Paulo: Senac, 2011.
- RUSCINC, N. *Fotoprotetores bioativos contendo extrato de mirtilo (Vaccinium myrtillus L.): caracterização físico-química e funcional*. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.
- SEIXAS, V. C. *Desenvolvimento e avaliação da estabilidade e eficácia de formulações cosméticas contendo fosfato de cério com propriedades fotoprotetoras*. 2014. 175 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.
- SILVA, C. A. et al. A ciência cosmética como instrumento da saúde pública: uso correto de fotoprotetores. *Revista Brasileira de Farmácia*, Rio de Janeiro, v. 90, n. 2, p. 159-165, 2009.
- WANG, S. Q.; BALAGULA, Y.; OSTERWALDER, U. Photoprotection: a review of the current and future Technologies. *Dermatologic Therapy*, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 32-41, 2010.
- ZANON, A. B. *Aspectos teóricos e práticos sobre a avaliação da estabilidade de emulsões manipuladas em farmácia*. 2010. 52 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Controle de Qualidade e Indústria Farmacêutica

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE NA FASE PRÉ-ANALÍTICA EM UM LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA CLÍNICA EM RECIFE - PERNAMBUCO

A. A. dos S. SOUZA¹, F. A. de MELO¹, I. P. G. SOUTO², N. V. C. da SILVA³, W. R. NASCIMENTO⁴, C. A. S. ANDRADE⁵

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Hospital das Clínicas;

² Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Sociais Aplicadas;

³ Faculdade Maurício de Nassau, graduação em Biomedicina;

⁴ Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Medicina Tropical;

⁵ Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Bioquímica.

E-mail para contato: anaassouza@yahoo.com.br

RESUMO – Cerca de 70% de todos os diagnósticos são feitos com base nos testes laboratoriais, sendo que 60 a 70% desses testes afetam decisões médicas sobre a admissão, alta hospitalar e regime terapêutico dos pacientes. Objetivo: avaliar a qualidade dos processos na fase pré-analítica de um laboratório de bioquímica clínica, em Recife-PE. Metodologia: Tratou-se de um estudo de caráter transversal e descritivo, com uso de dados primários referentes aos erros pré-analíticos que foram levantados no período da coleta de dados, que ocorreu entre os meses de abril a junho de 2019. Resultados: Durante o período de avaliação foram analisados um total de 2.950 solicitações médicas sendo identificados os seguintes resultados: 1.960 (66,4%) apresentaram o nome e registro do prontuário do paciente na solicitação médica o que classificamos como identificação completa, e 990 (33,6%) não continham o prontuário do paciente só o nome sendo classificado como identificação incompleta, com relação as justificativas médicas, apenas 377 (12,8%) apresentavam justificativa médica, ou seja o médico escreveu o motivo para a solicitação do exame e 2.573 (87,2%) não apresentavam justificativa para a solicitação médica. Com relação ao tempo entre coleta e transporte de amostra até o recebimento da amostra no setor os resultados obtidos demonstram que o tempo variou de 21 minutos até 5 horas e 54 minutos e das 401 amostras analisadas, apenas 11,7% (47 amostras) estiveram com tempo entre coleta/centrifugação/recebimento correspondente < 1 hora, 222 amostras tiveram esse tempo ≥ 1 hora. As demais (132 amostras) tiveram o tempo entre coleta, centrifugação e recebimento no setor ≥ 2 hora; 115 pacientes tiveram suas amostras rejeitadas para análise e o pedido de uma nova coleta de sangue solicitado representando 0,3% de pacientes com pedido de



recoleta. As justificativas para nova solicitação foram 33% para amostras hemolisadas, seguidas de 29,6% de amostras sem o motivo descrito para recoleta pelo analista, amostras insuficientes 21,7%, amostras coaguladas 8,7% e 7% em coletores inadequados. Conclusões: Este estudo constatou que os erros pré-analíticos são uma realidade desafiadora no laboratório estudado e para os programas de qualidade laboratorial, principalmente no âmbito do sistema público de saúde, onde os programas de acreditação laboratorial não são comumente inseridos. Dos três pontos para avaliação coletados, os resultados obtidos com o estudo evidenciaram que no transporte entre a coleta e a chegada da amostra no setor para análise apresenta um alto grau de deficiência quando verificamos o indicado na literatura.

Palavras-chave: Erro pré-analítico. Bioquímica clínica. Indicador de qualidade. .

ABSTRACT - Approximately 70% of all diagnoses are made based on laboratory testing, and 60 to 70% of these tests affect medical decisions about admission, discharge, and therapeutic regimen of patients. Objective: evaluate the quality of processes in the pre-analytical phase in a clinical biochemistry laboratory, located in Recife-PE. Methodology: A cross-sectional and descriptive study, using primary data related to the pre-analytical errors collected between April and June in 2019, was performed. Results: During the evaluation period, 2.950 medical requests were analyzed, identifying the following results: 1.960 (66,4%) presented the name and patient record in the medical request, classifying as complete identification and 990 (33,3%) did not show the patient record, just its name, being classified as incomplete identification. Concerning the medical justifications, only 377 (12%) presented medical explanation, that is the reason for the exam request, and 2.573 (87,2%) did not present justification for the medical request. For the time between collection and sample transport until the reception in the sector, the results have shown that the time varied between 21 minutes and five hours and 54 minutes, and for the 401 samples analyzed, just 11,7% (47 samples) had time between collection/centrifugation/reception corresponding to <1 hour and 222 samples had this time \geq 1 hour. The other 132 samples had the time between the collection, centrifugation, and reception in the sector \geq 2 hours. 115 patients had their samples rejected for analyzes, and a new request for blood collection realized, representing 0.3% of patients with recollection solicitations. Justifications for new requests were 33% for hemolyzed samples; 29,6% samples without reason for recollection by the analyst; 21,7% insufficient samples; 8,7% coagulated samples, and 7% inadequate collectors. Conclusions: This research found that pre-analytical errors are a challenging reality for the studied laboratory and for laboratory quality programs, especially within the public health system, where laboratory accreditation programs are not inserted. Of the three points for evaluation collected, the obtained results with this research pointed out that the time of transport between sample collection and arrival in the sector for analyzes present a high degree of deficiency concerning the suggested in the literature.

Key-words: Pre-analytical error; clinical biochemistry; quality indicator.



1. INTRODUÇÃO

A medicina diagnóstica tem como principal fundamento assegurar aos médicos e pacientes um atendimento eficiente e seguro, fornecendo laudos, com resultados rápidos e confiáveis, para posterior tomada de decisão dos médicos em relação à conduta clínica mais acertada, nesse sentido, os testes clínicos laboratoriais precisos e eficientes são um componente crítico do atendimento ao paciente. Os resultados dos exames laboratoriais influenciam a maioria das decisões médicas, incluindo diagnóstico, prognóstico, avaliação preditiva e de risco, prevenção, rastreamento, monitoramento de tratamentos e terapias (PLEBANI *et al.*, 2013). A qualidade dos testes de laboratório, portanto, pode afetar muito a qualidade e a acessibilidade do atendimento ao paciente (PLEBANI, 2010). Na fase pré-analítica os laboratórios clínicos podem ser responsáveis por até 75% do total de erros laboratoriais, sendo que 26% destes podem ter efeitos prejudiciais no atendimento ao paciente, contribuindo para investigações desnecessárias ou tratamento inadequado, aumento do tempo de internação hospitalar e insatisfação com os serviços de saúde (GREEN, 2013). Os erros ocorridos em um laboratório de análises clínicas classificados em pré-analíticos são definidos como aqueles que ocorrem, desde a solicitação médica com exames laboratoriais inapropriados, erros durante a coleta, erros na orientação ao paciente antes da coleta, ou a falta de orientação.

A maior quantidade de erros laboratoriais ocorrem na fase pré-analítica (PLEBANI, 2009). No ano de 2018, o quantitativo de pacientes que fizeram coleta para exames no setor de bioquímica clínica do laboratório em estudo foi de 64.300, desses, 722 (1,12%) tiveram que realizar nova coleta/recoleta por vários motivos ocorridos com a amostra (hemólise, amostra insuficiente, amostra coagulada) de acordo com o banco de dados do sistema de informática utilizada no laboratório (Mastertools). Diante desse cenário, verificou-se a importância e relevância de um estudo como esse para avaliação e alinhamento das normas de controle de qualidade, tendo como objetivos diminuir a quantidade de erros pré-analíticos no laboratório, aumentando a agilidade e confiabilidade nos laudos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo de caráter transversal e descritivo, com uso de dados primários. Os dados levantados são referentes aos erros pré-analíticos do laboratório de bioquímica clínica de um laboratório em Recife-PE. O período da coleta de dados ocorreu entre os meses de abril a junho de 2019. O estudo teve aprovação institucional do Núcleo de Apoio à Pesquisa do Hospital, datada em 25 de março de 2019. Pela pesquisa não envolver seres humanos, não foi necessário utilizar um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Objetivando identificar os erros pré-analíticos mais frequentes, foram escolhidos os seguintes pontos para coleta de dados e análise: preenchimento das solicitações médicas, transporte da amostra e quantidade de recoletas solicitadas e as justificativas mais frequentes. Através desses pontos analisados foi possível fazer um rastreamento dos erros pré-analíticos desde a solicitação médica até o recebimento da amostra do no setor de bioquímica. A coleta de dados foi realizada por quantificação usando a seguinte metodologia: **1. Solicitação médica:** sendo agendados para atendimento diário 240 pacientes no



serviço ambulatorial do laboratório de análises clínicas. Dentro desse contexto foram recolhidas do setor de recepção ambulatorial e analisadas diariamente 50 solicitações médicas. Os pontos observados foram: identificação completa dos pacientes e justificativa da solicitação dos exames; 2. Foram analisados o tempo entre coleta, centrifugação e recebimento no setor das amostras para os testes de tolerância a glicose, testes de tolerância a lactose, curva glicêmica e curva de lactose. Durante a coleta desses exames, o flebotomista escreveu o horário da coleta no tubo da amostra e foi computado o horário do recebimento da amostra no setor de bioquímica; 3. Foi analisado o quantitativo e justificativas de solicitações de recoletas: foram anotadas diariamente o quantitativo de recoletas solicitadas pelos analistas clínicos no setor de bioquímica e suas justificativas. Após o registro dos dados repassou-se as informações obtidas para planilhas do Microsoft Excel que eram atualizadas semanalmente.

3. RESULTADOS

QUALIDADE NAS SOLICITAÇÕES MÉDICAS - Durante o período de avaliação foram analisados um total de 2.950 solicitações médicas, sendo identificados os seguintes resultados: 1.960 (66,4%) apresentaram o nome e registro do prontuário do paciente na solicitação médica o que classificamos como identificação completa e, 990 (33,6%) não continham o prontuário do paciente só o nome sendo classificado como identificação incompleta. Com relação as justificativas médicas, em apenas 377 (12,8%) requisições o médico escreveu o motivo para a solicitação do exame e 2.573 (87,2%) não apresentavam justificativa para a solicitação médica. Conforme mostra a figura 1A, foram analisados a quantidade de exames com identificações completas e identificações incompletas, de um total de 50 avaliados diariamente, nela verificamos uma média diária de 34 solicitações com identificação completa e 16 com identificação incompleta. O teste t nos mostrou que: o máximo diário de solicitações com identificação completa foi de 44 e o mínimo de 23, sendo o desvio padrão de 4,6. Conforme mostra a figura 1B foram analisadas a quantidade diária de exames com justificativas e sem justificativas médicas, nela verificamos uma média diária de 6 exames com justificativas e 44 sem justificativas. O teste t nos mostrou que o máximo diário de solicitações com justificativas foram de 14 e o mínimo de 2, o desvio padrão foi de 2,4.

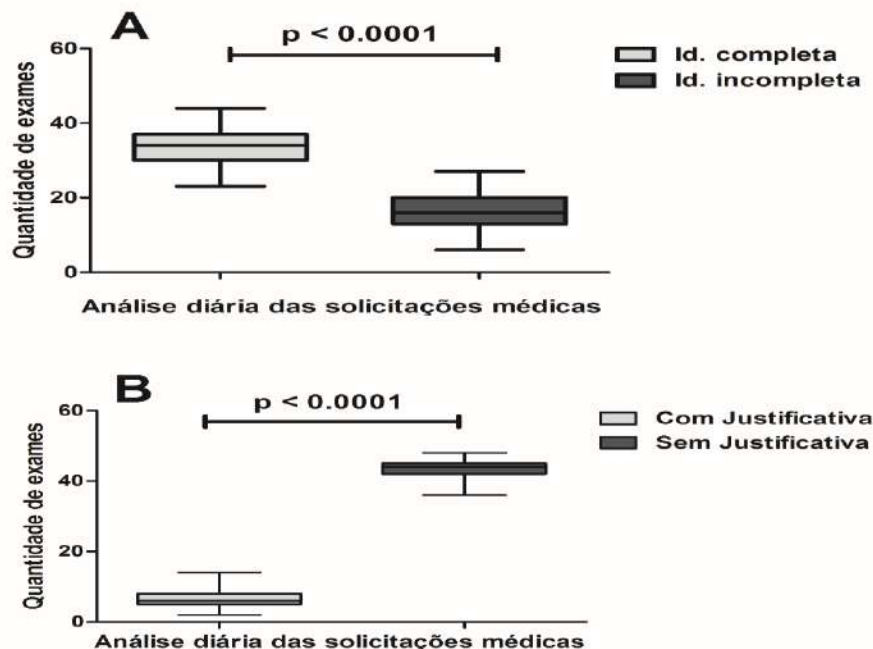
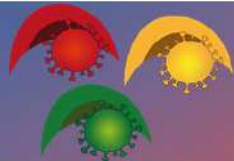


Figura 1- Análise das identificações e justificativa clínica das solicitações médicas.

TEMPO ENTRE COLETA E TRANSPORTE DA AMOSTRA-Foram analisadas no período do estudo todos os Testes Oraís de Tolerância a Glicose (TOTG), Testes Oraís de Tolerância a Lactose (TOTL), Curvas de Tolerância a Glicose (CTG) e Curvas de Tolerância a Lactose (CTL). Os horário de coleta e de recebimento da amostra no setor de bioquímica foram anotados, e os tempos decorridos entre esse processo de coleta e chegada da amostra no setor de bioquímica para análise. Dos tempos entre coleta, centrifugação e recebimento da amostra no setor de bioquímica para os testes de CTG onde foram analisados 83 pacientes, o tempo mínimo entre coleta e recebimento no setor foi de 21 minutos e o tempo máximo de 5 horas e 24 minutos e a média de todos os testes analisados de 1 hora e 56 minutos.

Foram analisados os tempos de 41 coleta e recebimento no setor de bioquímica de 10 pacientes que realizaram CTL, o tempo mínimo entre coleta e recebimento no setor foi de 38 minutos e o tempo máximo de 4 horas e 52 minutos e a média de todos os testes analisados foram de 2 horas 4 minutos. Dos TOTG foram analisados os tempos entre coleta e recebimento no setor de bioquímica de 51 pacientes, o tempo mínimo foi de 29 minutos e o tempo máximo de 5 horas e 54 minutos e a média de todos os testes analisados foram de 1 hora e 47 minutos. Para os TOTL Foram analisados os tempos de coleta e recebimento no setor de bioquímica de 10 pacientes o tempo mínimo de recebimento no setor foi de 28 minutos e o tempo máximo de 4 horas e 3 minutos e a média de todos os testes analisados foram de 1 hora e 52 minutos. A Figura 2 faz um compilado de todos os testes analisados em intervalos de 60 minutos. O pontilhado horizontal evidencia o indicador da qualidade elaborado de 120 minutos como tempo máximo para o recebimento da amostra no setor de bioquímica.

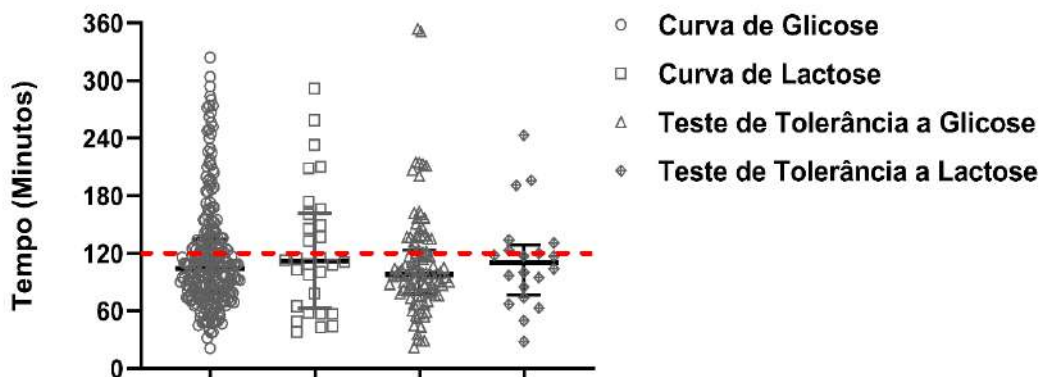
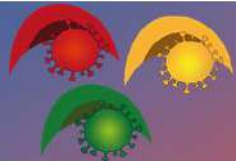


Figura 2- Análise do tempo entre coleta, processamento e recebimento da amostra no setor de bioquímica.

QUANTITATIVO DE RECOLETAS E JUSTIFICATIVAS - Diariamente foram anotados os dados relativos ao quantitativo de solicitação de recoletas e a justificativa do analista para esse pedido. No período da coleta de dados 115 pacientes tiveram suas amostras rejeitadas para análise e o pedido de uma nova coleta de sangue solicitado representando 0,3% de pacientes com pedido de recoleta. As justificativas para nova solicitação foram 33% para amostras hemolisadas, seguidas de 29,6% de amostras sem o motivo descrito para recoleta pelo analista, amostras insuficientes 21,7%, amostras coaguladas 8,7% e 7% em coletores inadequados. Conforme mostra a figura 3.

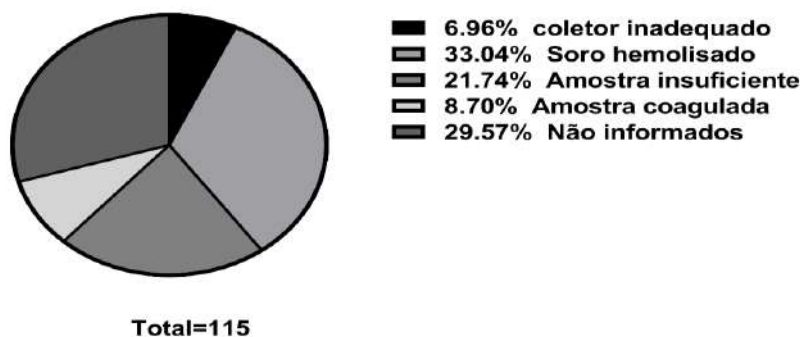


Figura 3- Análise do quantitativo e justificativas de recoleta.



4. DISCUSSÃO

A adequação da solicitação de teste e procedimentos dos formulários de solicitação agora são reconhecidas como componentes-chave na prestação de serviços laboratoriais válidos (PLEBANI *et al.*, 2014). Nossos resultados apontaram que 33,6% das solicitações não continham o preenchimento completo das informações dos pacientes, o que dificulta e atrasa o fluxo para a correta identificação, pois demanda um cuidado para confirmar a identidade do paciente. Um estudo realizado por Ambachew e colaboradores (2018), no Hospital do Gondar na Etiópia, semelhante ao nosso estudo, principalmente quando demonstrou que de um total de 3.259 amostras e formulários de solicitação de laboratório recebidos para análise geral dos erros, revelou que erros pré-analíticos associados ao formulário de solicitação representaram 49,9% devido à omissão de dados importantes.

A justificativa médica na solicitação do exame laboratorial se faz necessária para que o analista clínico obtenha as ferramentas essenciais para elaborar um laudo a partir dos dados fornecidos a respeito da história e/ou suspeita clínica do paciente (LUCENA, 2019). No entanto, em nosso estudo a maioria das solicitações analisadas não apresentavam justificativa para as solicitações médica, representando 87,2% no período analisado. Faz-se necessário um esforço de gerenciamento extra, para conscientizar sobre o impacto do formulário de solicitação de teste incompleto na qualidade do atendimento ao paciente (AMBACHEW *et al.*, 2018). Analisando o tempo de transporte e a influência no analito verifica-se que é importante que os tubos primários de coleta de amostras venosas sejam transportados para o laboratório o mais rápido possível, para poder medir os analitos dentro do tempo de estabilidade estabelecido (HENRIKSEN *et al.*, 2014; ODDOZE *et al.*, 2012).

Qualquer atraso da coleta de sangue para a centrifugação e análise ou qualquer desvio das condições padrão de transporte podem potencialmente alterar os resultados laboratoriais e subsequentemente ter um impacto negativo na segurança do paciente (GREEN, 2013). Em nosso estudo, dos 401 testes analisados referentes ao tempo de coleta e transporte de amostras foram anotados os horários da coleta e verificado o horário que a amostra chegava ao setor de bioquímica para iniciar a análise; obtivemos como menor tempo 21 minutos e o maior tempo foi de 5 horas e 54 minutos. Menezes e colaboradores (2010) observaram que a glicemia é alterada por diversos fatores, como tempo de armazenamento e velocidade de centrifugação. Em um estudo experimental, tubos com gel separador, foram centrifugados em tempos diferentes – o primeiro tubo foi centrifugado após uma hora da coleta; o segundo, após duas horas; e o terceiro, após três horas. Foi constatado um declive glicêmico considerável quanto maior foi o tempo entre a coleta e a centrifugação da amostra. Houve significativa alteração de 2 ± 12 mg/dl de glicose. O estudo de Menezes *et al.* (2010) tem uma importância para o estudo, pois a metodologia utilizada na coleta com tubos com gel separador também é usada no laboratório estudado, e isso reafirma a instabilidade do analito a longo prazo.

Essa variação pode ser prejudicial para o paciente, pois ele sai de um estado pré-diabetes para valores aceitos como normal, ou de um estado de tolerância a lactose para intolerância. No quantitativo de recoletas avaliado em nosso estudo, verificamos esta solicitação para 115 pacientes que tiveram suas amostras rejeitadas para análise. Entre os motivos para nova coleta estavam: soro



hemolisado (33%), o analista não informou o motivo da coleta (29%), amostra insuficiente (23%), amostra coagulada (9%) e recipiente inadequado (7%). Uma visão abrangente da literatura científica concluiu que as amostras hemolisadas são a causa mais frequente de não conformidade de amostras em laboratórios clínicos (40-70%), seguidas por volume insuficiente ou inadequado de amostra (10-20%), amostras biológicas coletadas no recipiente errado (5 a 15%) e coagulação indevida (5 a 10%) (LIPPI *et al.*, 2019). Os nossos resultados corroboram com os da literatura, mas apresentam um alto percentual de amostras em que o analista não informou o motivo da solicitação da coleta.

5. CONCLUSÃO

Este estudo constatou que os erros pré-analíticos são uma realidade desafiadora para o laboratório estudado, principalmente no âmbito do sistema público de saúde, onde os programas de acreditação laboratorial não são comumente inseridos. Dos três pontos avaliados, os resultados obtidos evidenciou-se que, o tempo de transporte entre a coleta e a chegada da amostra no setor para análise foi a não conformidade que mais causa prejuízo a nível de resultados fidedignos. Um ponto avaliado que teve seu resultado classificado como conformidade, foi o quantitativo de coleta, por estarem no percentual permitido pela literatura. Com relação as solicitações médicas se faz necessário a divulgação dos algoritmos produzidos neste estudo e em outros estudos publicados sobre esse tema, entre os residentes e médicos que prestam assistência aos pacientes atendidos no laboratório da pesquisa. Com relação às limitações do estudo, percebe-se que o mesmo teria um ganho substancial se todos os setores do laboratório estivessem incluídos. Recomenda-se, para estudos futuros, que essas limitações sejam revistas.

6. REFERÊNCIAS

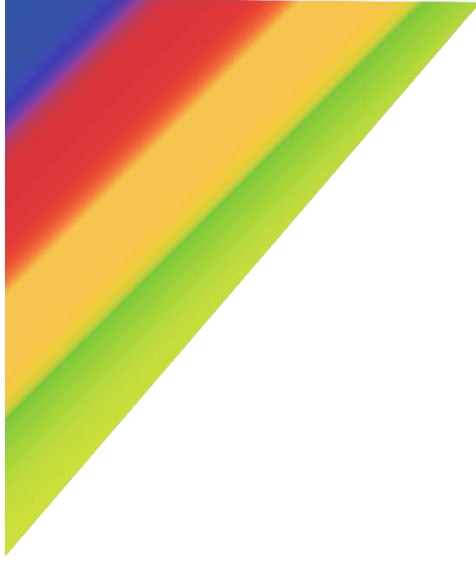
- AMBACHEW, S.; ADANE, K.; WOREDE, A.; MELAK, T.; ASMELASH, D.; DANTIE, S.; BAINES, H. W.; ABEBE, M.; BIADGO, B. Errors in the total testing process in the clinical chemistry laboratory at the University of Gondar Hospital, northwest Ethiopia. *Ethiopian Journal of Health Sciences*, Gondar, v. 28, n. 2, p. 235-244, mar. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/ejhs.v28i2.15>.
- GREEN, S. F. The cost of poor blood specimen quality and errors in preanalytical processes. *Clinical Biochemistry*, v. 46, n. 13-14, p. 1175-1179, sept 2013.
- HENRIKSEN, L. O.; FABER, N. R.; MOLLER, M. F.; NEXO, E.; HANSEN, A. B. Stability of 35 biochemical and immunological routine tests after 10 hours storage and transport of human whole blood at 21°C. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, v. 74, n. 7, p. 603-610, may. 2014.



- LIPPI, G.; VON, M. A.; CADAMURO, J.; SIMUNDIC, A. M. Blood sample quality. *Diagnosis*, Berlin, v. 6, n. 1, p. 25–31, mar. 2019. DOI: 10.1515/dx-2018-0018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29794250>.
- LUCENA, R. A. *Justificação médica na realização de exames de imagem: fatores de influência e informações clínicas mínimas*. 2019. 89 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019.
- MENEZES, E. G. B.; CUNHA, N. C. W.; NETO, R. M. *Comparação da determinação da glicose sanguínea usando o tempo como variável*. Newslab, Fortaleza, edição 100, 2010.
- ODDOZE, C.; LOMBARD, E.; PORTUGAL, H. Stability study of 81 analytes in human whole blood, in serum and in plasma. *Clinical Biochemistry*, v. 45, n. 6, p. 464–469, 2012.
- PLEBANI, M. Exploring the iceberg of errors in laboratory medicine. *Clinica Chimica Acta*, v. 404, n. 1, p. 16–23, june. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2009.03.022>
- PLEBANI, M. The detection and prevention of errors in laboratory medicine. *Annals of Clinical Biochemistry*, v. 47, n. 2, p. 101–110, 2010.
- PLEBANI, M.; CHIOZZA, M. L.; SCIACOVELLI, L. Towards harmonization of quality indicators in laboratory medicine. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, v. 51, n. 1, p. 187–195, jan. 2013.

7. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Ministério da Saúde, a Universidade Federal de Pernambuco, ao Hospital das Clínicas, ao Centro de Ciências Sociais Aplicadas e ao Programa de Pós-graduação em Gestão e Economia da Saúde.



DESENVOLVIMENTO E IMPLEMENTAÇÃO DE MÉTODOS *IN SILICO*



ÁREA DE SUBMISSÃO: Desenvolvimento e Implementação de Métodos *In Silico*

AVALIAÇÃO *IN SILICO* DO POTENCIAL ANTIVIRAL DE UM COMPOSTO ACRIDÍNICO PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÕES POR SARS-COV 2

S. L. ALBINO¹, G. L. S. SOUSA², J. N. S. GOMES³, M. B. SANTOS³, Y. M. S. M. SILVA³, L. L. LÓCIO³ e R. O. MOURA³

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica;

² Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-graduação em Química;

³ Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Farmácia.

E-mail para contato: sonaly.albino@ufpe.br

RESUMO – *O ano 2020 está marcado pelo estabelecimento de uma pandemia causada pelo vírus SARS-CoV 2 e, até o desenvolvimento de uma vacina, a farmacoterapia apresenta-se como a melhor alternativa para contenção do agravamento dos quadros clínicos. Desse modo, encontra-se a necessidade da obtenção de fármacos eficazes contra o vírus e, nesse sentido, podem-se ressaltar compostos acridínicos como potenciais agentes quimioterápicos. Assim, esse trabalho objetivou a avaliação *in silico* do potencial antiviral do derivado N-(6-cloro-2-metóxi-acridina-9-il)-2-ciano-3-fenilacril-hidrazida (composto 2), previamente publicado com atividade antimalárica, frente a um potencial alvo farmacológico para SARS-CoV2. As estruturas cristalizadas do alvo protease principal (PDB: 5RH4, 5RGZ e 5RGY) foram obtidas por meio do PDB, e utilizadas para realização do *docking* molecular com auxílio dos softwares SPARTAN 14, GOLD 2020.1, PyMOL 2.3.2 e Discovery Studio Visualizer 2017 R2 Client. A avaliação do composto demonstrou afinidade boa com o alvo, uma vez que o mesmo apresentou valores de energia de interação superiores a maioria dos controles positivos e ligantes co-cristalizados utilizados. O composto estabilizou-se no alvo especialmente por interações por carga e hidrofóbicas aos resíduos de aminoácidos Cys-His, Glu166, His41, Met165, etc. Os resultados obtidos fornecem embasamento para o desenvolvimento de estudos posteriores *in vitro*, visto a potencialidade visualizada por meio desse estudo preliminar.*

Palavras-chave: *Docking molecular. Protease principal. COVID-19.*

ABSTRACT – *The year 2020 is marked by the establishment of a pandemic caused by the SARS-CoV 2 virus and, until the development of a vaccine, pharmacotherapy presents itself as the best*



alternative to contain the worsening of clinical conditions. Thus, there is a need to obtain effective drugs against the virus and, in this sense, acridine compounds can be highlighted as potential chemotherapeutic agents. Therefore, this work proposed the *in silico* evaluation of the antiviral potential of the derivative *N'*-(6-chloro-2-methoxyacridin-9-yl)-2-cyano-3-phenylacrylohydrazide (compound 2), previously published with antimalarial activity, in front to a potential pharmacological target for SARS-CoV2. The crystallized structures of the main protease target (PDB: 5RH4, 5RGZ and 5RGY) were obtained through the PDB, and used to perform molecular docking with the assistance of SPARTAN 14, GOLD 2020.1, PyMOL 2.3.2 and Discovery Studio Visualizer 2017 R2 Client. The evaluation of the compound demonstrated its affinity for the target, so that it presented values of interaction energy higher than most of the positive controls and co-crystallized ligands used. The compound stabilized on the target mainly by charge and hydrophobic interactions with amino acid residues Cys-His, Glu166, His41, Met165, etc. The results obtained provide a basis for the development of further studies *in vitro*, given the potential visualized through this preliminary study.

Keywords: Molecular docking. Main protease. COVID-19.

1. INTRODUÇÃO

Os coronavírus constituem um grupo de viroses pertencentes à família Coroviridae, capazes de causar doenças em humanos e animais. Atualmente, a sétima espécie identificada capaz de infectar humanos, síndrome respiratória aguda grave do coronavírus 2 (SARS-CoV 2), é responsável por provocar uma pandemia que surgiu em Wuhan, na China, em 2019, e posteriormente se espalhou por quase todos países e territórios mundiais (Anand *et al.*, 2020; Mahmoud *et al.*, 2020). De acordo com o Painel do Centro de Ciência e Engenharia de Sistemas da Johns Hopkins University, aproximadamente 13 milhões de casos foram confirmados e 571 mil mortes foram reportadas, até o dia 13/07/2020.

Atualmente, não existem fármacos específicos para o tratamento da infecção viral em questão, e os estudos realizados não foram capazes de confirmar a eficácia de fármacos já encontrados na clínica, com outras indicações terapêuticas, contra o SARS-CoV 2 (Ma *et al.*, 2020). Embora vacinas e anticorpos direcionados à SARS-CoV-2 estejam sendo estudados, esses ainda requerem avaliações mais extensas e cuidadosas sobre eficácia e segurança. Além disso, mesmo com a vacina, alguns pacientes podem não responder de forma eficiente e desenvolverem a doença proveniente do vírus, sendo necessário arsenal farmacológico que possa combater o mesmo e os sintomas decorrente de sua infecção (Nittari *et al.*, 2020). Desse modo, os dados estatísticos crescentes revelam a necessidade emergente de alternativas terapêuticas viáveis para erradicação do vírus, seja ao agir diretamente sobre esse, ou por uma ação imunomoduladora.

Dentre os potenciais alvos farmacológicos que podem impedir a replicação viral e consequente progressão da doença, destaca-se a protease principal (M^{Pro}). Essa enzima do tipo quimotripsina, também conhecida como protease do tipo 3-C ($3CL^{Pro}$), realiza a clivagem no terminal C de poliproteínas e está diretamente relacionada com a replicação do vírus (Zhou *et al.*, 2020). Portanto, a obtenção de fármacos ou candidatos a fármacos que apresentem a potencialidade de inibir a enzima em questão apresenta-se pertinente.

Na avaliação e busca de moléculas com potencial biológico, os compostos heterocíclicos ocupam um lugar de destaque em vários grupos de pesquisa em todo o mundo. Atualmente, existem aproximadamente 90 fármacos heterocíclicos nitrogenados aprovados para uso no



tratamento de algumas infecções, como o vírus da influenza, vírus sincicial respiratório (RSV), vírus da hepatite C, entre outros (De Clercq; Guangdi, 2016).

Dentre os compostos heterocíclicos de grande potencial quimioterápico, encontram-se os compostos acridínicos. Sua atividade quimioterápica tem sido atribuída a uma diversidade de mecanismos de ação, o que torna seus derivados potenciais para o tratamento de diversas patogenias (Belmont *et al.*, 2007; Schmidt *et al.*, 2015). Esses compostos, também nomeados benzo-quinolinas, assemelham-se estruturalmente as quinolinas, classe de compostos a qual a cloroquina pertence. Esse medicamento ganhou espaço no cenário mundial devido aos seus bons resultados *in vitro* frente ao vírus, mas apresenta-se limitado devido à alta toxicidade ao hospedeiro (Liu *et al.*, 2020).

Silva *et al.* (2018) realizaram estudos envolvendo a síntese e avaliação da atividade antimalárica de compostos acridínicos. O composto 2 (*N*-(6-cloro-2-metóxi-acridina-9-il)-2-ciano-3-fenilacril-hidrazida), avaliado frente cepas de *P. falciparum* W2, apresentou excelente atividade antiplasmódica ($IC_{50} = 0,90 \mu M$) e alta seletividade ao parasita, em relação às células do hospedeiro (HepG2) (SI = 90), apresentando-se mais eficaz que o controle positivo primaquina e similar a amsacrina. Desse modo, tendo em vista a potencialidade do composto sintetizado como quimioterápico antimalárico, objetiva-se determinar *in silico* uma possível afinidade desse frente ao alvo protease principal do SARS-CoV-2 cristalizado com diferentes inibidores, visando contribuir na expansão do arsenal de possíveis compostos a serem inseridos na terapia medicamentosa.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Selecionou-se um derivado acridínico, o composto 2 (*N*-(6-cloro-2-metóxi-acridina-9-il)-2-ciano-3-fenilacril-hidrazida), previamente publicado por Silva *et al.* (2018), e realizaram-se estudos *in silico* por *docking molecular* com auxílio dos softwares SPARTAN 14, GOLD 2020.1, PyMOL 2.3.2 e Discovery Studio Visualizer 2017 R2 Client, com prévia obtenção das estruturas tridimensionais do potencial alvo farmacológico para ação no vírus por meio do RCSB Protein Data Bank (PDB), sendo essas: protease 3CL^{pro} da SARS-CoV-2 em complexo com Z1530425063 (Mpro-x2659) (PDB ID: 5RH4), Z1343543528 (Mpro-x2600) (PDB ID: 5RGZ) e Z1535580916 (Mpro-x2581) (PDB ID: 5RGY). Visto que as estruturas cristalográficas dos alvos estão co-cristalizados com as moléculas ligantes, foi realizada, para cada estrutura, a redocagem como método de validação. Para determinação da potencialidade do composto, o mesmo foi comparado aos ligantes co-cristalizados do respectivo alvo, e aos controles positivos: cloroquina, nitazoxanida e nafamostat.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As abordagens atuais detêm-se em controlar sintomas, prevenir infecções e tentar evitar o avanço da doença com fármacos já conhecidos. O reposicionamento de fármacos ainda é uma solução mais rápida e segura para a COVID-19. A Tabela 1 apresenta resultados preliminares, testes *in vitro*, de alguns fármacos que foram estudados para inibição do agente da pandemia de SARS, e utilizados como parâmetros de potencialidade neste estudo.

Tabela 1 – Atividade *in vitro* frente à SARS-CoV-2.

Fármaco	EC ₅₀ (SARS-CoV-2)	Referência
Cloroquina	1.13 µM	Liu <i>et al.</i> , 2020
Nitazoxanida	2.12 µM	Yavuz; Ünal, 2020
Nafamostat	0.010 nM	Yamamoto <i>et al.</i> , 2020

A Figura 1 apresenta as estruturas químicas dos compostos estudados, ressaltando fragmentos estruturais importantes que parecem ser essenciais para potencialidade dos compostos, tais como a presença do nitrogênio, anéis aromáticos condensados, grupamentos carbonilados, halogênios, entre outros.

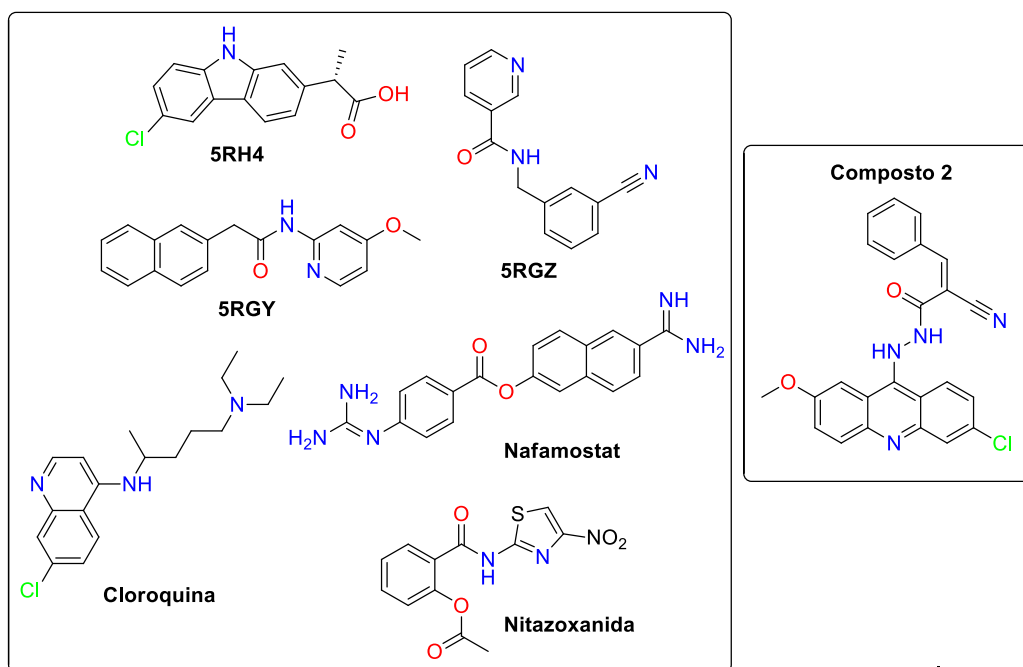


Figura 1 – Estruturas químicas utilizadas no estudo.

O mapeamento genético do novo coronavírus proporciona a utilização de ferramentas da bioinformática, como o *docking* molecular, para o desenho racional de ligantes moleculares que possam inibir o sítio ativo de interesse. A Tabela 2 apresenta os resultados do *docking* para o composto 2 (*N*-(6-cloro-2-metóxi-acridina-9-il)-2-ciano-3-fenilacril-hidrazida), ressaltando parâmetros de validação do estudo, como RMSD, e a potencialidade do composto em questão por um comparativo com os fármacos supracitados e com os ligantes originais para a protease 3CL^{pro}, disponíveis no PDB.

Tabela 2 – Estudo de docking frente a protease principal do SARS-CoV-2.

COMPOSTO	5RH4	5RGY	5RGZ
Composto 2	49,89	54,14	68,07
Cloroquina	47,15	54,07	62,11
Nitazoxanida	44,38	44,58	50,86
Nafamostat	51,53	53,97	66,47
Ligante	35,43	54,79	55,02
RMSD	0,95	0,57	0,48

Os resultados de interação na Tabela 2 indicam uma afinidade significativa entre o composto 2 e a protease estudada. Por meio dos valores de RMSD, observa-se que os métodos utilizados para mensurar essa potencialidade foram eficientes. Em uma relação comparativa com os três fármacos utilizados como padrão positivo, o composto 2 obteve energias de interação superiores à dois, cloroquina e nitazoxanide, enquanto que apresentou energias semelhantes ao nafamostat. Os estudos realizados *in vitro* para a SARS-CoV-2, apresentados na Tabela 1, tiveram uma correlação direta com os resultados *in silico*, apresentados na Tabela 2. Estruturalmente, a liberdade conformacional atribuída a conectores formados por amidas ou ésteres, como também, a presença de porções aromáticas condensadas no composto, favoreceram os melhores resultados.

Segundo Macchiagodena *et al.* (2020), a potencialidade dos inibidores dessa protease está associada a interação com a díade catalítica Cys-His, Cys-145 e His-41. A Figura 2 apresenta os resultados de interação do nafamostat e do composto 2 com a protease 3CL^{pro}.

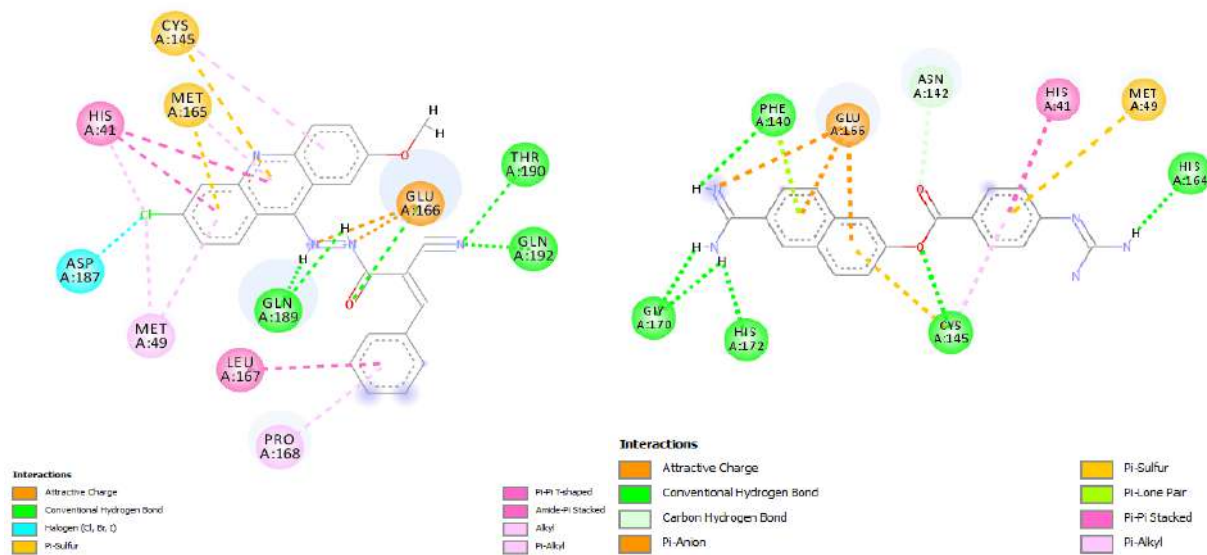
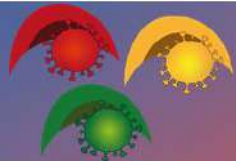


Figura 2 – Interações intermoleculares encontradas entre composto 2 e nafamostat com a protease 3CL^{pro} (PDB:5RGZ).

A partir de estudos conformacionais apresentados na Figura 3, após o *docking* molecular, constata-se que o núcleo acridínico é responsável pela interação com a díade Cys-His, para o composto 2 (estrutura na cor verde). No caso do nafamostat (estrutura na cor amarela), uma ligação



de hidrogênio é formada pelo resíduo do éster, contido na sua estrutura, com a cisteína (Cys145). Estas são interações mais efetivas e podem favorecer e/ou justificar sua potência para esta protease. Para o nitazoxanida (estrutura na cor pink), também foram observadas interações hidrofóbicas com os dois resíduos citados. Aparentemente, assim como relatado anteriormente, estes resíduos constituem o sítio ativo da protease 3CL^{pro}.

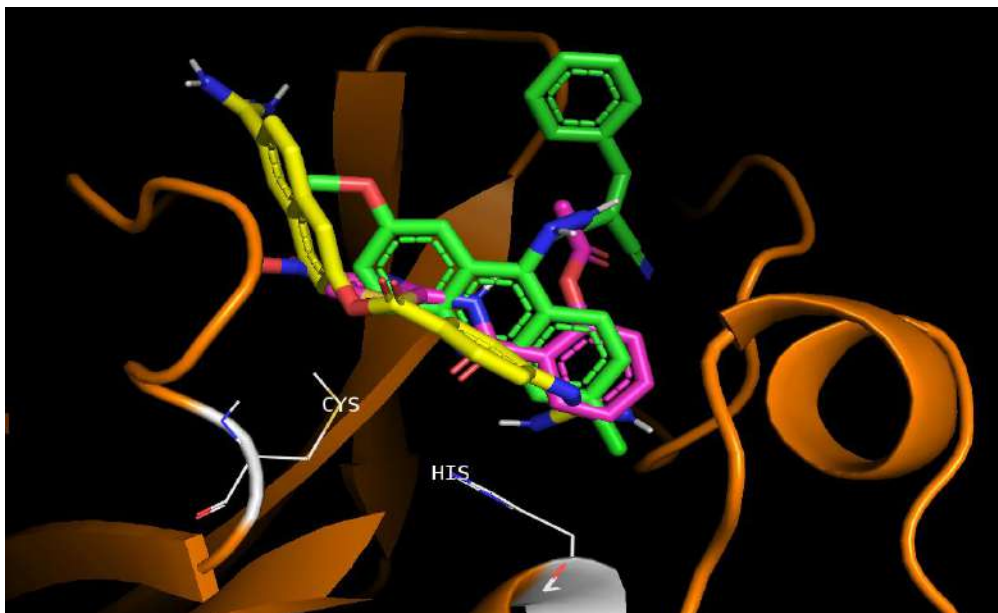


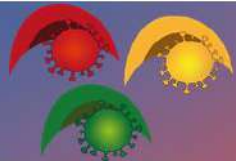
Figura 3 – Díade Cys-His da protease principal (PDB: 5RGZ).

4. CONCLUSÃO

Como resposta à pandemia do novo coronavírus, diversos grupos de pesquisa têm buscado a obtenção de uma vacina ou um tratamento eficaz contra o vírus, em especial medicamentoso. Este estudo apontou uma semelhança estrutural relevante entre o composto 2 e fármacos que estão sendo testados contra o vírus SARS-CoV2. A protease principal é essencial na replicação do vírus e sua inibição apresenta-se como um mecanismo farmacológico muito promissor. O composto 2 apresentou resultados de encaixe no alvo notáveis e superiores aos controles positivos utilizados, na maioria das análises. Baseando-se nos resultados de energias apresentadas pelos inibidores co-cristalizados obtidos pelo PDB e comparando-os com os controles positivos e o composto 2, esses indicam uma possível inibição da replicação do SARS-CoV2 por meio da via proposta, condizendo com os resultados *in vitro* citados no trabalho.

5. REFERÊNCIAS

- ANAND, K. B.; KARADE, S.; SEN, S.; GUPTA, R. M. SARS-CoV-2: Camazotz's Curse. *Medical Journal Armed Forces India*, v. 76, n. 2, p. 136–141, 2020.
- BELMONT, P.; BOSSON, J.; GODET, T.; TIANO, M. Acridine and acridone derivatives, anticancer properties and synthetic methods: where are we now? *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, v. 7, n. 2, p. 139-169, 2007.



DE CLERCQ E.; LI G. Approved antiviral drugs over the past 50 years. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 29, p. 695-747, 2016.

Johns Hopkins University. Coronavirus COVID-19 (2019-nCoV). Disponível em: <<https://www.arcgis.com/apps/opsdashboard/index.html#/bda7594740fd40299423467b48e9ecf6>>. Acesso em: 13 julho 2020.

LIU, J. CAO, R.; XU, M. WANG, X.; ZHANG, H. HU, H.; LI, Y.; HU, Z.; ZHONG, W.; WANG, M. Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection in vitro. *Cell Discovery*, v. 6, n. 16, 2020.

MA, C.; SU, S.; WANG, J.; WEI, L.; DU, L.; JIANG, S. From SARS-CoV to SARS-CoV-2: safety and broad-spectrum are important for coronavirus vaccine development. *Microbes and Infection*, n. November 2002, 2020.

MACCHIAGODENA, M.; PAGLIAI, M.; PROCACCI, P. Inhibition of the Main Protease 3CLPro of the Coronavirus Disease 19 via Structure-Based Ligand Design and Molecular Modeling. Disponível em: <<https://arxiv.org/abs/2002.09937>>.

MAHMOUD, I. S.; JARRAR, Y. B.; ALSHAER, W.; ISMAIL, S. SARS-CoV-2 entry in host cells-multiple targets for treatment and prevention. *Biochimie*, v. 175, p. 93–98, 2020.

NITTARI, G.; PALLOTTA, G.; AMENTA, F.; TAYEBATI, S. K. Current pharmacological treatments for SARS-COV-2: A narrative review. *European Journal of Pharmacology*, p. 173328, 2020.

SCHMIDT, A.; LIU, M. Chapter Four-Recent Advances in the Chemistry of Acridines. *Advances in Heterocyclic Chemistry*, v. 115, p. 287-353, 2015.

SILVA, M. et al. Correlation between DNA/HSA-interactions and antimalarial activity of acridine derivatives: Proposing a possible mechanism of action. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 189, p. 165–175, 2018.

YAMAMOTO, M.; KISO, M.; SAKAI-TAGAWA, Y.; IWATSUKI-HORIMOTO, K.; IMAI, M.; TAKEDA, M.; KINOSHITA, N.; OHMAGARI, N.; GOHDA, J.; SEMBA, K.; MATSUDA, Z.; KAWAGUCHI, Y.; YAWAOKA, Y.; INOUE, J. The anticoagulant nafamostat potently inhibits SARS-CoV-2 infection in vitro: an existing drug with multiple possible therapeutic effects. Disponível em <doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.22.054981>>.

YAVUZ, S. S.; ÜNAL S. Antiviral treatment of COVID-19. *Turk. J. Med. Sci.*, v. 50, p. 611-619, 2020.

ZHOU, P.; YANG, X.; WANG, X.; HU, B.; ZHANG, L.; ZHANG, W.; SI, H.; ZHU, Y.; LI, B.; HUANG, C.; CHEN, H.; CHEN, J.; LUO, Y.; GUO, Y.; JIANG, R.; LIU, M.; CHEN, Y.; SHEN, X.; WANG, X.; ZHENG, X.; ZHAO, K.; CHEN, Q.; DENG, F.; LIU, L.; YAN, B.; ZHAN, F.; WANG, Y.; XIAO, G.; SHI, Z. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, v. 579, p.270-273, 2020.

6. AGRADECIMENTOS

À FACEPE - Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Desenvolvimento e Implementação de Métodos In Silico

AVALIAÇÃO *IN SILICO* E CITOTOXICIDADE DE DERIVADOS TIAZOLIDÍNICOS COM POTENCIAL AGONISTA DE PPAR- γ

M. A. B. CORREIA¹, J. F. BRANCO-JÚNIOR², E. F. SANTOS-JUNIOR¹, M. J. B. M. RÊGO¹,
M. C. PEREIRA¹, L.F.G.R. FERREIRA⁴, M. Z. HERNANDES⁴, C. D. L. MARQUES³, A. L. B.
P. DUARTE³, M. R. GALDINO-PITTA², M. G. R. PITTA¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas;

² Universidade Federal de Pernambuco, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino, Laboratório de Síntese e Planejamento de Fármacos;

³ Universidade Federal de Pernambuco, Hospital das Clínicas, Serviço de Reumatologia;

⁴ Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Química Teórica Medicinal

E-mail para contato: marandrezabcorreia@yahoo.com.br

RESUMO – Atualmente se faz necessário o uso de ferramentas computacionais que possam prever a ação de novas moléculas com potencial farmacológico. Os derivados tiazolidínicos (TZDs) são uma dessas moléculas, que vêm sendo sintetizadas e estudadas por atuarem como agonistas de receptores ativadas por proliferadores de peroxissoma (PPAR γ), que dentre outras funções possui atividade anti-inflamatória. Com o objetivo de avaliar novos TZDs, ensaios de docking molecular foram utilizados em uma série de moléculas apelidadas de LPSF/JB-3, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 14 e 20, bem como a avaliação de sua toxicidade em células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) de voluntários sadios. Para alcançar estes objetivos, o programa SPARTAN 08, GOLD 5,6, o método RMI e a pontuação ChemPLP foram utilizados utilizando como fármaco de referência a rosiglitazona. As PBMC de amostras de sangue periférico de três voluntários sadios foram isoladas, plaqueadas e tratadas nas concentrações 10 e 75mM para avaliar sua citotoxicidade com MTT. O TZD LPSF/JB-20 apresentou melhor resultado em comparação com a rosiglitazona por apresentar uma pontuação de (76,73), ligação de hidrogênio e uma afinidade em seu sítio ativo de 2,8 Å. As IC₅₀ obtidas demonstraram que os TZDs em geral não apresentam citotoxicidade nas doses testadas. Esses achados sugerem o potencial anti-inflamatório desse derivado, sendo necessários estudos adicionais.

Palavras-chave: PBMC, docking molecular, derivados tiazolidínicos

ABSTRACT – Currently, it is necessary to use computational tools that can predict the action of new molecules with pharmacological potential. Thiazolidine derivatives (TZDs) are one of these molecules, which have been synthesized and studied because they act as agonists of receptors activated by peroxisome proliferators (PPAR γ), which among other functions have anti-inflammatory activity. In order to evaluate new TZDs, molecular docking assays were used on a



series of molecules dubbed LPSF / JB-3, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 14 and 20, as well as assessing their toxicity in peripheral blood mononucleated cells (PBMC) from healthy volunteers. To achieve these objectives, the SPARTAN 08' program, GOLD 5.6, the RMI method and the ChemPLP score were used using rosiglitazone as the reference drug. PBMC from peripheral blood samples from three healthy volunteers were isolated, plated and treated at concentrations 10 and 75mM to assess their cytotoxicity with MTT. The TZD LPSF / JB-20 showed a better result compared to rosiglitazone for having a score of (76.73), hydrogen bonding and an affinity in its active site of 2.8 Å. The obtained IC50s demonstrated that TZDs in general do not present cytotoxicity in the tested doses. These findings suggest the anti-inflammatory potential of this derivative, requiring further studies.

Keywords: PBMC, molecular docking, thiazolidine derivatives

1. INTRODUÇÃO

Pesquisas em desenvolvimento farmacêutico (P&D) demandam altos investimentos, que nem sempre irão resultar em um fármaco eficiente, sendo assim uma atividade arriscada do ponto de vista financeiro (KHANNA, 2012). Cada vez mais compostos são sintetizados, mas o número de drogas que efetivamente chegam ao mercado não acompanha esse ritmo (GAULTON *et al.*, 2011). Isso é um dado preocupante, visto que a necessidade da população por novos fármacos também aumenta com o tempo. Dentre vários grupos de fármacos, os derivados tiazolidínicos vêm sendo estudados pela capacidade de atuar como agonista de PPARs (MASSARO *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2017).

Os PPARs são uma classe de receptores nucleares que atuam como fatores de transcrição, ligando ou desligando a síntese de genes específicos no núcleo celular (TAVARES; HIRATA; HIRATA, 2007). A expressão desses genes desempenha uma ação importante na resposta imune devido à capacidade de inibir a expressão de citocinas inflamatórias e estimular a diferenciação de células imunes em fenótipos anti-inflamatórios, além de ativar o fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB) (TAVARES; HIRATA; HIRATA, 2007).

Com o intuito de otimizar os estudos e o desenvolvimento de novos fármacos, utilizamos ensaios *in silico* de *docking* molecular no ligante PPAR γ , para avaliar uma série de nove TZDs e ensaios *in vitro* para avaliar sua toxicidade em PBMC.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

As estruturas tridimensionais dos compostos LPSF/JBs, incluindo seus isômeros E e Z, foram desenhadas utilizando o programa SPARTAN 08' (SPARTAN, 2008) e as estruturas otimizadas aplicando-se o método RM1 (ROCHA, *et al.*, 2006). A análise de *docking* foi realizada no ligante PPAR γ (sigla: PDB:5YCP) no site <http://www.rcsb.org>, a qual possui o composto rosiglitazona (sigla: BRL) como ligante co-cristalizado. O sítio ativo foi definido como todos os átomos presente no raio de 6,0 Å a partir da posição onde o ligante co-cristalizado BRL se encontra. O programa GOLD 5.6 (Gold software, 2018) foi utilizado para a realização dos cálculos de *docking*, utilizando a função de pontuação ChemPLP. Para os ensaios *in vitro*, o projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (CEP/CCS/UFPE), sob o registro 55261116.2.0000.5208. Sangue periférico de 3 voluntários sadios foram utilizados para obtenção das PBMCs através da técnica de centrifugação em gradiente de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare). Após a separação, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços (5×10^5 células/poço) e tratadas nas concentrações de 10 μ M e 75 μ M dos derivados tiazolidínicos

LPSF/JB-3, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 14 e 20, sendo incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 48h. Após este período, foram adicionados às células 20µL de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), e mantidas por mais 3h. Após o período, foram adicionados 130 µL de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) a 20% e, após 24h, a absorbância foi lida em uma leitora de placas (Elx808, Biotek, EUA) a 570 nm. A viabilidade foi calculada a partir dos poços tratados com dimetilsulfóxido (DMSO) (0,1%). O ensaio foi realizado em triplicata. Para expressar a porcentagem de células metabolicamente ativas, foram calculadas as viabilidades celulares de cada uma das doses testadas no software Microsoft Office Excel. A IC 50 (concentração requerida para inibir 50% da viabilidade das células) foi calculada utilizando o software de estatística Origin v. 8,0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Modelagem molecular dos derivados tiazolidínicos- Em termos de afinidade predita pela função de pontuação (ChemPLP), os compostos LPSF/JB-8-Z (84,15), LPSF/JB14-E (81,63), LPSF/JB-20-Z (81,00), LPSF/JB-3-E (79,98) e LPSF/JB12-E (77,72) obtiveram melhores pontuações que a rosiglitazona (76,73). A rosiglitazona (Figura 1-a) realizou uma ligação de hidrogênio com o resíduo SER289 com a distância (doador-aceitador) de 2,8 Å, e contatos hidrofóbicos com os resíduos ILE281, GLY284, CYS285, LEU330, VAL339, ILE341, LEU353, PHE363, MET364 e HIS449. De forma similar, o composto LPSF/JB20-Z (Figura 1-b) também realizou ligação de hidrogênio com o mesmo resíduo que a rosiglitazona (SER289) com distância de 2,5 Å, dois pi-pi stackings com os resíduos PHE282 e HIS449, ambos T-shaped, e contatos hidrofóbicos com os resíduos CYS285, GLN286, ARG288, ILE326, TYR327, LEU330, LEU333, ILE341, PHE363e LEU469.

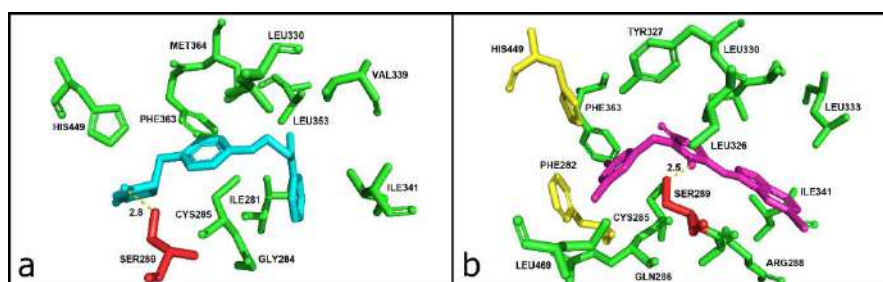


Figura 1. As interações intermoleculares entre o sítio ativo da PPAR γ e os compostos (a) rosiglitazona (ciano), (b) LPSF/JB20-Z (magenta)

Uma série de TZDs foi projetada utilizando o sítio ativo cristalizado do PPAR- γ . As moléculas que apresentaram melhores pontuações foram sintetizadas e posteriormente testadas. Os ensaios demonstraram que o composto manteve atividade antidiabética comparável à droga pioglitazona, (fármaco padrão agonista de PPAR γ) por apresentar substituição de substituintes não polares que retiram elétrons na quarta posição do esqueleto de pirimidina e aceitador de ligações de hidrogênio no nitrogênio do núcleo da tiazolidina, para inibir o receptor do PPAR γ (SAWANT, *et al.*, 2018).

O procedimento de *docking* molecular também foi realizada em um novo composto de tiazolidina, o GQ-11, indicando que o composto por um agonista parcial/duplo do PPAR α/γ . Ensaios *in vitro* utilizando camundongos, mostraram que ele tem efeitos antidiabéticos por atuar



nos receptores de LDL (LDLr $-/-$) (SILVA et al., 2018).

Ensaio do MTT - A viabilidade celular de PBMCs de voluntários sadios foram avaliadas após exposição aos TZDs nas doses de 10 e 75 μ M (IC50/DP). Os compostos apresentaram, em geral, viabilidade acima de 75%, exceto o LPSF/JB-13, demonstrando assim um baixo grau de citotoxicidade para a grade maioria dos compostos testados (tabela 1).

Tabela 1. Viabilidade celular de PBMCs de voluntários sadios (n=3) após exposição aos derivados tiazolidínicos LPSF/JBs na dose de 10 μ M e 75 μ M.

TZD	Viabilidade (%)	
	10 μ M	75 μ M
LPSF/JB-3	98,17 \pm 1,86	99,53 \pm 0,8
LPSF/JB-6	93,62 \pm 11,04	95,54 \pm 7,70
LPSF/JB-8	100 \pm 0	100 \pm 0
LPSF/JB-9	96,34 \pm 3,8	99,73 \pm 0,46
LPSF/JB-11	92,11 \pm 8,34	93,15 \pm 6,32
LPSF/JB-12	98,48 \pm 7,82	97,82 \pm 1,94
LPSF/JB-13	72,23 \pm 4,11	74,54 \pm 8,74
LPSF/JB-14	91,12 \pm 4,25	93,87 \pm 9,41
LPSF/JB-20	95,57 \pm 7,67	78,50 \pm 12,21

4. CONCLUSÃO

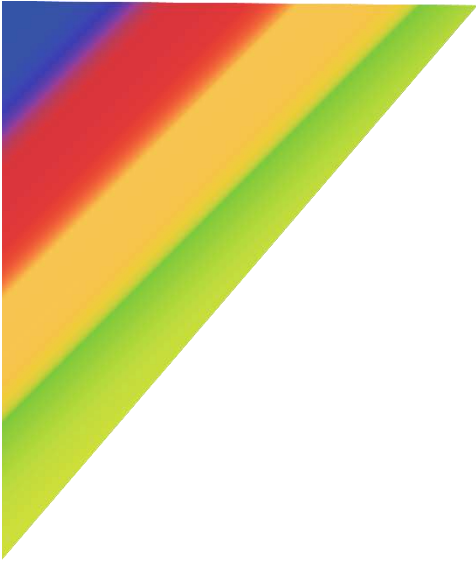
Em termos de afinidade predita, o composto LPSF/JB-20 apresentou afinidades ao sítio ativo do PPAR γ com pontuação melhor que a rosiglitazona, agonista de referência de PPAR γ . Os TZDs LPSF/JB-3, 6, 8, 9, 11, 12, 14 e 20 não apresentaram citotoxicidade em PBMC nas doses testada.

5. REFERÊNCIAS

- SAWANT, R. L., Wadekar, J. B., Kharat, S. B., & Makasare, H. S. Targeting PPAR- γ to design and synthesize antidiabetic thiazolidines. *EXCLI journal*, 17, 598, 2018.
- SILVA, Jacqueline C., et al. GQ-11: a new PPAR agonist improves obesity-induced metabolic alterations in LDLr $-/-$ mice. *International Journal of Obesity*, 42.5: 1062-1072, 2018.
- TAVARES, V.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C. Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v. 51, n. 4, p. 526–533, 2007.
- WANG, X. et al. Astragaloside IV, a Natural PPAR γ Agonist, Reduces A β Production in Alzheimer's Disease Through Inhibition of BACE1. *Molecular Neurobiology*, v. 54, n. 4, p. 2939–2949, 2017.

6. AGRADECIMENTOS

UFPE, NUPIT-SG, LINAT, CNPq.



GESTÃO, ECONOMIA E SAÚDE



ÁREA DE SUBMISSÃO: Gestão, Economia e Saúde

REVISÃO SISTEMÁTICA DE ESTUDOS DE AVALIAÇÃO ECONÔMICA DO IMPLANTE DA VALVA AÓRTICA TRANSCATETER NO TRATAMENTO DA ESTENOSE AÓRTICA GRAVE

F. A. de MELO¹, F. J. A. FALCÃO¹, E. V. FILHO¹, A. A. dos S. SOUZA¹, M. M. B. M. da SILVEIRA², D. C. CAVALCANTI³, I. P. G. SOUTO⁴, F. ZANGHELINI⁵, C. A. S. ANDRADE⁶

¹Universidade Federal de Pernambuco, Hospital das Clínicas;

²Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica;

³Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Odontologia;

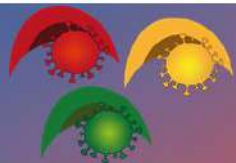
⁴Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Sociais Aplicadas, Departamento de Economia;

⁵Newcastle University, National Institute for Health Research- Innovation Observatory;

⁶Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica.

E-mail para contato: fmelo.ufpe@gmail.com

RESUMO – O desenvolvimento de novas técnicas para o tratamento efetivo da estenose grave da válvula aórtica (EAo) se impõe para reduzir a morbimortalidade do procedimento cirúrgico. O implante da valva aórtica transcaterter (TAVI) surgiu com essa finalidade. O estudo teve como objetivo realizar uma revisão sistemática de avaliações econômicas (AE) completa que avaliaram o TAVI no tratamento da EAo grave em pacientes com alto e intermediário risco cirúrgico. Foi realizada busca no MEDLINE, EMBASE, CRD e COCHRANE de janeiro a julho de 2019, sobre o TAVI comparado à substituição cirúrgica da valva aórtica (SAVR). Foram elegíveis 16 estudos de AE completas de análise de custo-efetividade e utilidade. Desses, doze estudos corresponderam ao paciente com alto risco cirúrgico e quatro com risco intermediário. Apenas sete estudos usaram algum tipo de modelagem analítica. Um estudo usou o horizonte temporal por toda a vida e os demais variaram entre 1 e 15 anos. Em síntese, o custo do TAVI foi maior em comparação a SAVR. Contudo, a maioria dos estudos mostrou desfechos de utilidade maiores com o TAVI. O TAVI foi dominante em cinco cenários, em dois foi dominado e nos demais foi custo-efetivo. A qualidade dos estudos demonstrou pontos frágeis, minimizando a transparência do relato desses itens. Assim, os dados de eficácia apresentados mostraram superioridade do TAVI em comparação com a SAVR. Contudo, nenhum estudo mostrou totalidade de qualidade de acordo com o critério utilizado.



Palavras-chave: Estenose aórtica grave; TAVI; SAVR; avaliação econômica.

ABSTRACT - The development of new techniques for effective treatment of severe aortic valve stenosis (AS) is necessary to reduce the morbidity and mortality of the surgical procedure. Transcatheter aortic valve implantation (TAVI) emerged for this purpose. The study aimed to conduct a systematic review of complete economic assessments (EA) that assessed TAVI in the treatment of severe AoS in patients with high and intermediate surgical risk. A search was performed in MEDLINE, EMBASE, CRD and COCHRANE from January to July 2019, about TAVI compared to surgical replacement of the aortic valve (SAVR). Were eligible 16 complete EA studies of cost-effectiveness and utility analysis. Of these, twelve studies corresponded to patients at high surgical risk and four at intermediate risk. Only seven studies used some type of analytical modeling. One study used the time horizon for life and the others ranged between 1 and 15 years. In summary, the cost of TAVI was higher compared with SAVR. However, most studies have shown greater utility outcomes with TAVI. The were dominant TAVI in five scenarios, in two it was dominated and in the others was cost-effective. The quality of the studies showed weak points, minimizing the transparency of the reporting of these items. Thus, the presented efficacy data showed superiority of TAVI compared with the SAVR. However, no study showed total quality according to the criterion used.

Keywords: Severe aortic stenosis; TAVI; SAVR; economic evaluation

1. INTRODUÇÃO

A estenose aórtica (EAo) é o estreitamento ou obstrução da válvula aórtica, sua mobilidade é reduzida e passa a não funcionar adequadamente, restringindo significativamente o fluxo de sangue do ventrículo esquerdo para a aorta. Apresenta prevalência crescente, em grande parte relacionada ao envelhecimento populacional. A EAo constitui uma doença de origem predominantemente degenerativa, afetando até 20% da população na oitava década de vida (ELMARIAH; ARZAMENDI, 2012; JOSEPH et al., 2017; LOPES et al., 2013). Em sua fase inicial não apresenta sintomas, a ocorrência dos sintomas são sinalizadas na fase mais avançada da doença, como síncope, angina e insuficiência cardíaca (BONOW et al., 2006).

O método tradicional para o tratamento da EAo grave é a substituição cirúrgica da valva aórtica (SAVR). Este método é realizado desde de 1960, consiste na abertura do tórax para remoção da valva doente e substituição por uma nova válvula biológica ou mecânica, a troca valvar é realizada em um procedimento cirúrgico cardíaco. Contudo, o risco desse tratamento é alto em alguns pacientes, principalmente quando apresentam comorbidades importantes (F.H. et al., 2001). À vista disso, técnicas menos invasivas para tratamento da EAo se fez necessária (GRANDO; PRATES, 2007).

O implante da valva aórtica transcater (TAVI) é outra opção de tratamento viável. Atualmente é uma alternativa menos invasiva para indivíduos com EAo valvar grave e com algum risco cirúrgico (BARON et al., 2019; LIU et al., 2018; SIMONS et al., 2014). Todavia, mais oneroso sobretudo nos pacientes com outras doenças (AILAWADI et al., 2016; IANNACCONE; MARWICK, 2015). Na cardiologia intervencionista, poucas tecnologias diagnósticas ou terapêuticas introduzidas na prática clínica são inicialmente de baixo custo e não poderia ser diferente com o TAVI (SIQUEIRA et al., 2013). Em virtude desse elevado custo e dos crescentes gastos em saúde a nível global, é discutível se essa tecnologia é custo-efetiva. Para adequar a



alocação de recursos restritos e impermanentes com TAVI no âmbito da saúde, se faz necessário estudos de avaliação econômica (AE) que comparem custos e desfechos entre essas tecnologias.

Atualmente nos estudos de avaliação econômica a nível mundial, TAVI é uma boa escolha para o tratamento da EAo grave. A RCEI mostra-se bem equilibrada pelo grande benefício em termos de qualidade de vida e sobrevivência. No entanto, o custo-efetivo do TAVI pode ser menos favorável por representar alto custo nos sistemas de saúde em países em desenvolvimento (GOODALL et al., 2019; INDRARATNA et al., 2014a).

Por conseguinte, a partir do exposto, é relevante realizar uma revisão sistemática (RS), para fornecer subsídios sobre o valor econômico do TAVI e a qualidade desses estudos, sob uma perspectiva crítica baseada em evidências científicas. Por se tratar de uma problemática de alto impacto econômico na saúde do idoso a nível mundial e de complexa mensuração pelos sistemas de saúde.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Desenho de estudo

A revisão sistemática foi conduzida de acordo com os princípios do *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis* (PRISMA). Foram selecionados estudos publicados sobre avaliações econômicas completas que avaliaram a tecnologia do TAVI para o tratamento da Estenose aórtica grave senil. Para a realização dessa revisão sistemática utilizou-se a seguinte pergunta: *O TAVI é custo-efetivo quando comparado a SAVR, considerando os desfechos de anos de vida ganhos, anos de vida ajustados por qualidade (QALY) e mortalidade?*

Fontes de informação e critérios de elegibilidade

Foi realizada uma busca de estudos de avaliação econômica completa sistematicamente, que mensuraram custos e desfechos da utilização do TAVI nas bases de dados MEDLINE (Pubmed), EMBASE, CRD e COCHRANE, utilizando palavras-chaves relacionadas aos termos “estenose da válvula aórtica”, “implante da válvula aórtica transcater”, “substituição cirúrgica da valva aórtica” e “análise econômica”. A busca foi realizada de janeiro a julho de 2019. Não houve restrição de data, publicação e idioma.

Dois revisores selecionaram de forma independente os estudos. As discordâncias foram resolvidas por consenso ou, caso não houvesse consenso, através de parecer de um terceiro revisor.

Foram incluídos na revisão sistemática, estudos que atendiam aos seguintes critérios:

População: paciente com estenose aórtica grave

Intervenção: implante da valva aórtica transcater por qualquer via de acesso

Comparador: substituição cirúrgica da valva aórtica

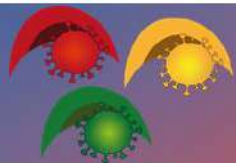
Oucomes (desfechos):

Desfechos de utilidade: mortalidade (anos de vida ganhos, número de vidas salvas) e anos de vida ajustados pela Qualidade (QALY).

Desfechos monetários: Foram elegíveis estudos de avaliação econômica da saúde com análise de custo-efetividade e custo-utilidade, que relatassem o tratamento da estenose aórtica grave. Todas as abordagens de TAVI foram incluídas, independentemente do acesso anatômico ou do tipo de válvula utilizada.

Tipo de estudos: Avaliações econômicas completas (custo-efetividade, custo-utilidade)

Não foram selecionados estudos de avaliações econômicas incompletas, estudos que não apresentassem o custo e o desfechos de utilidade do TAVI comparado com a SAVR, estudos sobre



outras tecnologias ou doenças e estudos nos quais não foi possível avaliar o TAVI em relação com a SAVR.

Extração dos dados

Dois revisores extraíram os dados do estudo de forma independente, um terceiro revisor optou por caso houvesse divergência. Foi elaborada uma ficha com o objetivo de agrupar os dados e facilitar a análise comparativa dos estudos. A ficha foi dividida em quatro seções, de acordo com os tipos de informações disponibilizadas pelos estudos.

Seção A- Informações gerais sobre as análises selecionadas;

Seção B – Informações sobre o tipo de intervenção e comparador e a população incluída na análise; informações sobre perspectiva analisada no estudo e modelo econômico

Seção C – Desfechos por estratégias avaliados nas análises e custos.

Seção D – Discussão, financiamento e conflito de interesse

Avaliação da qualidade dos estudos de avaliação econômica

Foram analisados individualmente em relação à qualidade das evidências apresentadas em conformidade com roteiro criado pelo *Consolidated Health Economic Evaluation Reporting Standards* (CHEERS).

No estudo a aplicação desse instrumento de qualidade foi disposta de maneira independente entre os dois revisores e as divergências foram resolvidas por consenso e, na falta de anuência, um terceiro revisor foi consultado.

O Checklist do instrumento Cheers estabeleceu três graus de classificação de seus itens: “sim” informação reportada, “Parcialmente” informação reportada em parte, “Não” informação não reportada, para cada item.

Análise e interpretação dos dados

O delineamento dos estudos e suas características foram enfatizadas em tabelas de forma a permitir a comparação dos parâmetros e pressupostos selecionados, assim como os itens: tipo de análise, intervenção e comparador, horizonte temporal, características da população, método de modelagem, perspectiva da análise, taxas de descontos, desfechos clínicos e custos. A comparação dos estudos foi agrupada de acordo com os desfechos e comparadores usados. Foram observados parâmetros e pontos que influenciaram de maneira mais relevantes os resultados com os custos no tratamento do TAVI e SAVR.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi realizada revisão sistemática de estudos de avaliação econômica sobre o uso do TAVI no paciente com EAo grave. Nas bases de dados pesquisadas foram encontradas 200 referências. Destas, inicialmente, pelos títulos e resumos, foram selecionadas 26. Após análise dos textos na íntegra, foram eleitos 16 estudos, que corresponderam a avaliação econômica completa (Figura 1).

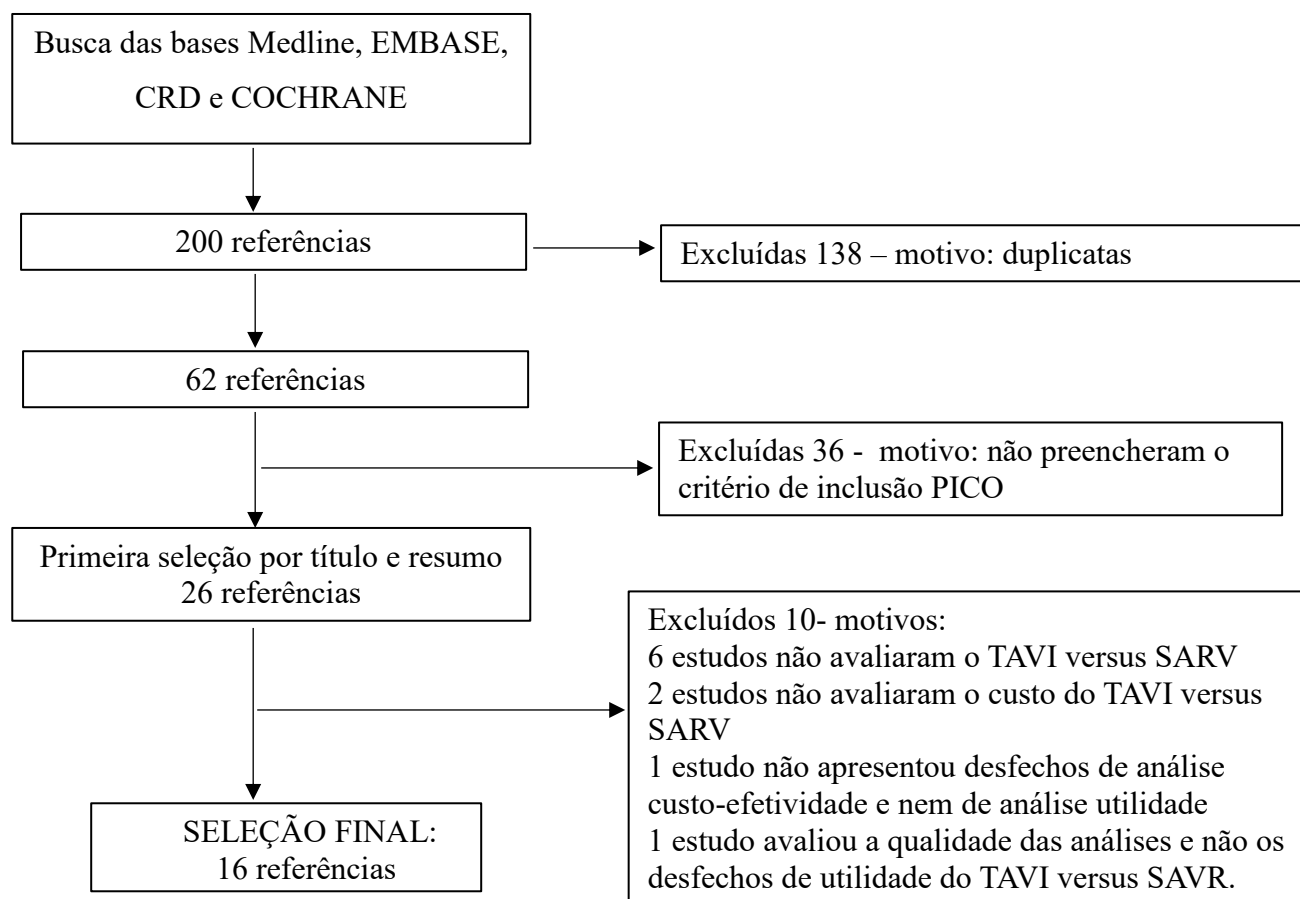


Figura 1- Fluxograma de seleção dos estudos da revisão sistemática

Na análise das avaliações econômicas, treze (81.3 %) corresponderam a análises de custo-efetividade (ACE) e três (19%) utilidade. Alguns autores mencionaram ter feito ACE, mas a apresentação o desfecho foi apresentado em QALY, os demais avaliaram ambos os desfechos. Via de regra, o TAVI mostrou eficiência em comparação a SAVR, com exceção de dois estudos que avaliaram o TAVI por acesso transapical. Considerando os custos utilizados nos estudos, no geral, os estudos que não realizaram desfechos em anos de vida ou QALY, o custo com TAVI foi maior em comparação com a SAVR. Os custos também foram maiores nos estudos que não utilizaram nenhum tipo de modelo analítico. No plano de custo-efetividade, dois estudos foram dominantes, um dominante e dominado, um terceiro apresentou cenário dominado. Nos demais, a maioria apresentou evidências de custo-efetividade quanto a razão custo-efetividade incremental (RCEI).

De forma geral, quantificação de graus de classificação “informação reportada”, respondidos nos 24 itens dos dezesseis estudos de AE avaliados, mostrados na Figura 2, variaram



de 37,5% a 96%. O estudo de (BARON et al., 2019) foi o que apresentou maior percentual de “informação reportada” e, portanto, a maior qualidade, segundo o *Checklist*. Por outro lado, o estudo que apresentou o menor somatório de “Sim” foi o de (BROWN et al., 2016). Na avaliação da qualidade dos estudos foi constatado o comprometimento dos diversos critérios especificados pela ferramenta Cheers. Contudo, foi observado implicações em categorias relevantes, tais como a de métodos gerais. A perspectiva do estudo foi descrita em menos da metade dos estudos. No horizonte temporal foi encontrado variações de 1 ano a 15 anos e um apenas, por todo tempo de vida. Além disso, foi observado implicação das evidências na categoria de métodos e custos. Esses foram parcialmente descritos nos estudos. No critério de avaliação baseada em modelos analíticos, apenas sete

(44%) dentre os dezesseis estudos adotaram algum tipo de modelo analítico. Todavia, todos os estudos analisaram o custo do TAVI e algum desfechos.

	Baron 2019	Gooldall 2019	Tam 2018	Burg 2018	Alqahtani 2017	Sponga 2017	Ando 2017	Hawkins 2017	Doshi 2017	Reynolds 2016	Brown 2016	Ontario 2016	Santarpino 2015	Minnuleto 2015	Ribera 2015	Reynolds 2012
Título e resumo																
1 - Título																
2 - Resumo																
Introdução																
3 - Antecedentes e objetivos																
Métodos - Geral																
4 - População-alvo e subgrupos																
5 - Configuração e localização																
6 - Perspectiva do estudo																
7 - Comparadores																
8 - Horizonte temporal																
9 - Taxa de desconto																
Métodos - Resultados																
10 - Escolha dos resultados																
Medição da eficácia																
11 - Medidas de efetividade																
12 - Medição, avaliação de resultados baseados em preferências																
Métodos - custos																
13 - Estimativa de recursos e custos																
14 - Moeda, data do preço e conversão																
Métodos - Avaliações Econômicas Baseadas em Modelos																
15 - Escolha do modelo (escolha)																
16 - Premissas do modelo (suposição)																
Métodos - Métodos Analíticos																
17 - Métodos Analíticos																
Resultados																
18 - Parametros do estudo																
19 - Desfechos e custos incrementais																
20a - Caracterizando a incerteza baseada em modelo																
21 - Caracterizando a heterogeneidade																
Discussão																
22 - Conclusões, limitações e generalização do conhecimento																
Outros																
23 - Fonte de financiamento e apoio																
24 - Conflitos de interesse																
Categoria das respostas																

Figura 2- Checklist da qualidade das avaliações econômicas



4. DISCUSSÃO

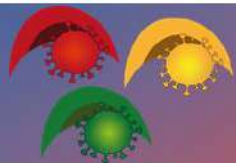
Em tese, o TAVI foi custo-efetivo em relação ao seu comparador. Entretanto, vários estudos apresentaram metodologias diversificadas e alguns resultados foram divergentes entre si, dificultando a comparação entre os critérios analisados. No que se refere à eficácia do TAVI, os estudos ressaltaram a mortalidade intra-hospitalar e a incidência de AVC como desfechos primários. Desfechos esses também encontrados no estudo de (ABDEL-WAHAB et al., 2014; DI MARIO et al., 2013; HUBER, 2012).

Na análise do tipo de AE, várias foram identificadas como ACE como, a exemplo (REYNOLDS et al., 2016) no entanto, os resultados foram apresentados em desfechos por anos de vida ajustados por qualidade (QALY). Na literatura é visto que, economistas norte-americanos não fazem distinção entre os termos de custo-efetividade e custo-utilidade. Essa distinção é vista no pensamento europeu, principalmente nos estudos espanhóis e ingleses (DRUMMOND, M. F.; SCULPHER, M.J; TORRANCE, 2006). Na análise dos modelos analíticos, apenas sete estudos utilizaram algum tipo de modelagem. Cabe ressaltar, que o modelo de Markov é recomendado para a avaliação de doenças crônicas, no longo prazo e que a EAo grave é uma doença crônica. Contudo, o estudo de (KOURKOVELI, PANAGIOLA; SPARGIAS KONSTATINOS; HAHALIS, 2018), analisou o custo-benefício do TAVI em seu estudo e também não usou nenhum tipo de modelo analítico. Os estudos analisados utilizaram horizontes temporais que variaram de 1 a 15 anos, apenas um utilizou o horizonte temporal por toda a vida. Sendo a EAo uma doença crônica, seria pertinente o uso de horizontes temporais que durassem por toda a vida. O horizonte temporal de uma AE deve levar em consideração a história natural da doença para qual a tecnologia avaliada se aplica, portanto para doenças crônicas ou com desfechos longos, prioritariamente se deve adotar a expectativa de vida dos pacientes como horizonte temporal (ANTONINI RIBEIRO et al., 2016; DRUMMOND, M. F.; SCULPHER, M.J; TORRANCE, 2006).

Nos estudos que não usaram desfechos QALY ou anos de vida ganhos, o TAVI mostrou-se mais oneroso. Resultado alinhado ao encontrado no estudo de (SVENSSON et al., 2016). Relativo a ACE dos estudos, em maior número TAVI mostrou RCEI aceitável, apresentou maior custo, mas com maior efetividade. Contudo, no estudo de (REYNOLDS et al., 2016), o TAVI apresentou um cenário dominante, com menor custo e maior QALY. Resultado semelhante ao encontrado no estudo de (FAIRBAIRN et al., 2013), apesar da moeda estar em lira turca, os custos com o TAVI foi menor e o QALY maior na comparação com a SAVR (£ 52.593 versus £ 53.943) e QALY (2.81 versus 2.75), tornando o TAVI também rentável em comparação com a SAVR.

5. CONCLUSÃO

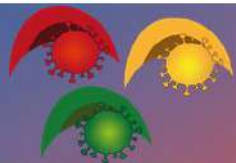
Os dados de eficácia apresentados mostraram superioridade do TAVI em comparação a SAVR. As AEs selecionadas avaliaram TAVI em diferentes contextos, como a natureza do financiamento e a estruturação dos sistemas de saúde. Desta forma, não possibilitou a comparação dos custos entre eles e impediu o estabelecimento de uma relação de causalidade. A maioria dos estudos apresentam limitações metodológicas de acordo com a ferramenta Cheers. As análises que apresentaram maior qualidade e utilizaram modelo analítico demonstraram que o implante de válvula aórtica transcaterter transfemoral é uma opção custo-efetiva em pacientes com EAo grave com risco cirúrgico intermediário ou alto, além de ser útil para pacientes que não podem ser submetidos à substituição cirúrgica da valva aórtica por qualquer outra causa. Contudo, em países com menor custo em saúde, essa tecnologia pode apresentar inviabilidade de uso devido ao elevado valor da prótese. Em virtude de os estudos não incluírem a população brasileira, recomenda-se



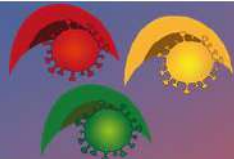
estudo multicêntrico a nível nacional para avaliar o custo-efetividade da população com EAO grave de alto, intermediário e baixo risco cirúrgico.

6. REFERÊNCIAS

- ABDEL-WAHAB, M. et al. Comparison of balloon-expandable vs self-expandable valves in patients undergoing transcatheter aortic valve replacement: The CHOICE randomized clinical trial. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, v. 311, n. 15, p. 1503–1514, 2014.
- AILAWADI, G. et al. Contemporary Costs Associated With Transcatheter Aortic Valve Replacement: A Propensity-Matched Cost Analysis. *The Annals of thoracic surgery*, v. 101, n. 1, p. 154–160, 2016.
- ALQAHTANI, F. et al. Outcomes of Transcatheter and Surgical Aortic Valve Replacement in Patients on Maintenance Dialysis. *The American journal of medicine*, v. 130, n. 12, p. 1464.e1-1464.e11, 2017.
- ANDO, T. et al. Comparison of In-Hospital Outcomes of Transcatheter Aortic Valve Implantation Versus Surgical Aortic Valve Replacement in Obese (Body Mass Index \geq 30Kg/M²) Patients. *The American journal of cardiology*, v. 120, n. 10, p. 1858–1862, 2017.
- ANTONINI RIBEIRO, R. et al. Diretriz metodológica para estudos de avaliação econômica de tecnologias em saúde no Brasil. *Jornal Brasileiro de Economia da Saúde*, v. 8, n. 3, p. 174–184, 2016.
- BARON, S. J. et al. Cost-Effectiveness of Transcatheter Versus Surgical Aortic Valve Replacement in Patients with Severe Aortic Stenosis at Intermediate Risk: Results from the PARTNER 2 Trial. *Circulation*, v. 139, n. 7, p. 877–888, 2019.
- BONOW, R. O. et al. ACC/AHA 2006 guidelines for the management of patients with valvular heart disease: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 1998 Guidelines for the Manage. [s.l: s.n.]. v. 114
- BROWN, J. W. et al. Transcatheter Aortic Valve Replacement Versus Aortic Valve Bypass: A Comparison of Outcomes and Economics. *The Annals of thoracic surgery*, v. 101, n. 1, p. 45–49, 2016.
- BURG, J. M. et al. Early post-approval experience with transcatheter aortic valve replacement in the USA. *The Journal of cardiovascular surgery*, v. 59, n. 4, p. 619–625, 2018.
- DI MARIO, C. et al. The 2011-12 pilot European Sentinel Registry of Transcatheter Aortic Valve Implantation: In-hospital results in 4,571 patients. *EuroIntervention*, v. 8, n. 12, p. 1362–1371, 2013.
- DOBLE, B. et al. Cost-effectiveness of the Edwards SAPIEN transcatheter heart valve compared with standard management and surgical aortic valve replacement in patients with severe symptomatic aortic stenosis: A Canadian perspective. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, v. 146, n. 1, p. 52- 60.e3, 2013.
- DOSHI, R. et al. Transcatheter or surgical aortic valve replacement in patients with advanced



- kidney disease: A propensity score-matched analysis. **Clinical cardiology**, v. 40, n. 11, p. 1156–1162, 2017.
- DRUMMOND, M. F.; SCULPHER, M.J; TORRANCE, G. . c. 3a. ed. USA: [s.n.], 2006
- FAIRBAIRN, T. A. et al. The cost-effectiveness of transcatheter aortic valve implantation versus surgical aortic valve replacement in patients with severe aortic stenosis at high operative risk. **Heart**, v. 99, n. 13, p. 914–920, 2013.
- GOODALL, G. et al. Cost-effectiveness analysis of the SAPIEN 3 TAVI valve compared with surgery in intermediate-risk patients. **Journal of Medical Economics**, v. 22, n. 4, p. 289–296, 2019.
- GRANDO, T.; PRATES, P. Percutaneous aortic valve replacement: Initial experience in the South of Brazil. n. December, 2007.
- HUBER, T. S. Transcatheter versus Surgical Aortic-Valve Replacement in High-Risk Patients. **Yearbook of Surgery**, v. 2012, p. 395–397, 2012.
- IANNACCONE, A.; MARWICK, T. H. Cost Effectiveness of Transcatheter Aortic Valve Replacement Compared with Medical Management or Surgery for Patients with Aortic Stenosis. **Applied Health Economics and Health Policy**, v. 13, n. 1, p. 29–45, 2015.
- INDRARATNA, P. et al. Systematic review of the cost-effectiveness of transcatheter aortic valve implantation. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 148, n. 2, p. 509–514, 2014a.
- KOURKOVELI, PANAGIOLA; SPARGIAS KONSTATINOS; HAHALIS, G. TAVR in 2017—What we know? What to expect? **Journal of Geriatric Cardiology**, v. 15, n. 1, p. 55–60, 2018.
- LOPES, M. A. C. Q. et al. Implante por cateter de bioprótese valvular aórtica para tratamento de estenose valvar aórtica grave em pacientes inoperáveis sob Perspectiva da Saúde Suplementar - Análise de custo-efetividade. **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**, v. 21, n. 3, p. 213–221, 2013.
- MINUTELLO, R. M. et al. Costs and in-hospital outcomes of transcatheter aortic valve implantation versus surgical aortic valve replacement in commercial cases using a propensity score matched model. **The American journal of cardiology**, v. 115, n. 10, p. 1443–1447, 2015.
- ONTARIO, H. Q. Transcatheter Aortic Valve Implantation for Treatment of Aortic Valve Stenosis: A Health Technology Assessment. **Ontario health technology assessment series**, v. 16, n. 19, p. 1–94, 2016.
- REYNOLDS, M. R. et al. Cost-effectiveness of transcatheter aortic valve replacement compared with standard care among inoperable patients with severe aortic stenosis: Results from the placement of aortic transcatheter valves (PARTNER) trial (cohort B). **Circulation**, v. 125, n. 9, p. 1102–1109, 2012a.
- REYNOLDS, M. R. et al. Cost-Effectiveness of Transcatheter Aortic Valve Replacement With a Self-Expanding Prosthesis Versus Surgical Aortic Valve Replacement. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 67, n. 1, p. 29–38, 2016.
- RIBEIRO, F. F. F. et al. Seguimento pós-operatório em longo prazo de pacientes submetidos à



- cirurgia valvar TT - Long term follow up of patients undergoing valvular cardiac surgery. **Rev. bras. cardiol.** (Impr.), v. 26, n. 2, p. 112–119, 2013.
- RIBERA, A. et al. Transfemoral transcatheter aortic valve replacement compared with surgical replacement in patients with severe aortic stenosis and comparable risk: cost-utility and its determinants. **International journal of cardiology**, v. 182, p. 321–328, 2015.
- SANTARPINO, G. et al. Clinical Outcome and Cost Analysis of Sutureless Versus Transcatheter Aortic Valve Implantation With Propensity Score Matching Analysis. **The American journal of cardiology**, v. 116, n. 11, p. 1737–1743, 2015.
- SPONGA, S. et al. Transcatheter aortic valve implantation versus surgical aortic valve replacement in patients over 85years old. **Interactive cardiovascular and thoracic surgery**, v. 25, n. 4, p. 526–532, 2017a.
- SVENSSON, L. G. et al. Leon MB, Smith CR, Mack M, et al. Transcatheter Aortic-Valve Implantation for Aortic Stenosis in Patients Who Cannot Undergo Surgery. **N Engl J Med**, v. 363, n. 17, p. 1511–1520, 2016.
- TAM, D. Y. et al. A cost-utility analysis of transcatheter versus surgical aortic valve replacement for the treatment of aortic stenosis in the population with intermediate surgical risk. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 155, n. 5, p. 1978- 1988.e1, 2018.
- TECHNOLOGY, O. H.; SERIES, A. Transcatheter Aortic Valve Implantation for Treatment of Aortic Valve Stenosis: A Health Technology Assessment. **Ontario health technology assessment series**, v. 16, n. 19, p. 1–94, 2016.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Gestão, Economia e Saúde

EXPOSIÇÃO À LUZ DO SOL COMO FATOR PROTETOR PARA COVID-19: APLICAÇÕES DO MODELO DE PAINEL ESPACIAL DINÂMICO

J. M. A. dos SANTOS¹, T. A. de MENEZES², R. G. de ARRUDA³, F. E. C. V. FERNANDES⁴

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Economia (PIMES);

² Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Economia;

³ Universidade Salgado de Oliveira (Universo), Departamento de Engenharia de Produção.

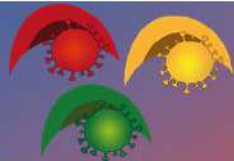
⁴ Universidade de Pernambuco Campus Petrolina, Colegiado de Enfermagem.

E-mail para contato: joebsonmaurilio@gmail.com

RESUMO – *O presente trabalho teve objetivo como mensurar o impacto da luz solar como fator protetor para disseminação e morte pela COVID-19 nos estados brasileiros, uma vez que a exposição ao sol é uma das fontes mais utilizadas para absorção de vitamina D e o aumento dos seus níveis no organismo humano pode combater diversas patologias. Para isso, controlou-se os efeitos das características climáticas dos estados, das medidas de distanciamento social impostas compulsoriamente pelos governos estaduais através de decretos e da adesão da população ao isolamento social medido pelo índice de isolamento social. Além disso, controlou-se os efeitos que as taxas referentes à COVID-19 sofrem no tempo e no espaço, fazendo uso de modelos espaciais dinâmicos para dados em painel para controlar a presença de spillover espacial tanto da variável dependente, através do modelo SAR, como também das variáveis independentes, através do modelo SDM. Os resultados mostraram que as taxas de prevalência e morte pela COVID-19 no período corrente sofrem efeitos positivos e significantes tanto das taxas ocorridas no período anterior como daquelas ocorridas nos estados vizinhos no período corrente e na véspera ao fazer uso das variáveis defasadas no tempo e no espaço. As variáveis climáticas também se mostraram preditoras das taxas de COVID-19, indicando que estados com maior número de horas efetivas de luz do sol, maior temperatura e maior humidade relativa, têm uma diminuição nas suas taxas de prevalência e morte pela COVID-19.*

Palavras chave: *Spillover* espacial dinâmico. Luz solar. Vitamina-D. Coronavírus.

ABSTRACT - *The present work aimed to measure the impact of sunlight as a protective factor against dissemination and death by COVID-19 in Brazilian states, since exposure to the sun is one of the most used sources for the absorption of vitamin D and the increase in its effects. levels in the human body can fight several pathologies. For this, the effects of the climatic characteristics of the states, of the measures of social distance imposed by the state governments through decrees*



and of the population's adherence to social isolation measured by the social isolation index were controlled. In addition, the effects that the rates for COVID-19 suffer over time and space were controlled, using dynamic spatial models for panel data to control the presence of spatial spillover of both the dependent variable, using the SAR model, as well as independent variables, through the SDM model. The results showed that the prevalence and death rates for COVID-19 in the current period suffer positive and significant effects both from the rates that occurred in the previous period and those that occurred in neighboring states in the current period and the day before when using the time-lagged variables and in space. The climatic variables also proved to be predictors of the COVID-19 rates, indicating that states with a greater number of effective hours of sunlight, higher temperature and higher relative humidity, have a decrease in their prevalence and death rates by COVID-19.

Keywords: Dynamic spatial spillover. Sun light. D-Vitamin. Coronavirus

1. INTRODUÇÃO

No começo do ano de 2020, a Organização Mundial de Saúde declarou (Who, 2020) declarou a infecção pelo novo Coronavírus uma emergência de saúde pública de interesse internacional. A pandemia de Covid-19 vem representando desafios para o setor saúde, pesquisas e comunidades médicas (Fauci et al, 2020).

As condições climáticas das localidades têm sido alvo de pesquisas em busca dos fatores determinantes da COVID-19. Clima quente e maior humidade relativa do ar têm relação inversa com as taxas infecção da COVID-19, mostrando que regiões com essas características climáticas sofrem menos incidência da doença. Wang et al. (2020) investigaram a relação entre a COVID-19 e as condições climáticas de 100 cidades chinesas onde registrou-se mais de 40 casos confirmados da doença. O resultado mostrou que lugares com temperaturas mais elevadas e maior humidade relativa do ar têm menos disseminação da COVID-19. Nesta mesma linha Paez et. al., 2020 aplicando um SUR espacial, para dados da Espanha encontra que altas temperaturas reduz tanto o número de casos como o número de mortes pela doença.

A literatura aponta que o aumento nos níveis de Vitamina D podem melhorar os desfechos clínicos ou até mitigar os piores desfechos em pacientes com a COVID-19 (Alipio, 2020). Encontrar a correlações entre a Vitamina D sobre os desfechos da COVID-19 consiste em uma grande contribuição, pois incentivará o desenvolvimento de pesquisas clínicas visando profilaxia para pandemia. Utilizando o nível de exposição diária a luz solar (insolação) como proxy para nível de vitamina D da População, o presente trabalho, emprega um painel espacial dinâmico e utiliza dados para o Brasil. Nesse contexto, busca mensurar o impacto da luz solar como fator protetor para disseminação e morte pela COVID-19 nos estados brasileiros.

Esta pesquisa está dividida em mais 3 seções além desta introdução. Na seção 2, têm-se a estratégia empírica e a apresentação dos dados utilizados no presente trabalho. Na seção 3, analisam-se os resultados e faz-se uma discussão dos principais achados. Por fim, na seção 4, tem-se a conclusão.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ESTRATÉGIA EMPÍRICA

2.1.1 Dados



Na presente pesquisa, utilizou-se um banco de dados único com informações do Ministério da saúde sobre os casos confirmados, e os que resultaram em morte pela COVID-19 do dia 10 março a 10 de abril de 2020 nas unidades federativas do Brasil que são compostas de 26 estados e um Distrito Federal. Consta ainda no referido banco, informações do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) sobre as características meteorológicas dos estados brasileiros e o Índice de Isolamento Social desenvolvido pela Inloco¹.

Variáveis do estudo: Txcases - Taxa de prevalência da COVID-19 por 100 mil habitantes no estado i no dia t ; Txdeaths - Taxa de mortalidade pela COVID-19 por 100 mil habitantes no estado i no dia t ; Sunhours - Número de horas de brilho do sol sem interferência de nuvens que as pessoas podem efetivamente se expor no estado i no dia t ; Temmin - Temperatura mínima no estado i no dia t ; Temmax - Temperatura máxima no estado i no dia t ; dTxemp - Taxa de crescimento da temperatura no estado i no dia t ; Humid - Umidade relativa do ar (em percentual) no estado i no dia t ; Precip - Precipitação pluviométrica (em milímetros) no estado i no dia t ; Lockdown - Dummy que assume valor igual a 1 se o estado i decretou alguma medida de isolamento social no dia t ; Sii - Percentual da população que está seguindo as recomendações de isolamento social no estado i no dia t (i o número total de estados já conta com o Distrito Federal).

2.1.2 Modelos Dinâmicos para Dados em Painel e a sua Versão para Dados Espaciais.

As estimações da associação entre as taxas da COVID-19 e as horas efetivas de luz solar, sem interferência de nuvens, nos estados brasileiros foram realizadas para um período de 32 dias através da estimação para dados em painel e sua versão para dados espaciais. O modelo para dados em painel é dado em (1).

$$y_{it} = \phi y_{it-1} + x'_{it} \beta + a_i + \mu_{it} \quad (1)$$

onde y_{it} é a taxa de prevalência (e de morte) da COVID-19, no estado i no dia t ; ϕy_{it-1} é a taxa de prevalência (e de morte) da COVID-19, no estado i no dia $t-1$; x'_{it} é o vetor de covariáveis utilizadas como controles; a_i é o conjunto de variáveis não observadas invariante no tempo e μ_{it} é o termo de erro aleatório.

Para mensurar o efeito *spillover* das taxas de COVID-19, usou-se o *Spatial Autorregressive Model* (SAR) em (2) que, além de mensurar o efeito transbordamento das taxas da COVID-19 para além das fronteiras dos estados, resolve o problema de viés de variável omitida espacial que torna a estimação da eq. (1) enviesada e inconsistente. Esse modelo possibilita incorporar diversas características do comportamento das variáveis através do espaço na modelagem econométrica (Elhorst, 2010, 2011).

$$y_{it} = \phi y_{it-1} + \psi W y_{t-1} + \rho W y_t + x'_{it} \beta + a_i + \mu_{it} \quad (2)$$

onde $W y_t$ é taxa de prevalência (e de morte) da COVID-19 dos estados vizinhos ao estado i no dia t ; $W y_{t-1}$ é taxa de prevalência (e de morte) da COVID-19 dos estados vizinhos ao estado i no dia $t-1$ e W é a matriz de ponderação espacial que captura a interação entre regiões com fronteiras em comum (Lesage; Pace, 2009).

¹ Empresa fundada em 2014 e sediada em Recife, com equipes em São Paulo, Nova York e na área da Baía de São Francisco. A Inloco conta hoje com dispositivos de 60M+ alavancando sua tecnologia de localização. <https://mapabrasileirodacovid.inloco.com.br/pt/>



Além do efeito *spillover* da taxa de COVID-19, as covariáveis também podem apresentar tal efeito. Nesse caso, o modelo de regressão utilizado será o *Spatial Durbin Model* (SDM) em (3) (Guliyev, 2020).

$$y_{it} = \varphi y_{it-1} + \psi W y_{t-1} + \rho W y_t + x_{it}'\beta + W X_t \delta + a_i + \mu_{it}. \quad (3)$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1, são apresentados os modelos econométricos para as taxas de mortalidade da COVID-19 nos estados do Brasil. Os resultados obtidos no modelo SDM dinâmico mostram que os óbitos em decorrência da COVID-19 são influenciados pela quantidade de óbitos ocorridos no dia anterior ($Txcases_{t-1}$) e pelas mortes por COVID-19 ocorridas nos estados vizinhos tanto no momento corrente ($Wtxcases_t$) quanto na véspera ($Wtxcases_{t-1}$), pois o valor de seus coeficientes foram positivos e fortemente significativos ($p\text{-value} < 1\%$), indicando que estados que apresentaram aumentos nas taxas de mortalidade no dia anterior e que são vizinhos de outros estados com aumentos das mesmas taxas no período corrente e na véspera, terão maiores taxas de mortalidades ocasionadas pelo novo coronavírus.

Os resultados mostram também a importância das variáveis climáticas na determinação dos óbitos pela COVID-19. Aumentos na quantidade efetiva de luz do sol a qual as pessoas se expõem (*Sunhours*), na temperatura máxima (*Tempmax*), na humidade relativa do ar (*Humid*) no índice de isolamento social (*Sii*) e a adesão a medidas de isolamento social (*Lockdown*) fazem os números de óbitos diminuir nos estados brasileiros. O contrário ocorre para aumentos nas variáveis de *Precip*, *tempmin* e *dTtemp*, indicando que estados com maiores precipitações pluviométricas, mais frios e com maiores diferenças entre as temperaturas mínima e máxima, experimentam maiores quantidades de óbitos pela COVID-19 (Tabela 1).

O resultados obtidos para as taxas de prevalência também foram semelhantes aos de mortalidade. A influência dos decretos de isolamento social compulsório sobre as taxas de prevalência da COVID-19 indica que estados que aderiram a estratégias de isolamento social compulsório, através de decretos governamentais de restrição das atividades e da mobilidade, sofrem menor contágio do novo coronavírus. Já estados onde a população tem maior engajamento às normas de isolamento social, refletido nos aumentos do índice de isolamento social (*Sii*) dos estados, diminui as taxas de prevalência da COVID-19.

Na prevalência, as defasagens espaciais das covariáveis utilizadas no modelo de regressão conservam os mesmos sinais e significância das covariáveis, indicando que estados que são contiguamente próximos a estados com maior incidência luz solar e maior temperatura máxima, maior índice de isolamento social e aderiu ao distanciamento social compulsório têm menores taxas de prevalência da COVID-19.



Tabela 1. Estimação dos modelos dinâmicos para dados em painel e suas versões espaciais para as taxas diárias de mortes pela COVID-19 nos estados brasileiros de dez de março a dez de abril de 2020

Variáveis Independentes	Variável dependente: Txdeaths		
	OLS Modelo 1	SAR Modelo 2	SDM Modelo 3
Txcases _{t-1}		1.18*** (0.03)	1.89*** (0.03)
Wtxcasest ₋₁		2.17*** (0.05)	1.36*** (0.05)
Wtxcases		-1.39*** (0.04)	0.51*** (0.03)
Sunhours	0.00(0.00)	-0.03*** (0.00)	-0.03*** (0.00)
Precip	-0.00(0.00)	0.00*** (0.00)	0.00*** (0.00)
Humid	-0.00(0.00)	-0.00*** (0.00)	-0.00*** (0.00)
dTxtemp	7.51(4.33)	441.28*** (1.02)	289.44*** (0.99)
Tempmin	0.03(0.02)	1.71*** (0.00)	1.14*** (0.00)
Tempmax	-0.03*(0.01)	-1.14*** (0.00)	-0.75*** (0.00)
Lockdown	0.07*** (0.01)	-0.05*** (0.00)	-0.14*** (0.00)
Sii	0.00(0.00)	-0.02*** (0.00)	-0.04*** (0.00)
_cons	0.00(0.15)		
Defasagens Espaciais (Wx)			
Sunhours			-0.09*** (0.00)
Precip			0.01*** (0.00)
Humid			0.00*** (0.00)
dTxtemp			1203.72*** (1.83)
Tempmin			4.61*** (0.01)
Tempmax			-3.04*** (0.00)
Lockdown			-0.18*** (0.01)
Sii			-0.02*** (0.00)
Obs.	864	837	837
Moran _a	0.30***	-	-
Akaike	-	-4075.6	-4082.95
Schwarz	-	-4018.84	-3988.36

Nota: [i] o número total de estados já conta com o Distrito Federal; [a] Índice de Moran que mede a autocorrelação espacial global presente nos dados. [ii] erro padrão entre parênteses; [#] os modelos SAR e SDM dinâmicos utilizam o primeiro dia da amostra como valor de referência, resultando em menos observações que no modelo OLS. [iii] *, **, *** indica significativos estatisticamente aos níveis 5%, 1% e 0,1%, respectivamente.

Os efeitos dinâmicos das taxa de prevalência e letalidade da COVID-19 se mostraram importantes preditores de tais taxas no período corrente, indicando que o crescimento dos casos da COVID-19 são retroalimentados pelos casos do período anterior ocorridos tanto nos estados que servem de unidade de observação quanto nos estados vizinhos. Gatto et al. (2020) mostrou que as taxas de disseminação da COVID-19 crescem de forma exponencial com o passar dos dias, o que enseja medidas de isolamento social para frear o avanço do contágio.

As interações entre os estados brasileiros ocorridas pela proximidade geográfica destes resultam em um efeito *spillover* de das contaminações e mortes pela COVID-19, indicando que estados que estão cercados por vizinhos com altas taxas relacionadas à COVID-19 sofrem um



aumento nas suas taxas. Este resultado também está em conformidade com outros como em Guliyev (2020) e Snyder; Parks (2020).

As condições climáticas dos estados também revelou-se determinantes das taxas de disseminação e de óbitos em decorrência da COVID-19, com destaque para a quantidade de horas efetivas que o sol brilha, isto é, sem interferência de nuvens (Wang et al., 2020). As horas efetivas de brilho do sol permitem que as pessoas, ao se expor ao sol, melhorem os níveis de vitamina D no organismo (Lips, et al 2014). Esta é uma forma eficaz de melhorar o sistema imunológico e combater diversos tipos de patologias (Cantorna, 2010; Brot et al., 2001).

Diversas pesquisas têm associado maiores níveis de vitamina D no organismo ao combate à infecções do trato respiratório dentre as quais destacam-se o vírus influenza e o novo coronavírus (Grant et al, 2020). A ação desse nutriente no organismo faz, dentre outras coisas, diminuir a replicação dos vírus no corpo humano e, com isso, diminui os danos causados a órgãos como os pulmões. A influência da incidência de luz do sol sobre os casos da COVID-19 nos estados brasileiros obteve resultados que corroboram com os achados mais recentes da literatura, uma vez que esta variável é a fonte mais utilizada pela pessoas, voluntária ou involuntariamente, para absorção de vitamina D e, desta forma, conseguiu-se verificar a existência de correlação negativa entre as horas de luz solar e as taxas de prevalência e óbito pela COVID-19. As demais variáveis climáticas tiveram os resultados esperados. Nas estimações realizadas constatou-se que estados com maiores níveis de temperatura máxima e maior humidade têm menos casos de confirmação e letalidade da COVID-19 como em Wang et al. (2020).

Os atuais números referentes à COVID-19 são atribuídos, em muitos casos, às decisões dos líderes políticos das localidades (Allcott et al., 2020; Gadarian et al., 2020). Desta forma, procurou-se controlar o efeito das decisões políticas nos modelos de regressão propostos nesse trabalho. Os resultados obtidos mostraram que estados onde adotou-se o políticas de isolamento social enfrentam menores taxas de contágio e também de mortes pela COVID-19. Esta política de isolamento social tem sido recomendada como uma forma eficaz de evitar uma disseminação descontrolada do novo coronavírus e o colapso do sistema de saúde (Gatto et al., 2020; Toda, 2020). Estes resultados estão em consonância com os achados de Ajzenman, et al (2020) e Mariani, et al (2020).

4. CONCLUSÃO

As variáveis explicativas climáticas apresentaram os resultados esperados com destaque para as horas efetivas de luz do sol. Verificou-se também que estados com maiores níveis de temperatura e de humidade relativa do ar apresentam menores índices de contágio e morte pela COVID-19. Estados onde os governadores adotaram, por força de decreto, medidas de isolamento social, como o *Lockdown* e outras formas mais brandas, tiveram redução nas taxas de prevalência e mortalidade. Resultado semelhante foi verificado em estados onde a população se mostrou mais disposta a seguir as medidas de distanciamento social, mensuradas pelo índice de isolamento social, indicando que quanto maior o nível de isolamento social, menores os casos de contaminação e morte.

As defasagens espaciais das covariáveis utilizadas no modelo dinâmico de regressão também se mostraram significantes para explicar as taxas nos estados, mostrando que os fatores climáticos e as medidas de isolamento social geram efeitos na prevalência e na mortalidade não só nos estados onde ocorrem, mas também nos estados próximos. Este resultado sugere que políticas inter-regionais de combate à COVID-19 sejam adotadas como forma de salvar vidas e reduzir os impactos da pandemia sobre a economia e sobre a saúde da população.



5. REFERÊNCIAS

AJZENMAN, N.; CAVALCANTI, T.; DA MATA, D. *More Than Words: Leaders' Speech and Risky Behavior during a Pandemic* (April 22, 2020). Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=3582908> or <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3582908>.

ALIPIO, M. *Vitamin D Supplementation Could Possibly Improve Clinical Outcomes of Patients Infected with Coronavirus-2019*. (Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=3571484> or <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3571484>).

ALLCOTT, H.; BOXELL, A.; CONWAY, J.; GENTZKOW, M.; THALER, M.; YANG, D. Polarization and public health: partisan differences in social distancing during the coronavirus pandemic. *NATIONAL BUREAU OF ECONOMIC RESEARCH Working Paper*. 2020. <http://www.nber.org/papers/w26946>

BROT, C.; VESTERGAARD, P; KOLTHOFF, N.; GRAM, J.; HERMANN, A.; SØRENSEN, O. Vitamin D status and its adequacy in healthy Danish perimenopausal women: relationships to dietary intake, sun exposure and serum parathyroid hormone. *British Journal of Nutrition*. v. 86, Issue S1, August 2001, p. S97-S103.

CANTORNA, M. T. (2010). Mechanisms underlying the effect of vitamin D on the immune system. *Proceedings of the Nutrition Society*, v.69, n.3, 286-289.

ELHORST, J. P., *Spatial Panel Data Models*, v.. C.2, Springer, chapter 2, p. 377–407, 2010.

ELHORST, J. P., 'Dynamic spatial panels: models, methods, and inferences', *Journal of Geographical Systems*, v. 14, n. 5–28, 2011.

FAUCI, A. S.; LANE, H. C.; REDFIELD, R. R. Covid-19 - Navigating the Uncharted. *The New England journal of medicine*, v. 382, n. 13, p. 1268–1269, 2020.

GADARIAN, K. GOODMAN S, PEPINSKY, S. W.; THOMAS, B., *Partisanship, Health Behavior, and Policy Attitudes in the Early Stages of the COVID-19 Pandemic* (March 27, 2020). Disponível em: SSRN: <<http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3562796> >.

GATTO, M.; BERTUZZOB, E.; MARIA, L.; MICCOLID, S.; CARRARO, L.; CASAGRANZIA, R.; RINALDO, A. Spread and dynamics of the COVID-19 epidemic in Italy: Effects of emergency containment measures. *PNAS* May 12, 2020 117 (19) 10484-10491; first published April 23, 2020 <https://doi.org/10.1073/pnas.2004978117>.

GRANT, W.; LAHORE, H.; MCDONNELL, S.; BAGGERLY, C.; FRENCH, C.; ALIANO, J.; BHATTOA, H. Evidence that Vitamin D Supplementation Could Reduce Risk of Influenza and COVID-19 Infections and Deaths. *Nutrients Review*. 2020.

GULIYEV, H. Determining the spatial effects of COVID-19 using the spatial panel data model. *Spatial statistics*. <https://doi.org/10.1016/j.spasta.2020.100443> 2211-6753/© 2020.



LESAGE, J. P.; PACE, R. K. *Introduction to Spatial Econometrics*. Chapman and Hall/CRC Press, 2009.

LIPS, P.; SCHOOR, N.; JONGH, R. Diet, sun, and lifestyle as determinants of vitamin D status. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1317, 2014, 92–98 C_ 2014 New York Academy of Sciences. <https://doi.org/10.1111/nyas.12443>.

MARIANI, L.; GAGETE-MIRANDA, J.; RETTL, P. Words can hurt: How political communication can change the pace of an epidemic. *Covid Economics* Issue 12, 1 May, 2020.

PAEZ, A., LOPEZ, F. A., MENEZES, T., CAVALCANTI, R., & PITTA, M. G. D. R. A Spatio - Temporal Analysis of the Environmental Correlates of COVID - 19 Incidence in Spain. *Geographical Analysis*. v. 0, 2020. Disponível em: < doi: 10.1111/gean.12241>.

SNYDER, B.; PARKS, V. *Spatial Variation in Socio-ecological Vulnerability to COVID-19 in the Contiguous United States*. 2020. Available at SSRN: <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3587713>

TODA, A. Susceptible-Infected-Recovered (SIR) Dynamics of COVID-19 and Economic Impact. *arXiv:2003.11221 [q-bio.PE]* 2020.

WANG, J. TANG, K. FENG, K. LV, W. *High Temperature and High Humidity Reduce the Transmission of COVID-19* (March 9, 2020). Available at SSRN: <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3551767>.

WHO, World Health Organization. *Declaração do diretor-geral da OMS sobre o Comitê de Emergência do RSI sobre o novo coronavírus (2019- nCoV)*. Geneva: World Health Organization, 2020. Disponível em: <[https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-statement-on-ihf-emergency-committee-on-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-statement-on-ihf-emergency-committee-on-novel-coronavirus-(2019-ncov))>



ÁREA DE SUBMISSÃO: Gestão, Economia e Saúde

REVISÃO SISTEMÁTICA SOBRE O USO DO ETEPLIRSEN NA TERAPÊUTICA DA Distrofia Muscular de Duchenne

M. D. B. S. PORTELA¹, A. TEZANOS-PINTO², M. D. L. OLIVEIRA²,
F. ZANGHELINI³, I. A. M. FRIAS², e C. A. S. ANDRADE².

¹ Centro Universitário dos Guararapes, Departamento de Negócios, Bach. em Administração de Empresas.

² Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica.

³ NIHR Innovation Observatory, New Castle UK.

E-mail para contato: cesar.sandrade@ufpe.br

RESUMO – *O desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é realizado com a intenção de restaurar a distrofina na membrana das fibras musculares. O objetivo do presente trabalho foi realizar uma revisão sistemática para avaliar se a administração do Eteplirsén é a melhor escolha para o tratamento da DMD comparado ao uso de corticosteroides. A busca foi realizada até março de 2020 utilizando as seguintes bases de dados: MEDLINE/PubMed, CRD, Cochrane Library, LILACS, e Google Scholar. Não houve restrição para o tipo de estudo a ser incluído, sendo avaliados estudos observacionais comparativos, prospectivos ou retrospectivos e revisões sistemáticas de estudos comparativos. Foram considerados estudos descritos nos idiomas inglês, espanhol, francês e português. Nenhuma restrição em relação ao país ou data de publicação foi imposta. Os artigos foram selecionados pelos títulos e resumos por dois revisores havendo consenso na escolha. Dentre os artigos elegíveis, foram selecionados ensaios clínicos randomizados (ECR) que avaliaram o efeito do cuidado farmacêutico em pacientes com TB. Não foram identificados estudos observacionais ou revisões sistemáticas. Durante a fase de seleção foram obtidos 258 registros. Dentre estes, foram selecionados quatro artigos e inclusos na revisão sistemática. Um total de 96 pacientes foram avaliados nos quatro estudos incluídos na revisão sistemática. As análises do uso do Eteplirsén na terapêutica da distrofia muscular de Duchenne demonstraram efetividade do medicamento em relação aos corticosteróides de uso oral. As evidências mostram que o eterplisen pode ser uma alternativa para melhorar os resultados nos pacientes com distrofia muscular de Duchenne, considerando que o seu uso assinala uma melhora significativa na síntese de distrofina. Desta forma, o uso do eterplisen pode promover melhoria na qualidade de vida dos pacientes, quando comparado ao tratamento usual com corticosteroides.*

Palavras Chave: *Distrofia Muscular de Duchene, Eteplirsén, Corticosteroides.*



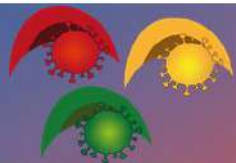
ABSTRACT - The development of new therapeutic strategies for Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) aims to restore dystrophin protein in the membrane of muscle fibers. In the present study, a systematic review was conducted to assess whether the administration of Eteplirsen is a better choice for the treatment of DMD compared with the usual medical care with corticosteroids. The research was carried out until March 2020, in the following databases: MEDLINE / PubMed, CRD, Cochrane Library, LILACS and Google Scholar. There was no restriction on the type of study to be included thus, comparative, prospective or retrospective observational studies and systematic reviews of comparative studies were fairly evaluated. Selected studies in English, Spanish, French and Portuguese were considered. No restrictions in regards of country or publication date were imposed. Upon consensus, two reviewers selected the articles by their titles and abstracts. Among the eligible articles, randomized controlled trials (RCTs) that evaluated the effect of pharmaceutical treatment in patients with DMD were selected. Observational studies or systematic reviews were not met. During the selection phase, 258 records were screened. Among these, four articles were included in the systematic review contemplating a total of 96 patients. The analysis on the use of Eteplirsen therapy for Duchenne muscular dystrophy demonstrates the drug's effectiveness in relation to oral corticosteroids. The evidence shows that Eteplirsen can be contemplated as an alternative to improve patients with Duchenne muscle dysfunction, considering that its use indicates a significant enhancement in the expression of dystrophin. Thus, the use of Eteplirsen can improve the quality of life of patients, when compared with the usual treatment with corticosteroids.

Keywords: Duchene Muscular Dystrophy, Eteplirsen, Corticosteroids.

1. INTRODUÇÃO

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma doença degenerativa neuromuscular herdada, causada principalmente por mutações destrutivas no quadro do gene da distrofia, que retarda a produção da proteína distrofina (J. Mendell et al., 2016; Van Putten et al., 2012). É um distúrbio muscular recessivo progressivo ligado ao cromossomo X que impede a síntese de distrofina funcional (Jung et al., 2012; Longo, 2012). A DMD é o subtipo mais frequente de distrofia muscular, com incidência de 1 em 3.500 a 6.000 nascimentos para meninos vivos (Gintjee et al., 2014; Jung et al., 2012). A distrofina faz parte de um grande complexo de proteínas e glicoproteínas, fornece estabilidade estrutural ao complexo de distroglicanos localizado na membrana celular dentro dos tecidos musculares, resultando em fraqueza muscular proximal progressiva antes dos cinco anos de idade. Como a distrofina provê firmeza às fibras musculares durante as contrações, as fibras serão substituídas por tecido fibrótico e gorduroso, resultando em maior perda de função que aprontará por levar à morte (Jung et al., 2012; Longo, 2012; Van Putten et al., 2012).

Existem diferentes tipos de opções de tratamento, dependendo do objetivo desejado. A terapia com corticosteróides beneficia o indivíduo com DMD ambulatorial, graças aos seus efeitos benéficos em longo prazo na função motora, cardíaca e respiratória (Connolly et al., 2016; Osorio et al., 2019). Em 1974, foi iniciado o tratamento com um glicocorticóide chamado Prednisona, conhecido por seu efeito positivo na DMD. Quase 20 anos depois, o Deflazacort começou a ser utilizado, pois demonstrou ter a mesma eficácia anti-inflamatória com menos efeitos adversos, principalmente no nível de mineralização óssea e ganho de peso (Rafia et al., 2002). Recomenda-



se iniciar o tratamento quando a função motora da criança atingir um nível estável (4 a 6 anos) (Osorio et al., 2019). O deflazacort (0,9 - 1 mg / kg / dia) auxilia na marcha e na função cardíaca, a prednisona (0,75 mg / kg / dia) tem o efeito benéfico na força e função muscular em pacientes com DMD (Longo, 2012; Moxley et al., 2005). A dose de corticosteróide é aumentada à medida que a criança cresce, desde que os efeitos colaterais sejam administráveis até atingir aproximadamente 40 kg. Se os efeitos colaterais forem difíceis de gerenciar, a dose do medicamento deve ser controlada e reduzida em 30% antes do planejamento para reduzi-la. A administração descontínua é menos eficaz, mas está associada a menos efeitos adversos (Moxley et al., 2005; Osorio et al., 2019).

No entanto, os tratamentos acima mencionados apenas atrasam a progressão da doença, em vez de fornecer uma cura completa. Ademais, há uma atitude otimista de que a doença por DMD melhorará com novos tratamentos que atuem no gene defeituoso ou à proteína em falta (Osorio et al., 2019). Em novembro de 2016, o FDA aprovou o medicamento Eteplirsen em pacientes com a mutação genética confirmada do DMD que atua no exon 51 (Macaulay & Evans, 2017). O Eteplirsen, também denominado de Exondy 51, é um oligonucleotídeo antisense sintético projetado para saltar o exon 51, permitindo recuperar o padrão de leitura em algumas deleções específicas da região central do gene (13% dos casos de DMD) (Osorio et al., 2019). A dose recomendada de Eteplirsen é de 30 mg / kg uma vez por semana durante 35-60 minutos de infusão. Pacientes e pais com DMD enfrentam diariamente as consequências dessa doença, enfrentando a perda progressiva da função e temendo a subsequente perda da função (Aartsma-Rus & Krieg, 2017). Eteplirsen é um dos agentes de terapia genética que conseguiu superar o desenvolvimento pré-clínico e chegar à fase experimental, fornecendo dados sobre eficácia e segurança que levaram à sua aprovação como medicamento pelas agências reguladoras (Osorio et al., 2019).

Portanto, a partir do exposto, é importante realizar uma revisão sistemática, para fornecer subsídios sobre a atuação do fármaco na regressão da Distrofia Muscular de Duchenne, prevenindo complicações como cardiomiopatias, problemas pulmonares até a morte, causados pelo uso constante de corticosteroides em adultos e crianças de ambos os sexos.

2. METODOLOGIA

Tipos de estudos

Foram incluídos revisões sistemáticas e estudos referente a Ensaios Clínicos Randomizados (ECRs), cujo delineamento da avaliação incluía pacientes com diagnóstico positivo para Distrofia Muscular de Duchenne e que foram tratados com Eteplirsen versus a terapêutico com corticosteróide. Foram considerados estudos realizados nos idiomas inglês, espanhol e português. Nenhuma restrição em relação ao país ou data de publicação será imposta.

Tipo de participantes

A população do estudo será composta por adultos e crianças de ambos os gêneros e com qualquer idade com diagnóstico clínico positivo para Distrofia Muscular de Duchenne.

Tipos de intervenções

As intervenções que serão avaliadas incluem o fornecimento de Eteplirsen (grupo intervenção) e administração de corticosteróides (grupo controle).

Tipos de desfechos

Para avaliação dos desfechos serão considerados a capacidade de caminhada, função pulmonar e níveis de distrofina. Como desfecho final o óbito.



Método de busca para seleção dos estudos

A busca na literatura por estudos que comparam a efetividade do Eteplirsen vs. corticosteróides em pacientes com DMD será realizada usando uma estratégia de busca predefinida em várias bases de dados: MEDLINE (via PubMed), Centre for Reviews and Dissemination (CRD), TRIP library, The Cochrane Library e Google Scholar. A estratégia de busca combina termos e sinônimos MESH como cuidados farmacêuticos, serviços farmacêuticos, farmácia clínica, DMD, Duchenne Muscular Dystrophy e outros. Além disso, filtros de pesquisa específicos para ECRs também serão aplicados. Todos os estudos serão cuidadosamente comparados por meio de dupla checagem independente para evitar a inclusão de amostras duplicadas ou sobrepostas. Em casos de sobreposição, o estudo com maior número de casos será incluído.

Seleção dos estudos

Dois revisores independentes irão avaliar os títulos e resumos recuperados para identificar os potenciais artigos para inclusão na revisão sistemática. Após a seleção prévia por título e resumo, ambos os revisores analisarão os demais artigos remanescentes através da leitura completa. Todo o desacordo será resolvido através de discussões até chegar ao consenso. Se o consenso não puder ser alcançado entre os dois revisores, a opinião de um terceiro revisor será solicitada. Todos os estudos serão cuidadosamente comparados por meio de dupla checagem independente para evitar a inclusão de amostras duplicadas ou sobrepostas. Em casos de sobreposição, o estudo com maior número de casos será incluído.

Coleta e extração dos dados

Finalmente, com os artigos considerados relevantes selecionados, as informações sobre as características desses estudos (delineamento do estudo, métodos de randomização, população, intervenções e resultados) serão extraídas utilizando o formulário padronizado de coleta de dados. A extração dos dados será realizada por dois pesquisadores independentes, as divergências serão resolvidas por consenso, quando não houver consenso após a discussão entre os dois pesquisadores, a avaliação de um terceiro revisor será solicitada.

Estratégia PICO - População, Intervenção, Comparador e Outcomes

População	A população do estudo foi composta por adultos e crianças de ambos gêneros com Distrofia Muscular de Duchenne.
Intervenção	Eteplirsen.
Comparador	Corticosteroides.
Outcomes (Desfechos)	Capacidade de caminhada, função pulmonar; níveis de distrofina e óbito.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os artigos selecionados, não foram identificados estudos observacionais que aderissem ao PICO. O potencial viés de publicação seria avaliado por meio de do funnel plot. Contudo, a análise não foi realizada devido ao reduzido número de estudos selecionados.

O fluxograma do processo de identificação dos estudos relevantes incluídos na revisão é apresentado na Figura 1. A pesquisa recuperou 258 artigos das bases de dados utilizadas, dos quais 20 artigos foram lidos na íntegra. Após as exclusões foram selecionados quatro estudos (Alfano et al., 2019; Kinane et al., 2018; J. R. Mendell et al., 2013, 2016) que preencheram os critérios de inclusão.

Figura 1 - Diagrama de fluxo da prospecção de estudos comparando a eficácia do Eteplirsen versus Corticosteroides.

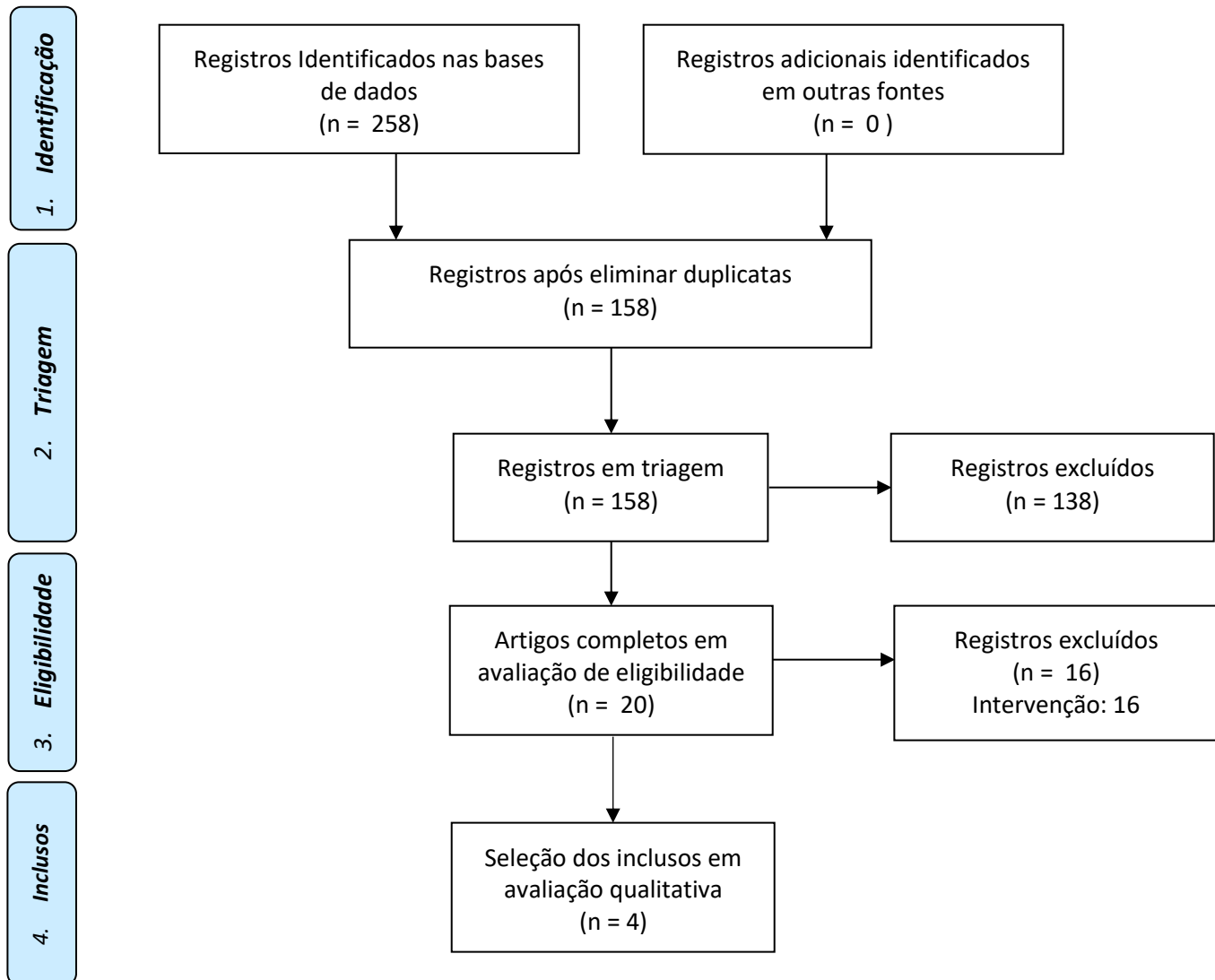




Tabela 1. Principais características basais dos pacientes incluídos nos estudos.

Características	Jerry R. Mendell et al. (2013)		Jerry R. Mendell et al. (2015)		Bernard Kinane et al. (2018)		Lindsay N. Alfano (2019)	
	Eteplisen	Corticosteróide	Eteplisen	Corticosteróide	Eteplisen	Corticosteróide	Eteplisen	Corticosteróide
N	10	4	36	11	12	12	2	10
Idade média	9.1	8.5	9.4	9.5	10	11.25	9.9	9.2
Masculino (%)	100	100	100	100	100	100	100	100
Peso corporal	31.25	30.6	31.57		33	35	39.7	29.9
Altura	125.26	119.3	123.7		123.9	131.2	-	-
Raça	Asiático: 2 Branco: 8	Asiático: 0 Branco: 4	-	-	-	-	-	-
Duração do tratamento	12 meses	12 meses	36 meses	36 meses	54 meses	54 meses	45 meses	45 meses
6MWT (m) BL	386.1	394.5	363.2	357.6	-	-	293	-
6MWT (m) Final	393.1	334.5	263.1	98.5	-	-	0	-
MIP % BL	-	-	91.7	91.7	91.7	91,7	-	-
MIP% Final	-	-	89.5	80.2*	87.1	72,15*	-	-
MEP % BL	-	-	79.3	79.3	80.7	80.7	-	--
MEP % Final	-	-	74.3	67.8*	69.2	64,5*	-	-
Expressão de distrofina	+29.8 to +60.3%	-9.3 to +7.4%	-	-	-	-	+1.07	+0.08%

N = número de pacientes. 6MWT: 6-Minute Walk Test; MEP: maximum expiratory pressure; MIP: maximum inspiratory pressure; * calculado a partir de estatísticas.

A efetividade do eteplisen foi avaliada pela melhora nos resultados do tratamento em comparação ao corticosteroide. Para tal, foram considerados os desfechos como teste de caminhada de seis minutos, a pressão de inspiração e expiração máxima e a mudança na expressão da proteína distrofina. Foi encontrado que o uso do Eteplirsen traz uma melhora significativa na síntese de distrofina, melhorando assim a qualidade de vida e sensação de mobilidade e motilidade dos pacientes. Pelos resultados do teste de caminhada assim com os das pressões de respiração observamos que a degeneração crônica é continua inclusive após a inclusão do tratamento com Eteplirsen, apesar disso a taxa de degeneração é evidentemente mais lenta nos pacientes submetidos ao novo tratamento podendo alongar sua qualidade de vida por até 54 meses. Cabe destacar que os estudos multicêntricos (NCT02286947 e NCT02420379) ainda se encontram em andamento e, portanto, o tempo de seguimento pode variar.

4. CONCLUSÃO

Em resumo, quatro ensaios clínicos randomizados avaliaram o uso do eteplisen comparado com corticosteroide. Os testes de caminhada e pressão de inspiração e expiração máxima demonstraram que a degeneração crônica é continua inclusive após o uso do tratamento com Eteplirsen. Contudo, até o momento, os resultados obtidos nos estudos multicêntricos indicam melhoras significativas com o uso do Eteplisen. O número de estudos disponíveis ainda é restrito



e, portanto, estudos adicionais necessitam ser realizados para a comprovação plena da eficácia do Eteplirsen.

5. REFERÊNCIAS

- Aartsma-Rus, A., & Krieg, A. M. (2017). FDA approves Eteplirsen for Duchenne muscular dystrophy: the next chapter in the Eteplirsen saga. *Nucleic Acid Therapeutics*, 27(1), 1–3.
- Alfano, L. N., Charleston, J. S., Connolly, A. M., Cripe, L., Donoghue, C., Dracker, R., Dworzak, J., Eliopoulos, H., Frank, D. E., & Lewis, S. (2019). Long-term treatment with Eteplirsen in nonambulatory patients with Duchenne muscular dystrophy. *Medicine*, 98(26).
- Connolly, A. M., Florence, J. M., Zaidman, C. M., Golumbek, P. T., Mendell, J. R., Flanigan, K. M., Karachunski, P. I., Day, J. W., McDonald, C. M., & Darras, B. T. (2016). Clinical trial readiness in non - ambulatory boys and men with duchenne muscular dystrophy: MDA–DMD network follow - up. *Muscle & Nerve*, 54(4), 681–689.
- Gintjee, T. J. J., Magh, A. S. H., & Bertoni, C. (2014). High throughput screening in Duchenne muscular dystrophy: from drug discovery to functional genomics. *Biology*, 3(4), 752–780.
- Jung, I.-Y., Chae, J. H., Park, S. K., Kim, J. H., Kim, J. Y., Kim, S. J., & Bang, M. S. (2012). The correlation analysis of functional factors and age with duchenne muscular dystrophy. *Annals of Rehabilitation Medicine*, 36(1), 22.
- Kinane, T. B., Mayer, O. H., Duda, P. W., Lowes, L. P., Moody, S. L., & Mendell, J. R. (2018). Long-term pulmonary function in Duchenne muscular dystrophy: comparison of Eteplirsen-treated patients to natural history. *Journal of Neuromuscular Diseases*, 5(1), 47–58.
- Longo, D. L. (2012). *Harrison: principios de medicina interna (18a*. McGraw Hill Mexico.
- Macaulay, R., & Evans, J. (2017). The FDA Approval of Eteplirsen–Necessary Flexibility or a Worrying Precedent? *Value in Health*, 20(9), A728.
- Mendell, J., Goemans, N., Rodino-Klapac, L., Sahenk, Z., Lowes, L., Alfano, L., Berry, K., Peterson, E., Lewis, S., & Shontz, K. (2016). Eteplirsen, a phosphorodiamidate morpholino oligomer (PMO) for Duchenne muscular dystrophy (DMD): Longitudinal comparison to external controls on six-minute walk test (6MWT) and loss of ambulation (LOA). *Neuromuscular Disorders*, 26, S154.
- Mendell, J. R., Goemans, N., Lowes, L. P., Alfano, L. N., Berry, K., Shao, J., Kaye, E. M.,



- Mercuri, E., Network, E. S. G. and T. F. D. M. D. I., & Hamid, H. A. (2016). Longitudinal effect of Eteplirsen versus historical control on ambulation in Duchenne muscular dystrophy. *Annals of Neurology*, 79(2), 257–271.
- Mendell, J. R., Rodino - Klapac, L. R., Sahenk, Z., Roush, K., Bird, L., Lowes, L. P., Alfano, L., Gomez, A. M., Lewis, S., & Kota, J. (2013). Eteplirsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Annals of Neurology*, 74(5), 637–647.
- Moxley, R. T. 3rd, Ashwal, S., Pandya, S., Connolly, A., Florence, J., Mathews, K., Baumbach, L., McDonald, C., Sussman, M., & Wade, C. (2005). Practice parameter: corticosteroid treatment of Duchenne dystrophy: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology*, 64(1), 13–20.
- Osorio, A. N., Cantillo, J. M., Salas, A. C., Garrido, M. M., & Padilla, J. J. V. (2019). Consenso para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento del paciente con distrofia muscular de Duchenne. *Neurología*, 34(7), 469–481.
- Rafia, S., Pascual-Pascual, S. I., Martinez-Granero, M. A., & Pascual-Castroviejo, I. (2002). Efecto de los corticoides en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne. *Anales de Pediatría*, 57(6), 518–523.
- Van Putten, M., Hulsker, M., Nadarajah, V. D., van Heiningen, S. H., Van Huizen, E., Van Iterson, M., Admiraal, P., Messemaker, T., Den Dunnen, J. T., & AC't Hoen, P. (2012). The effects of low levels of dystrophin on mouse muscle function and pathology. *PloS One*, 7(2), e31937.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos à FACEPE e CAPES pelas bolsas PIBIC, de Mestrado e Pós-Doutorado. Agradecemos ao grupo Bionano pela dedicação na realização deste trabalho, à UFPE e aos nossos colaboradores da Universidade de NewCastle no Reino Unido.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Gestão, Economia e Saúde

PANORAMA DO EXAME PREVENTIVO DE CÂNCER DE COLO DE ÚTERO NO ESTADO DE PERNAMBUCO

G. H. F. GUEDES ¹, J. A. da SILVA GOMES¹, J. M. de CARVALHO¹, M. A. S. da COSTA¹,
M. E. da SILVA¹, M. L. F. de OLIVEIRA¹ e F. C. A. M. TENÓRIO¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Histologia e Embriologia.

E-mail para contato: geovanna facundo@gmail.com

RESUMO – *O câncer cervical no Brasil ocupa a terceira posição em relação aos outros tipos de cânceres que acomete as mulheres. Esta neoplasia pode ser associada a hábitos de vida, fatores ambientais e condições socioeconômicas, mas tem como principal agente o Papiloma Vírus Humano (HPV). Este estudo tem por objetivo caracterizar a faixa etária de prevalência das pacientes, motivo de realização do exame preventivo, histórico de exame papanicolau anteriormente. A coleta dos dados se deu por meio do tabnet, tecnologia desenvolvida pelo departamento de informática do sistema único de saúde (DATASUS) do Ministério da Saúde. A faixa etária de predominância dos exames foram de 30 a 34 anos de idade. Os exames de rastreamento prevaleceram em detrimento das outras motivações, representando uma parcela de 96,5% dos exames. Com relação ao histórico de realização de exames preventivos, a maioria (80,2%) havia realizado o papanicolau anteriormente. Podemos concluir com este estudo que a faixa etária de interesse para o rastreamento do câncer cervical está sendo expressiva em Pernambuco. Além disso, as motivações e o histórico de realização de exames preventivos são positivos, visto que o exame de rastreamento e a frequência correta de exames são significativas para a diminuição da prevalência do câncer cervical na população.*

Palavras chave: saúde, prevenção, câncer cervical.

ABSTRACT - *Cervical cancer in Brazil occupies the third position in relation to other types of cancers that affect women. This neoplasm can be associated with life habits, environmental factors and socioeconomic conditions, but its main agent is Human Papilloma Virus (HPV). This study aims to characterize the age range of prevalence of patients, reason for conducting the preventive exam, history of pap smear previously. Data collection took place through the tabnet, a technology developed by the IT department of the Unified Health System (DATASUS) of the Ministry of Health. The predominant age group of the exams was 30 to 34 years old. Screening exams prevailed to the detriment of other motivations, representing 96.5% of the exams. Regarding the history of preventive exams, the majority (80.2%) had previously undergone pap smears. We can*



conclude with this study that the age group of interest for cervical cancer screening is being expressive in Pernambuco. In addition, the motivations and history of performing preventive tests are positive, since the screening test and the correct frequency of tests are significant for decreasing the prevalence of cervical cancer in the population.

Keywords: health, prevention, cervical cancer.

1. INTRODUÇÃO

O câncer de colo de útero é uma neoplasia associada aos hábitos de vida, fatores ambientais aos quais as mulheres são expostas, podendo também ser associado a condições socioeconômicas. O principal agente etiológico desta neoplasia é o *Papiloma Vírus Humano* (HPV). Este vírus é responsável por uma das doenças sexualmente transmissíveis mais recorrentes, existindo mais de 100 tipos de HPV, sendo 15 oncogênicos, entretanto o HPV-16 é responsável por metade dos cânceres cervicais (Ali-Risasi et al. 2015).

Os países em desenvolvimento apresentam as maiores taxas de incidência de câncer de colo de útero. Estudos indicam que 80% dos casos desta neoplasia são provindos de países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil. De acordo com uma análise publicada pelo INCA (Instituto Nacional de Câncer) em 2017, o Brasil apresenta estimativas que refletem o perfil de países desenvolvidos, entretanto ainda possui alta incidência de câncer de colo de útero, com risco de 17 casos por 100 mulheres. Classificado como a terceira neoplasia mais frequente entre as mulheres, o INCA já relatou 16.710 casos novos só em 2020 (INCA, 2020).

O exame preventivo de câncer de colo de útero, papanicolau, é usado para o rastreamento desta neoplasia. Visa primeiramente a detecção e rastreamento de lesões precursoras e redução da incidência. Além disso tem o objetivo de detectar de forma precoce a doença invasiva, melhorando o prognóstico e consequentemente a redução da mortalidade decorrente do agravamento da neoplasia (LEI et al. 2012).

Este estudo tem por objetivo expor o panorama atual da realização de exames preventivos de rastreamento do câncer cervical no Estado de Pernambuco agregando dados desde a faixa etária das pacientes, motivo da realização dos exames e histórico de realização da citologia cervical. A pesquisa justifica-se pela relevância no cenário nacional, visto que esta configura a terceira neoplasia mais recorrente entre as mulheres brasileiras.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Estudo descritivo dos dados fornecidos pelo Ministério da Saúde. A coleta dos dados se deu por meio do tabnet, tecnologia desenvolvida pelo departamento de informática do sistema único de saúde (DATASUS) do Ministério da Saúde.

Para a coleta de dados, foram considerados os dados relativos à população feminina de todos os 184 municípios do Estado, além do distrito estadual, Fernando de Noronha, e tiveram como fonte a estimativa de 2019 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

Os indicadores utilizados para atingir os objetivos propostos foram: faixa etária das pacientes, motivo do exame, citologia anterior, município de residência das pacientes e município da prestação do serviço. Os dados foram extraídos e catalogados de 2015 a 2019. As informações foram colhidas no banco de dados do Sistema de Informação do Câncer - SISCAN (colo do útero e mama) e no Departamento de Informática do SUS (DATASUS). Adicionalmente, os dados foram



comparados com as estimativas realizadas pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA).

Os dados foram armazenados no programa Excel onde foram analisados no programa Epi-Info, o qual realizou a análise descritiva e o cálculo dos indicadores.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A faixa etária das pacientes variou desde os 9 anos de idade até pacientes acima de 79 anos de idade. Entretanto, a faixa de predominância dos exames foram de 30 a 34 anos de idade, seguido de pacientes entre 35 a 39 anos, estes dados são positivamente corroborados com a realidade de outros estados, como o caso do estudo de prevalência em um município de Santa Catarina, onde a mediana da idade foi de 35 anos (TRINDADE et al., 2017).

Os motivos da realização de exames foram classificados em Rastreamento, Repetição (Exame Alterado ASCUS/Baixo Grau) e Seguimento. Os exames de rastreamento prevaleceram em detrimento das outras motivações, representando uma parcela de 96,5% dos exames. Estes dados são positivos, pois é um fator determinante para a detecção precoce do câncer de colo de útero, sendo estratégico para encontrar tumor na fase inicial, aumentando as chances de tratamento. Isto porque o Instituto Nacional do Câncer considera que as chances de cura do câncer cervical é de 100%. As pacientes que realizaram o exame por motivo de seguimento representaram 3,2% do total e, por fim os exames de repetição representaram 0,3%.

Quando questionadas sobre seu histórico de realização de exames preventivos, a maioria (80,2%) havia realizado o papanicolau anteriormente. Uma parcela de 11,6% das pacientes não haviam realizado exames preventivos anteriormente; 04% das pacientes não sabiam responder a esta questão; e 4,1% das fichas não possuíam informações quanto ao histórico de exames preventivos.

Observando a Figura 1 vemos que em todas as categorias houve diminuição no ano de 2019, em especial na categoria de pacientes que haviam realizado exames preventivos anteriormente houve significativa diminuição quando comparado aos anos de 2017 e 2018. Este declínio de pacientes com histórico prévio de realização do papanicolau torna-se relevante pois indica que em 2019 houve um menor número de mulheres realizando o preventivo de câncer cervical. O baixo índice do teste papanicolau em 2019 pode impactar fortemente a vida das pacientes que poderiam detectar de forma inicial o câncer de colo de útero e/ou outras alterações, de forma que essa detecção tardia seja mais difícil de ser tratada. Entretanto, foi observado que houve uma diminuição homogênea de todas as categorias notificadas podendo ser resultado de uma notificação e registro no banco de dados do Sistema de Informação do Câncer de forma defeituosa no ano em questão.

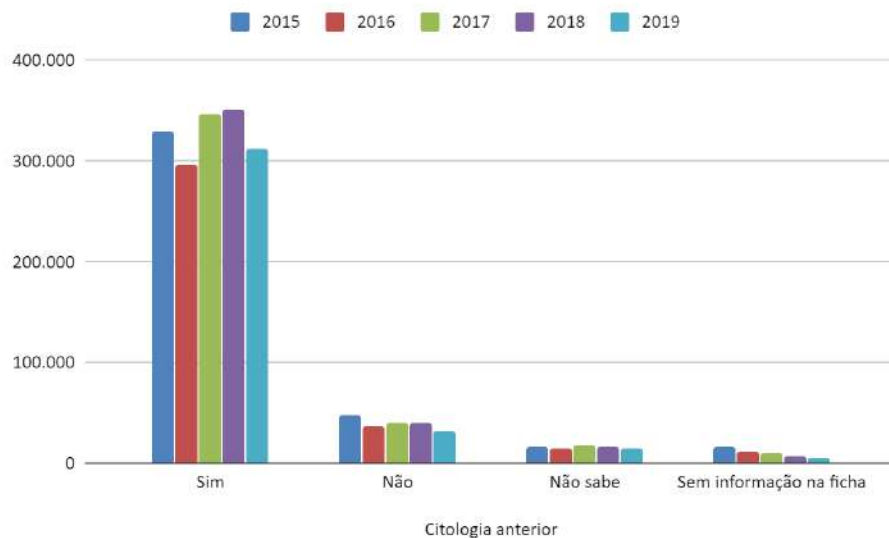


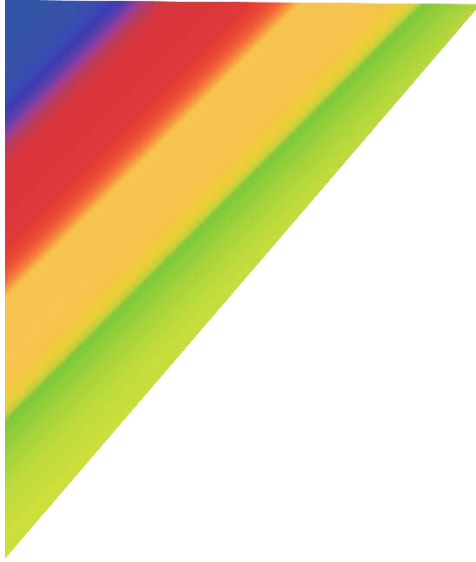
Figura 1 - Pacientes por ano segundo Citologia anterior nos anos de 2015 a 2019.

4. CONCLUSÃO

Podemos concluir com este estudo que a faixa etária de interesse para o rastreamento do câncer cervical está sendo expressiva em Pernambuco. Além disso, as motivações e o histórico de realização de exames preventivos são positivos, visto que o exame de rastreamento e a frequência correta de exames são significativas para a diminuição da prevalência do câncer cervical na população.

5. REFERÊNCIAS

- Ali-Risasi C, Verdonck K, Padalko E, Broeck DV, Praet M. Prevalence and risk factors for cancer of the uterine cervix among women living in Kinshasa, the Democratic Republic of the Congo: a cross-sectional study. *Infect Agent Cancer*. 2015;10:20.
- Brasil. Ministério da Saúde. DATASUS. Sistema de Informação de Mortalidade (SIM) [Internet]. 2008 . Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2006/matriz.htm>
- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2017. 128 p.
- LEI, Jiayao et al. High-risk human papillomavirus status and prognosis in invasive cervical cancer: A nationwide cohort study. *PLoS medicine*, v. 15, n. 10, p. e1002666, 2018.
- Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer, Coordenação de Prevenção e Vigilância / Divisão de Vigilância e Análise de Situação, 2020 – Estatísticas de Câncer no Brasil. 2020
- TRINDADE, Griselda B. et al. Avaliação do rastreamento do câncer do colo do útero e sua periodicidade em um município de Santa Catarina. *Medicina (Ribeirão Preto)*[Internet], v. 50, n. 1, p. 1-10, 2017.



MICROBIOLOGIA CLÍNICA



ÁREA DE SUBMISSÃO: Microbiologia Clínica

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PREPARAÇÕES DE *Moringa oleifera* Lam: UMA REVISÃO

R. R. V. ALVES¹, A. R. SILVA¹, G. B. PRAZERES¹, E. M. G. SANTOS¹, L. C. B. B. COELHO¹, T. H. NAPOLEÃO¹, P. M. G. PAIVA¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica

E-mail para contato: robson.raion@gmail.com

RESUMO – A *Moringa oleifera* é uma árvore perene e de crescimento rápido capaz de se adaptar a diferentes situações climáticas. A espécie é bastante utilizada na medicina popular. Microrganismos têm desenvolvido mecanismos de resistência a fármacos comumente utilizados. Muitas plantas têm apresentado marcante atividade antimicrobiana e este fato estimula a avaliação de plantas como fontes de agentes antimicrobianos. O objetivo desse trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica sobre as atividades antimicrobianas de preparações obtidas de raiz, caule, sementes, folhas e flores de *M. oleifera* frente a isolados de interesse médico. O trabalho identificou nas bases de dados do SciElo e ScienceDirect publicações no tema visando reunir em um só local o conhecimento já gerado sobre o assunto. Preparações das diferentes partes de *M. oleifera* apresentaram atividade contra as bactérias *Escherichia coli*, *Bacillus* sp., *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritica*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Serratia marcescens*, *Bacillus cereus*, *Listeria innocua*, *Enterococcus Faecalis*, *Pseudomonas Aeruginosa* e os fungos *Candida* sp., *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans*. A análise realizada revelou que a atividade antimicrobiana de *M. oleifera* é associada a presença de metabólitos secundários e proteínas que inibem o crescimento e formação de biofilme de espécies patogênicas.

Palavras-chave: Extrato aquoso; Fração de proteínas; Lectina de sementes.

ABSTRACT – *Moringa oleifera* is an evergreen and fast growing tree capable of adapting to different climatic situations. The species is widely used in folk medicine. Microorganisms have developed mechanisms of resistance to commonly used drugs. Many plants have shown remarkable antimicrobial activity and this fact encourages the evaluation of plants as sources of antimicrobial agents. The objective of this work was to carry out a bibliographic review on the antimicrobial activities of preparations obtained from roots, stems, seeds, leaves and flowers of *M. oleifera* against isolates of medical interest. The work identified in the SciElo and ScienceDirect databases publications on the subject, aiming to make available in one place the knowledge already generated about it. Preparations from different parts of *M. oleifera* showed activity against the



bacteria Escherichia coli, Bacillus sp., Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Salmonella enteritica, Vibrio parahaemolyticus, Serratia marcescens, Bacillus cereus, Listeria innocua, Enterococcus Faecalis, Pseudomonas and sp., Candida albicans, Aspergillus fumigatus and Cryptococcus neoformans. The analysis carried out revealed that the antimicrobial activity of M. oleifera is associated with the presence of secondary metabolites and proteins that inhibit the growth and biofilm formation of pathogenic species.

Keywords: Aqueous extract; Protein fraction; Seed Lectin

1. INTRODUÇÃO

Patógenos resistentes aos antimicrobianos são uma preocupação de saúde pública ao redor do mundo. A resistência a antibióticos está sendo cada vez mais comum. Muitas plantas têm apresentado marcante atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* e há uma intensa busca na medicina tradicional direcionada a caracterização antimicrobiana das plantas e novos fármacos (Diaz *et al.*, 2010).

A *Moringa oleifera* Lam., é uma planta tropical pertencente à família da Moringaceae. Os tecidos da planta têm elevado valor nutricional e são também utilizados como preparações medicinais pela população. A *M. oleifera* é tida como uma “árvore multiuso” devido aos diversos fins a ela atribuídos, como por exemplo: forragem animal (folhas e sementes), complemento nutricional (suco das folhas), aplicação no tratamento da água (sementes), ornamentação e na indústria cosmética. Estudos atribuem diversas propriedades biológicas à *M. oleifera*, como por exemplo, atividade coagulante (semente), inseticida (flor, folha e semente), antitumoral e antinoceptiva (semente), anti-inflamatória (folha) e antimicrobiana (todas as partes) (Coelho *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2012; Panda *et al.*, 2013; Pereira, 2014; Freire *et al.*, 2017).

Alguns estudos já avaliaram a atividade antibacteriana e antifúngica de diferentes componentes da *M. oleifera* (Ratshilivha *et al.*, 2014; Tshabalala *et al.*, 2020). A presença de compostos, como 4-(α -L-ramnopiranosiloxi) benzil isotiocianato, flavonoides e proteínas é relacionada a ação contra bactérias e fungos patogênicos (Bukar *et al.*, 2010; Mandal *et al.*, 2014; Moura *et al.*, 2017). Dessa forma, o objetivo do trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica sobre as atividades antimicrobianas de preparações obtidas de raiz, caule, sementes, folhas e flores de *M. oleifera* frente a isolados de interesse médico.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho utilizou abordagem qualitativa, com enfoque bibliográfico e descritivo, com o objetivo de reunir os dados publicados sobre atividade antimicrobiana de *M. oleifera*. A busca eletrônica da literatura foi realizada em bases de dados de referência: SciElo e ScienceDirect. Os descritores *booleanos* usados para a pesquisa foram: *Moringa oleifera* AND atividade antimicrobiana AND bactérias AND fungos. Como critério de seleção, foram utilizados estudos que abordaram a *M. oleifera* como potencial agente antimicrobiano.

Nosso foco foi mostrar que os diferentes tecidos da *M. oleifera* (raiz, casca, folhas, flores e sementes) apresentam atividade contra fungos e bactérias e para isso utilizamos uma associação dos descritores mencionados. Utilizamos artigos disponíveis na internet nos últimos 10 anos. 266 trabalhos foram encontrados com a busca. Após a aplicação dos critérios de seleção, 90 trabalhos tiveram seus resumos/abstracts analisados. 51 trabalhos foram selecionados e lidos integralmente.

Um total de 25 referências foram utilizadas e um painel da atividade antimicrobiana foi produzido.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antimicrobiana de diferentes partes vegetais da *M. oleifera* foi avaliada frente a diversos isolados de interesse médico, como mostra a tabela 1.

Tabela 1 - Atividade antimicrobiana de preparações obtidas de *Moringa oleifera*

Parte utilizada	Preparações	Isolados	Autores
Raiz	Extrato aquoso	<i>Escherichia coli</i>	Morgan <i>et al.</i> (2020)
	Extrato acetona	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida albicans</i>	Tshabalala <i>et al.</i> (2020)
Casca e raiz	Extrato aquoso	<i>Salmonella enteritica</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Dalukdeniya <i>et al.</i> (2016)
Semente	Proteína Catiônica (MoCP)	<i>Escherichia coli</i>	Shebek <i>et al.</i> (2015)
	Lectina (WSMoL)	<i>Bacillus sp.</i> <i>Serratia marcescens</i>	Moura <i>et al.</i> (2017)
Flores	Extrato aquoso e Fração proteica	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i>	Moura <i>et al.</i> (2011)
Folhas	Extrato metanólico e acetato de étila	<i>Bacillus cereus</i> <i>Listeria innocua</i>	Rocchetti <i>et al.</i> (2020)
	Extrato acetona	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus Faecalis</i> <i>Pseudomonas Aeruginosa</i> <i>Candida sp</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Cryptococcus neoformans</i>	Ratshilivha <i>et al.</i> (2014)

Na casca da raiz de *M. oleifera* foram identificados os alcaloides Moringina e Moringinina, flavonoides, saponinas, terpenoides, esteroides, taninos e, o princípio ativo antibiótico, a ptergospermina. Já no caule, foi identificada a presença de taninos, flavonoides, esteroides e alcaloides. Esses compostos podem apresentar atividade antimicrobiana (Raj *et al.*, 2011; Kumbhare *et al.*, 2012).

O pó da raiz surge como uma alternativa promissora ao tratamento de água contaminada. Morgan *et al.* (2020), mostraram que o pó da raiz possui alta atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*. Na maior concentração testada (600 mg/L), a preparação reduziu em 87% as



colônias dessa espécie. A raiz e o caule possuem atividade antimicrobiana contra bactérias *Salmonella enteritica* e *Vibrio parahaemolyticus*, com um alo de inibição maior que 20 mm (Dalukdeniya *et al.*, 2016).

Extrato da raiz, extraído com acetona, apresentou boa atividade antibacteriana e antifúngica com uma concentração mínima inibitória (CMI) < 1 mg/mL contra isolados de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (Tshabalala *et al.*, 2020).

As sementes de *M. oleifera* são ricas em proteínas e lipídios e comumente utilizadas na purificação de água como um coagulante natural, precipitando microorganismos e partículas em suspensão (Ghebremichael *et al.*, 2005). Uma proteína catiônica isolada das sementes de *M. oleifera* (MOCP), foi antibacteriana contra isolados de *E. coli* promover a fusão de membranas interna e externa (Shebek *et al.*, 2015).

A lectina solúvel em água das sementes de *M. oleifera* (WSMoL), inibiu a formação de biofilme por *Serratia marcescens* em concentrações inferiores a 2,6 µg/mL. Em relação aos isolados de *Bacillus sp.*, WSMoL inibiu o crescimento nas concentrações de 20,8 a 41,6 µg/mL de modo similar ao antibiótico rifampicina e evitou a formação de biofilme devido ao baixo número de células viáveis (Moura *et al.*, 2017).

As flores apresentam propriedades antioxidantes devido à presença de α e γ -tocoferol e atividade antibacteriana atribuída ao alcaloide pterigospermina (Leonídio, 2019). Moura *et al.* (2011) reportou que o extrato aquoso (EA) e a fração proteica (FP) de flores de *M. oleifera* foram ativos contra as bactérias *B. subtilis* (CMI = 0,27 mg/mL de EA; e 0,59 mg/mL de FP) e *E. coli* (CMI = 0,023 mg/mL de EA; e 0,018 mg/mL de FP).

As folhas de *M. oleifera* têm alto valor nutricional com altos níveis de proteínas, vitaminas, potássio, cálcio, fósforo, ferro, aminoácidos essenciais, antioxidantes (incluindo β -caroteno) e flavonoides (Ohtaa *et al.*, 2017; Vergara-Jimenez *et al.*, 2017; Sulastri *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2018). Rocchetti *et al.* (2020) avaliaram a atividade antibacteriana de extratos homogeneizados produzidos com metanol e acetato de etila. O extrato metanólico exibiu zona de inibição contra *Bacillus cereus* (11,67 mm) e *Listeria innocua* (10,21 mm) maior que a solução de ampicilina 1,0 mg/mL (9 mm). Nenhum dos extratos foi capaz de inibir o crescimento das bactérias Gram-negativas testadas (*Salmonella typhimurium* e *S. enteritidis*).

Ratshilivha *et al.* (2014) analisaram a atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de folhas coletadas de 12 árvores de *M. oleifera* no período do inverno e do verão. Houve uma grande variação na atividades antimicrobiana com CMI entre 0,04 e 2,50 mg/mL contra bactérias (*E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa*) e de 0,16 a >2,50 mg/mL contra os fungos *Candida sp.*, *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans*.

4. CONCLUSÃO

Diferentes preparações de *M. oleifera* apresentaram atividade antibacteriana e antifúngica contra isolados de interesse médico devido a inibição do crescimento e a formação de biofilme. Os autores associaram essa atividade à presença de compostos como metabólitos secundários e proteínas.

5. REFERÊNCIAS

COELHO, J.S.; SANTOS, N.D.; NAPOLEÃO, T.H.; GOMES, F.S.; FERREIRA, R.S.; ZINGALI, R.B.; PAIVA, P.M.G. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. *Chemosphere*, v. 77, p. 934-938, 2009.



- BUKAR, A.; UBA, A.; OYEYI, T. Antimicrobial profile of *Moringa oleifera* Lam. extracts against some food-borne microorganisms. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, v. 3, n. 1, 2010.
- DALUKDENIYA, D.A.C.K.; SILVA, K.L.S.R.; RATHNAYAKA, R.M.U.S.K. Antimicrobial activity of different extracts of leaves bark and roots of *Moringa oleifera* (Lam). *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, v. 5, n. 7, p. 687-691, 2016.
- DIAZ, M.C.C.; MENDONÇA, V.R.; SILVA, D.M.; RIBON, A.D.O.; AGUILAR, A.P.; MUÑOZ, G.D. Screening of medicinal plants for antibacterial activities on *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, n. 5, p. 724-728, 2010.
- FREIRE, J.E.C.; SILVEIRA, R.M.; ALVES, M.A.O.; COSTA, I.R. Análise cariotípica da planta [*Moringa oleifera* (LAM.)], um membro da família moringaceae, obtida no Campus do Pici-Universidade Federal do Ceará. *Revista Diálogos Acadêmicos*, v. 5, n. 1, 2017.
- GHEBREMICHAEL, A.; KEBREAB, A.; GUNARATNA, K.R.; HENRIKSSON, H.; BRUMER, H.; DALHAMMAR, G. A simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. *Water research*, v. 39, n. 11, p. 2338-2344, 2005.
- KUMBHARE, M.R.; GULEHA, V.; SIVAKUMAR, T. Estimation of total phenolic content, cytotoxicity and in-vitro antioxidant activity of stem bark of *Moringa oleifera*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, v. 2, n. 2, p. 144-150, 2012.
- LEONÍDIO, A.R.A. Atividade antimicrobiana de *Moringa oleifera* lam. *Revista Gestão & Tecnologia*, v. 1, n. 28, p. 4-15, 2019.
- LIN, M.; ZHANG, J.; CHEN, X. Bioactive flavonoids in *Moringa oleifera* and their health-promoting properties. *Journal of functional foods*, v. 47, p. 469-479, 2018.
- MANDAL, B.; BHATTACHARJEE, I.; KUNDU, J.K.; CHANDRA, G. Efficiency of Extracts of two Medicinal Plants of India Against Some Pathogenic Bacteria. *Indian Journal of Biological Sciences*, v. 20, p. 49-55, 2014.
- MORGAN, C.R.; OPIO, C.; MIGABO, S. Chemical composition of *Moringa (Moringa oleifera)* root powder solution and effects of *Moringa* root powder on *E. coli* growth in contaminated water. *South African Journal of Botany*, v. 129, p. 243-248, 2020.
- MOURA, M.C.; PONTUAL, E.V.; GOMES, F.S.; NAPOLEÃO, T.H.; XAVIER, H.S.; PAIVA, P.M.G.; COELHO, L.C.B.B. Preparations of *Moringa oleifera* flowers to treat contaminated water. *Advances in environmental research*, v. 21, p. 269-285, 2011.
- MOURA, M.C.; TRENTIN, D.S.; NAPOLEÃO, T.H.; PRIMON-BARROS, M.; XAVIER, A.S.; CARNEIRO, N.P.; COELHO, L.C.B.B. Multi-effect of the water-soluble *Moringa oleifera* lectin against *Serratia marcescens* and *Bacillus* sp.: antibacterial, antibiofilm and anti-adhesive properties. *Journal of Applied Microbiology*, v. 123, n. 4, p. 861-874, 2017.
- OHTA, T.; NAKAMURA, S.; NAKASHIMA, S.; SHIMAKAWA, H.; EMI, Y.; MATSUMOTO, T.; MATSUDA, H. Stimulators of acylated ghrelin secretion from *Moringa oleifera* leaves. *Phytochemistry Letters*, v. 21, p. 1-5, 2017.
- OLIVEIRA, C.F.R.; LUZ, L.A.; PAIVA, P.M.G.; COELHO, L.C.B.B.; MARANGONI, S.; MACEDO, M.L.R. Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 498-504, 2011.
- PANDA, S.; KAR, A.; SHARMA, P.; SHARMA, A. Cardioprotective potential of N, α -L-rhamnopyranosyl vincosamide, an indole alkaloid, isolated from the leaves of *Moringa oleifera* in isoproterenol induced cardiotoxic rats: *in vivo* and *in vitro* studies. *Bioorg Med Chem Lett*, v. 23, 2013.



- PEREIRA, M.L. *Aspectos estruturais, farmacológicos e toxicológicos de Mo-CBP4, uma proteína ligante à quitina de Moringa oleifera com atividade anti-inflamatória e antinociceptiva via oral*. 2014. 211 f. Tese - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014
- RAJ, A.J.; GOPALAKRISHNAN, V.K.; YADAV, S.A.; DORAIRAJ, S. Antimicrobial activity of *Moringa oleifera* (Lam.) root extract. *Journal of Pharmacy Research*, v. 4, n. 5, p. 1426-1427, 2011.
- RATSHILIVHA, N.; AWOUAFACK, M.D.; DU-TOIT, E.S.; ELOFF, J.N. The variation in antimicrobial and antioxidant activities of acetone leaf extracts of 12 *Moringa oleifera* (Moringaceae) trees enables the selection of trees with additional uses. *South African Journal of Botany*, v. 92, p. 59-64, 2014.
- ROCCHETTI, G.; PAGNOSSA, J.P.; BLASI, F.; COSSIGNANI, L.; PICCOLI, R.H.; ZENGIN, G.; LUCINI, L. Phenolic profiling and in vitro bioactivity of *Moringa oleifera* leaves as affected by different extraction solvents. *Food Research International*, v. 127, p. 108712, 2020.
- SANTOS, A.F.; PAIVA, P.M.; TEIXEIRA, J.A.; BRITO, A.G.; COELHO, L.C.B.B. NOGUEIRA, R. Coagulant properties of *Moringa oleifera* protein preparations: application to humic acid removal. *Journal Environmental Technology*, v. 33, 2012.
- SHEBEK, K.; SCHANTZ, A.B.; SINES, I.; LAUSER, K.; VELEGOL, S.; KUMAR, M. The flocculating cationic polypeptide from *Moringa oleifera* seeds damages bacterial cell membranes by causing membrane fusion. *Langmuir*, v. 31, n. 15, p. 4496-4502, 2015.
- SULASTRI, E.; ZUBAIR, M.S.; ANAS, N.I.; ABIDIN, S.; HARDANI, R.; YULIANTI, R. Total phenolic, total flavonoid, quercetin content and antioxidant activity of standardized extract of *Moringa oleifera* leaf from regions with different elevation. *Pharmacognosy journal*, v. 10, n. 6s, 2018.
- TSHABALALA, T.; NDHLALA, A.R.; NCUBE, B.; ABDELGADIR, H.A.; VAN-STADEN, J. Potential substitution of the root with the leaf in the use of *Moringa oleifera* for antimicrobial, antidiabetic and antioxidant properties. *South African Journal of Botany*, v. 129, p. 106-112, 2020.
- VERGARA-JIMENEZ, M.; ALMATRAFI, M. M.; FERNANDEZ, M. L. Bioactive components in *Moringa oleifera* leaves protect against chronic disease. *Antioxidants*, v. 6, n. 4, p. 91, 2017.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq, Capes e FACEPE.



ÁREA DE SUBMISSÃO: MICROBIOLOGIA CLÍNICA

ANÁLISE DAS DISPENSAÇÕES DE ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÂMICOS PARA PACIENTES DA URGÊNCIA E INTERNADOS EM UM HOSPITAL DE TERESINA-PI

E.P da SILVA; E.P.FONTENELE¹; E. C.HOLANDA¹ e S. M. de ANDRADE²

¹ Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia;

² Faculdade Santo Agostinho;

E-mail para contato: dudaps28@outlook.com

RESUMO-Introdução: Os antimicrobianos estão entre os fármacos mais prescritos em hospitais, e uma das consequências mais importantes do uso indiscriminado é a resistência bacteriana. Visando contribuir com medidas que facilitem o controle do problema, este trabalho teve como objetivo, analisar o perfil dos principais antibióticos beta-lactâmicos dispensados em uma unidade hospitalar da cidade de Teresina-PI. Metodologia: Trata-se de um estudo descritivo, quantitativo e exploratório, realizado num hospital municipal de Teresina-PI. Os dados sobre os antimicrobianos foram coletados no Sistema Informatizado de Dispensação e no Controle de Estoque de Medicamentos. A coleta de dados foi realizada nos meses de abril a maio de 2019. Resultado e Discussão: Constatou-se a maior utilização da cefalosporinas da classe dos beta-lactâmicos com 55,20%, em seguida pelas penicilinas (48,70%) e os Carbapenens (15%). Destas classes a Oxacilina correspondeu a 30%, seguida da cefalexina cápsula (27,7%), ceftriaxona (18%), Tazobactam/Piperacilina (5,5%) e Benzilpenicilina benzatina (5%). Os dados evidenciam a importância de se criar mecanismos de controle na prescrição e dispensação de antimicrobianos. Conclusão: Pode-se observar no presente estudo que a classe das cefalosporinas e penicilinas foram as mais consumidas no hospital, podendo tais fatores relacionar-se com a ausência de uma política de controle dos medicamentos prescritos e à falta de protocolos de uso de antimicrobianos na época do estudo.

Palavras-chave: resistência bacteriana; farmacovigilância; farmácia hospitalar; Anti-infecciosos.

ABSTRACT-Introduction: Antimicrobials are among the most prescribed drugs in hospitals, and one of the most important consequences of indiscriminate use is bacterial resistance. In order to contribute to measures that facilitate the control of the problem, this study aimed to analyze the profile of the main beta-lactam antibiotics dispensed in a hospital in the city of Teresina-PI. Methodology: This is a descriptive, quantitative and exploratory study, carried out in a municipal hospital in Teresina-PI. Data on antimicrobials were collected in the Computerized Dispensing



System and in the Control of Medicines Stock. Data collection was carried out from April to May 2019. Result and Discussion: The greatest use of cephalosporins in the beta-lactam class was found with 55.20%, followed by penicillins (48.70%) and the Carbapenems (15%), of these classes Oxacillin corresponded to 30%, followed by cephalexin capsule (27.7%), ceftriaxone (18%), Tazobactam / Piperacillin (5.5%) and benzyl benzylpenicillin (5%). The data show the importance of creating control mechanisms in the prescription and dispensing of antimicrobials. Conclusion: It can be seen in the present study that the class of cephalosporins and penicillins were the most consumed in the hospital, and such factors may be related to the absence of a policy to control prescription drugs and the lack of protocols for the use of antimicrobials at the time of the study

Keywords: Bacterial resistance; pharmacovigilance; hospital pharmacy; Anti-infectives

1. INTRODUÇÃO

Os antimicrobianos são fármacos com a propriedade de suprimir o crescimento dos patógenos ou destruí-los, e sua utilização modificou o curso natural das doenças (VIEIRA; VIEIRA, 2017), principalmente no combate a infecções (FREITAS et al.,2015). Estes estão entre as classes de medicamentos mais utilizados na clínica (MITRE et al.,2017), visto que cerca de 25% a 35% dos pacientes hospitalizados recebem estes fármacos, tanto para indicações terapêuticas, como profiláticas durante o internamento (VIEIRA; VIEIRA,2017). E 50% do orçamento dos países gastos com medicamentos são destinados à compra de antimicrobianos e 12% das prescrições ambulatoriais são desses fármacos (TRINDADE et al.,2017). Porém, as bactérias são seres com capacidade de desenvolver evoluções, como forma primária de resistência a antibióticos pode-se citar o alto poder de mutação e a recombinação dos genes (LADEIRA et al.,2017).

A resistência bacteriana em nível hospitalar é considerada um problema de saúde pública mundial. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) apontam que mais de 50% das prescrições de antimicrobianos são inapropriadas e dois terços dos mesmos são usados sem prescrição médica (MITRE et al.,2017). Fato que os antibióticos quando dispensados dentro da unidade hospitalar requerem a apresentação de uma receita elaborada por um profissional habilitado. A dispensação desses medicamentos deve ocorrer de acordo com as quantidades e especificações solicitadas dentro do prazo requerido de forma segura, para evitar o uso de forma errônea desses medicamentos. É importante que esse procedimento seja realizado por meio de fluxos organizacionais buscando minimizar os erros. A escolha do sistema de distribuição de anti-infecciosos no ambiente hospitalar também é importante para promover uma maior eficácia no tratamento e profilaxia do seu uso (SILVA et al., 2016).

Entretanto, o tratamento realizado através de antibióticos de forma inadequada no hospital pode impossibilitar a eficácia a logo prazo. Em consequência disso, expõe em risco à vida humana (LIMA JÚNIOR et al.,2019).Nesse sentido, afeta de forma diferente os diversos envolvidos na utilização dessas drogas,já que o prescritor perde pacientes devido à ineficácia do tratamento; o paciente tem o curso da doença não solucionada, necessitando de fármacos alternativos, muitas vezes de custos mais elevados(VIEIRA;VIEIRA,2017).Assim, o uso racional beneficia os pacientes internados na medida em que reduzem os riscos de complicações e conseqüentemente o tempo de internação, além de proporcionar um serviço com melhor qualidade(NEVES;COLET,2015). Em vista da situação exposta, o objetivo do presente estudo é descrever o perfil dos principais antibióticos beta-lactâmicos dispensados em uma unidade hospitalar na cidade de Teresina-PI.



2. MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo descritivo, quantitativo e exploratório realizado num hospital municipal de Teresina-PI. A coleta de dados foi realizada nos meses de abril a maio de 2019. Os dados foram coletados no Sistema Informatizado de Dispensação e no Controle de Estoque de Medicamentos do Serviço de Farmácia, considerando os medicamentos padronizados e dispensados. O instrumento para a coleta de dados foi uma planilha computadorizada composta por uma parte específica sobre as dispensações dos medicamentos na unidade hospitalar. As variáveis investigadas foram: classe dos antibióticos beta-lactâmicos, antimicrobiano beta-lactâmicos e forma farmacêutica, com o intuito de investigar o perfil de utilização de medicamentos nessa unidade hospitalar, nos quais foram analisados a quantidade de antibióticos solicitados durante o período de estudo e, criada tabela e gráfico a partir deste. Por fim, os resultados obtidos foram comparados com os descritos na literatura.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O hospital onde foi realizado o estudo, embora de pequeno porte, possui unidades que requerem utilização de antimicrobianos tanto de forma terapêutica quanto profilática, sendo de fundamental importância identificar a proporção de antimicrobianos que está sendo consumida e quais podem estar sendo utilizados de forma indevida (RODRIGUES, BERTOLDI,2010).

Conforme a Figura 1 foi possível constatar maior utilização da cefalosporinas da classe dos beta-lactâmicos com 55,20%(n=2975,5) em seguida pelas penicilinas (48,70%; n=2326,3) e por fim os carbapenéns (15%;n=108,2).

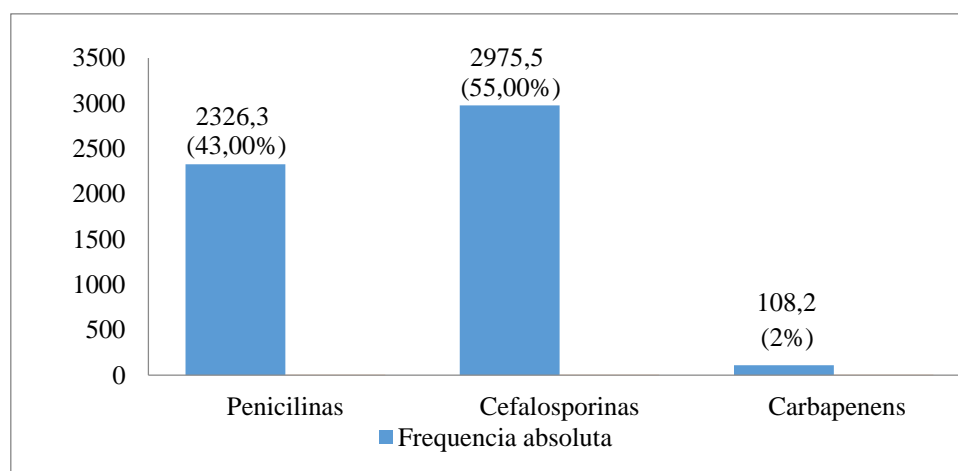


Figura 1: Consumo das principais classes de antibióticos beta- lactâmicos utilizados em um hospital municipal na cidade de Teresina-PI no período de abril a maio de 2019.

Fonte: Autoria própria, 2020.

A classe das cefalosporinas e penicilinas foram as mais consumidas no presente hospital, sendo que esse perfil de utilização é esperado por serem de baixa toxicidade e ótima segurança (SANTOS et al.,2016).Esses medicamentos estão presentes em muitos esquemas de tratamento de doenças infecciosas respiratórias, do trato gastrointestinal, sistema locomotor e sistema nervoso central, que são os tipos de infecções mais atendidas no hospital em estudo (RODRIGUES,BERTOLDI,2010).Porém, não são mais comumente indicadas na prática clínica,



devido ao fato da evidência do crescimento da resistência bacteriana (NEVES; COLET,2015).

Este resultado está em consonância com diversos estudos que apontam uma alta prevalência nas prescrições de antimicrobianos de largo espectro como as cefalosporinas. Resultados semelhantes foram obtidos por Freitas et al.,(2015) em estudo da avaliação das prescrições de antibióticos entre os diferentes dispensários farmacêuticos no município de Natividade- RJ, em que a cefalosporina correspondeu a 33% das prescrições no hospital durante o mês de abril de 2015 e por Ladeira et al.,(2017) , houve maior proporção de retenções foi a de cefalosporinas de 3ª geração (97,4%) no estudo sobre o perfil de dispensação de antimicrobianos antes e depois da promulgação da RDC 44/2010 com base em dados obtidos em uma farmácia comunitária do estado de Rio de Janeiro, no período de 28 de outubro de 2009 a 29 de outubro de 2012.

Tabela 1- Consumo dos principais antimicrobianos beta- lactâmicos utilizados em um hospital municipal na cidade de Teresina-PI no período de abril a maio de 2019

Antimicrobianos	Quantidade(n)	Frequência(%)
Amoxicilinasusp.	130	2,4
Benzilpenicilina procaína + Benzilpenicilina potássica	6	0,11
Benzilpenicilina benzatina	270	5
Cefalotina	14	0,25
Cefazolina	2	0,04
Cefalexinasusp.	74	1,4
Cefalexinacaps	1500	27,7
Ceftriaxona	925	18
Ceftazidima	220	4
Cefepima	225	4,20
Imipenem	60	0,10
Meropenem	80	1,4
Sulbactam/ampicilina	4	0,07
Tazobactam/Piperacilina	300	5,5
Oxacilina	1600	30
Total	5410	100,00

Legenda:Amoxicilina 250mg/5ml, pó para Suspensão Oral ;Benzilpenicilina procaína 300.000UI + benzilpenicilina potássica 100.000UI sol. injetável mais dil de 2 a 5 ml. ;Benzilpenicilina benzatina 1.200.000UI pó para sol. Inj. mais diluente de 3 a 5 ml ;Cefalotina Sódica 1g, pó p/Sol. Inj. ;Cefazolina Sódica 1g, pó p/Sol. Inj. Cefalexina suspensão oral 250mg/5ml, pó para diluição, com 60 ml de água com dosador graduado;Cefalexina sódica ou cloridrato 500mg;Ceftriaxona Sódica 1g I.V., pó p/Sol. Inj.;Ceftazidima 1g, pó p/Sol. Inj.; Cefepima, Cloridrato 1g sol, inj.;Imipenem 500 mg + cilastatina sódica 500mg, pó para sol. Inj.;Meropenem 1g, pó p/sol. inj.;Sulbactam 0,5g + Ampicilina 1g sol inj.; Piperacilina + Tazobactam 4g + 500mg inj.; Oxacilina Sódica 500mg, pó p/Sol. Inj Fonte: Autoria própria, 2020.



Conforme a Tabela 1 com maior abrangência, observa-se a utilização de Oxacilina (30%), Cefalexina caps (27,7%); Ceftriaxona (18%); Tazobactam/Piperacilina (5,5%) e Benzilpenicilina benzatina (5,5%) de antibióticos no referido estabelecimento hospitalar de saúde.

A oxacilina correspondeu a 30% dos antimicrobianos. Fato justificado por ser um medicamento presente em muito esquema de tratamento de doenças infecciosas respiratórias e do trato gastrointestinal (RODRIGUES; BERTOLDI,2014). Ainda se deve a existência de mecanismos de resistência aos antibióticos, como por exemplo a produção de β -lactamases pelas bactérias, torna-se evidente que o maior consumo do fármaco que visa driblar tal mecanismo de resistência e assim aumentar as chances de sucesso do tratamento (LOLI; SILVA,2020).

Nesse estudo, observou ainda que 27,7% das dispensações foram de cefalexina cápsula, destaca que esta apresenta esse perfil de utilização por tratar-se de uma classe antimicrobiana de baixa toxicidade, englobando variados tipos de infecção, principalmente as do trato urinário (FREITAS et al.,2015). Resultados semelhantes foram obtidos por Caminha et al.,(2017) no perfil de prescrição de antimicrobianos em um hospital no interior do Rio Grande do Sul, nos meses de março a junho de 2014, com maior utilização foi a Cefalexina 500mg (49%), seguido de Ceftriaxona 1g (24%), Cefalotina 1g (9%) e Ciprofloxacino 500mg (5%).

Enquanto que o consumo de ceftriaxona sódica (19%) na tabela, se deve a ação ativa contra as enterobactérias, incluindo cepas produtoras de β lactamase. Assim, o uso desse fármaco é indicado para tratamento de escolha no caso de infecções graves causadas por *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratiae* *Haemophilus*. Em geral, o perfil de segurança ao uso de cefalosporinas é excelente. Portanto, no presente estudo a prevalência de consumo se deve a indicação para caso de peritonites, infecções do trato gastrintestinal e biliar, infecções ósseas, articulares e de tecidos moles (ALESSIA,2012). Além disso, ainda deve ser levado em consideração o preço desse antibiótico que é bem acessível, dificultando a falta do mesmo na farmácia hospitalar (ANDRADE et al.,2015).

Destacou-se ainda da classe das penicilinas, a associação de Piperacilina+Tazobactam (5,5%) que se deve a indicação em pacientes adultos para infecções de trato respiratório superior, trato urinário, intra-abdominais, sepse bacteriana e infecções de pele(LIMA JÚNIOR et al.,2019).E por abscessos causados por germes resistentes aos antibióticos betalactâmicos, como *P. aeruginosa*, *Acinetobacter*, *Proteus*, *E. coli*, outros Gram-negativos e anaeróbios; por este fármaco possuir, portanto, bom potencial como monoterapia no tratamento de infecções polimicrobianas, fato que na maioria dos agentes patogênicos são mais resistentes, necessitando de tratamento com antibióticos, muitas vezes com associação de fármacos(NEVES; COLET,2015).

O cefepima possui boa atividade contra *P. aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*, *S. aureus* e *Staphylococcus pneumoniae*. É altamente ativa contra *Haemophilus* e *Neisseria*, sendo indicado para uso em infecções graves do trato respiratório inferior e do trato urinário. Porém, este fármaco pode ser um fator de risco modificável no desenvolvimento da disfunção neurológica de forma aguda, principalmente em pacientes com problemas de insuficiência renal (LIMA JÚNIOR et al.,2019). Com isso, o uso elevado desse fármaco (4,2%), conforme verificado na tabela 1, pode trazer problemas futuros em relação à seleção de cepas resistentes, uma vez que o cefepima é uma cefalosporina de 4ª geração, que deveria ser de uso mais limitado (NEVES; COLET,2015). Fato que mostra a necessidade de mudar o tratamento destes pacientes que podem gerar resistência, evitando, então, um maior custo com o tratamento antes iniciado (MELO et al.,2019).

Em análise sobre a forma farmacêutica na Tabela 2, foi possível verificar que a mais dispensada é a injetável, ficando com 68,2%, em seguida está a forma de cápsulas com 27,7% e por fim as suspensões pontuando apenas 3,8% de todos as prescrições de beta- lactâmicos.



Tabela 2- Consumo das principais formas farmacêuticas dos antimicrobianos beta- lactâmicos utilizados em um hospital municipal na cidade de Teresina-PI no período de abril a maio de 2019.

Forma farmacêutica	Quantidade(n)	Frequência(%)
Injetável	3706	68,5
Cápsulas	1500	27,7
Suspensões	204	3,8
Total	5410	100,0

Fonte: Autoria própria, 2020.

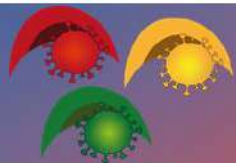
A maior parte dos antimicrobianos beta- lactâmicos foram administradas pela via endovenosa com 68,5%(Tabela 2), em função das condições físicas dos pacientes internados, além de apresentar efeito farmacológico imediato, permitir o controle da dose, admite ainda grandes volumes e por último permite substâncias com pH diferentes da neutralidade (ANDRADE et al.,2015). Entretanto, a via injetável pode provocar sérias consequências se for inadequadamente prescrita ou administrada visto que pode causar reações anafiláticas, necroses teciduais ou infecções por deficiência de assepsia (MITRE et al.,2017). Cabe ainda salientar, que a via de administração intravenosa, favorece a ocorrência de interações medicamentosas, especialmente quando da incompatibilidade entre as substâncias e da não consideração dos intervalos de administração (NEVES;COLET,2015). Dessa forma, sempre que os níveis sanguíneos do antimicrobiano forem equivalentes na via oral e endovenosa e o paciente estiver em condições de ingeri-lo, o prescritor deveria fazer a conversão para via oral, já que esta, além de mais segura contra infecções, é também mais econômica para o hospital (RODRIGUES, BERTOLDI,2010).

4. CONCLUSÃO

Constatou no hospital em estudo que os beta-lactâmicos são considerados medicamentos de grande importância e que se têm uma frequência elevada de utilização na classe das cefalosporinas e penicilinas, caracterizado pelo Oxacilina, Cefalexina cápsula, Ceftriaxona, Tazobactam/Piperacilina e Benzilpenicilina benzatina na forma farmacêutica injetável. Porém, o uso irracional desses fármacos pode ocasionar resistência no tratamento de infecções hospitalares e o consumo no hospital relacionar-se com a ausência de uma política de controle dos medicamentos prescritos e à falta de protocolos de uso de antimicrobianos na época do estudo. Desse modo, evidencia-se que a presença do profissional farmacêutico é essencial para que aconteça o uso devido e racional dos antibióticos, possibilitando melhor qualidade nos tratamentos oferecidos aos pacientes, além de priorizar políticas de saúde pública que devem levar em conta a necessidade de melhorias nas estratégias de educação em saúde.

5. REFERÊNCIAS

- ALÉSSIO, A. V. Análise químico-farmacêutica de preparações injetáveis de ceftriaxona sódica. Universidade Estadual Paulista. Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas Dissertação(Mestrado).Araraquara 2012.
- ANDRADE, J. M. A. et al. Perfil da utilização de antibióticos em crianças internadas num hospital infantil no interior do estado do Ceará .Boletim Informativo Geum, 6(3):15-21, jul./set. 2015.
- CAMINHA, K., CONCEIÇÃO, D. M., MENEZES, A. P. S. Perfil de prescrição de antimicrobianos



- em um hospital no interior do Rio Grande do Sul. Revista da 1ª Mostra de Trabalhos de Conclusão de Curso. Urcamp Bagé - RS, 1(1),2017.
- FREITAS,A. V.,OLIVEIRA,C. G. A., FUMIAN,L.,. Avaliação das prescrições de antibióticos entre os diferentes dispensários farmacêuticos no município de Natividade, RJ. Acta Biomédica Brasiliensia 6(2):68-77.Dez., 2015
- LIMA JÚNIOR,F. A. et al., Perfil das prescrições de antibioticoterapia em uma unidade de terapia intensiva adulto de um hospital de referência cirúrgica no estado do maranhão. Revista Eletrônica Acervo Saúde / ElectronicJournalCollection Health | ISSN 2178-2091. | Vol.Sup.34 | e1301,2019.
- LOLI, V. M.; SILVA, R. M. Perfil do consumo de antimicrobianos em hospital municipal de médio porte do Rio de Janeiro. Rev. Cient. da Saúde. Rio de Janeiro, RJ 5 (2) :39-50,mai.,ago.2020.
- MITRE,G.S.,SILVA,S.A.B., SILVA,G.A.B.,REZENDE,M.M.P. SOUSA JR.,J.R.,Perfil de prescrição de antimicrobianos nas unidades básicas de saúde conveniadas com a universidade de Itaúna/MG. RevMed Minas Gerais, 27:e-1875,2017.
- MELO,F. S. et al. Uso racional de antimicrobianos na unidade de terapia intensiva. Revenferm UFPE, Recife, 13(5):1475-84, mai., 2019.
- NICOLINI, P.; NASCIMENTO, J. W. L.; GRECO, K. V.; MENEZES, F. G. Fatores relacionados à prescrição médica de antibióticos em farmácia pública da região Oeste da cidade de São Paulo. Ciênc. saúde coletiva, Rio de Janeiro, 2013.
- NEVES,C., COLET. C.Perfil de uso de antimicrobianos e suas interações medicamentosas em uma uti adulto do Rio Grande do Sul. RevEpidemiolControl Infect.,5(2):65-71.Abr/Jun.,2015.
- TRINDADE,N.M., CERDEIRA,C.D., SANTOS,G.B. Avaliação do uso de antimicrobianos e perfil de usuários de uma farmácia do Sul de Minas Gerais. Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações,15(1) :755-762, jan./jul. 2017.
- RODRIGUES,F.D.; BERTOLDI,A.D. Perfil da utilização de antimicrobianos em um hospital privado. Ciênc. saúdecoletiva,Rio de Janeiro , vol.15 supl.1jun. 2010. ISSN 1413-8123
- SANTOS,R. G. et al. Prescrições de antimicrobianos de uso restrito de pacientes internados em um hospital de ensino. Rev. Bras. Farm. Hosp. Serv. Saúde São Paulo, 7 (1): 8-12 jan./mar. 2016.
- SILVA,E.R.M..Análise do perfil das prescrições de antimicrobianos na clínica médica de um hospital público do Pará . RevBrasFarmHospServ Saúde. São Paulo 3 (2): 15-19 abr./jun. 2012.
- SILVA, Cleiton Bueno da et al. Farmácia hospitalar, segundo o modelo de gestão dos hospitais públicos de grande porte, no eixo Goiânia-Brasília. 2016.
- SOARES,J.H.R., MENDES,P.B.S., TACLA,M.T.G.M. , LOPES,G.K. Identificação microbiológica e perfil de resistência a antimicrobianos em crianças hospitalizadas. Rev. Soc. Bras. Enferm. Ped.,17,(2): 57-63, Dez., 2017.
- VIEIRA, P. N.; VIEIRA, S. L. V. Uso irracional e resistência a antimicrobianos em hospitais. Arq. Cienc. Saúde UNIPAR, Umuarama, 21(3): 209-212, set./dez. 2017.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Microbiologia Clínica

ESTUDO REVISIONAL SOBRE O APERFEIÇOAMENTO DE MÉTODOS EMPREGADOS PARA A DIFERENCIAÇÃO DA ENTAMOEBA HISTOLYTICA E ENTAMOEBA DISPAR

J. P. M. BARBOSA FILHO¹, J. O. de C. BRANDÃO FILHO²

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas;

² Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

E-mail para contato: pedromfilho94@gmail.com

RESUMO – *Introdução: A Entamoeba histolytica, única espécie definitivamente associada a danos patológicos, é um protozoário patogênico intestinal invasivo causador da amebíase. A observação microscópica para identificação de cistos e trofozoítos nas fezes é ainda o exame mais realizada para o diagnóstico da amebíase. Entretanto, este procedimento tem sido reavaliado desde que foi demonstrado que existem duas espécies distintas de Entamoeba, que apesar de possuírem características morfológicas semelhantes, apresentam capacidade diferentes de causar a doença. Objetivo: Realizar um levantamento sobre o processo de descoberta, identificação e diferenciação das espécies E. histolytica e E. dispar. Metodologia: Foi realizada uma revisão na literatura utilizando as bases de dados ScienceDirect, PubMed e Scopus. As palavras-chave foram “Entamoeba”, “diagnóstico” e “história”. Resultados e Discussão: O diagnóstico da amebíase tem sido tradicionalmente feito pela aplicação da coproscopia, que é incapaz de diferenciar a E. histolytica da E. díspar. A distinção entre as duas espécies vem sendo alvo de vários estudos provando que a espécie patogênica e a não patogênica podem ser distinguidas individualmente usando eletroforese isoenzimática. Conclusão: As duas espécies podem ser diferenciadas por métodos de biologia molecular, bioquímicos e imunológicos, sendo esse, um instrumento preciso, viável e rápido para a confirmação da infecção pela E. histolytica.*

Palavras-chaves: Parasitologia, Amebíase, Identificação, Diagnóstico.

ABSTRACT – *Introduction: Entamoeba histolytica, the only species definitely associated with pathological damage, is an invasive intestinal pathogenic protozoan that causes amoebiasis. Microscopic observation for the identification of cysts and trophozoites in feces is still the most common test for the diagnosis of amoebiasis. However, this procedure has been reevaluated since it was demonstrated that there are two different species of Entamoeba, which despite having similar morphological characteristics, have different capacity to cause the disease. Objective:*



Conduct a survey on the process of discovery, identification and differentiation of E. histolytica and E. dispar. Methodology: A literature review was performed using the ScienceDirect, PubMed and Scopus databases. The keywords were “Entamoeba”, “diagnosis” and “history”. Results and Discussion: The diagnosis of amebiasis has traditionally been made through the application of coproscopy, which is unable to differentiate E. histolytica from E. dispar. The distinction between the two species has been the subject of several studies proving that the pathogenic and non-pathogenic species can be distinguished individually using isoenzymatic electrophoresis. Conclusion: The two species can be differentiated by molecular biology, biochemical and immunological methods, which is an accurate, viable and fast instrument for confirming E. histolytica infection.

Keywords: Parasitology, Amebiasis, Identification, Diagnosis.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Entamoeba* engloba um grupo de organismos unicelulares, anaeróbicos, organismos parasitários encontrados em humanos, primatas não humanos, outras espécies de vertebrados e invertebrados em todo o mundo. Contém muitas espécies, seis das quais, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba moshkovskii*, *Entamoeba polecki*, *Entamoeba coli* e *Entamoeba hartmanni* residem no lúmen intestinal humano (Clark; Diamond, 1991).

A *Entamoeba histolytica*, única espécie definitivamente associada a danos patológicos, é um protozoário patogênico intestinal invasivo causador da amebíase que, além de parasitar seres humanos, pode ser encontrada em proporções menores, em animais como primatas, gatos, cães e alguns roedores (Singh *et al.*, 2009).

Esta parasitose apresenta ampla distribuição geográfica com alta prevalência em regiões tropicais, onde as condições de higiene e educação sanitária são consideradas deficientes. A crescente migração de pessoas de países em desenvolvimento para países desenvolvidos favoreceu a disseminação do parasito por todo o mundo. No Brasil em particular, existem diferenças quanto a frequência da parasitose de acordo com a região analisada. Estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que aproximadamente 50 milhões de pessoas são afetadas pela *E. histolytica*, sendo responsável por cerca de cem mil mortes por ano, tornando-a uma das causas mais importantes de morbimortalidade no homem, o que a torna a segunda principal causa de morte por infecção provocada por protozoário parasito (Baxt; Singh, 2008; Ximénez *et al.*, 2010).

O ciclo biológico do parasito apresenta dois estágios básicos e bem definidos: trofozoítos e cistos. A infecção amebiana tem início quando o homem ingere a forma cística madura contida em alimentos, água ou por qualquer tipo de contato fecal-oral. Também são possíveis formas menos usuais de transmissão, incluindo o sexo anal e oral e equipamentos de lavagem intestinal contaminados (Cordeiro; Macedo, 2007). A observação microscópica para identificação de cistos e trofozoítos nas fezes é ainda o exame mais realizada para o diagnóstico da amebíase. Entretanto, este procedimento tem sido reavaliado desde que foi demonstrado que existem duas espécies distintas de *Entamoeba*, que apesar de possuírem características morfológicas semelhantes, apresentam capacidade diferentes de causar a doença (Clark; Diamond, 1993). As manifestações clínicas da amebíase podem se apresentar de formas muito diversas. A maioria dos infectados não apresenta sintomas, e só uma pequena percentagem sofre de febre, disenteria ou abscesso hepático. O acometimento extra intestinal atinge com mais frequência o fígado, causando a hepatite amebiana ou o abscesso de fígado. (Ackers, 2002).



Considera-se atualmente a existência de duas espécies, a *E. histolytica*, que é invasiva e patogênica, e a *E. dispar*, não invasiva e não patogênica. Esta reclassificação foi resultado de dados clínicos, bioquímicos, imunológicos e genéticos, resultando um avanço significativo no conhecimento sobre a amebíase (Huston; Petri, 1999). Diante disso, o objetivo dessa revisão foi realizar, na literatura, um levantamento sobre o processo de descoberta, identificação e diferenciação das espécies *E. histolytica* e *E. dispar* ao longo do tempo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de uma revisão bibliográfica realizada com os descritores “*Entamoeba*”, “diagnóstico/diagnosis” e “história/history”. A busca literária foi realizada nas plataformas de pesquisa ScienceDirect, Pubmed e Scopus. Foram selecionados artigos com informações referente a descoberta do gênero *Entamoeba*, identificação e métodos utilizados para diferenciar as espécies *E. histolytica* e *E. dispar*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O diagnóstico da amebíase tem sido tradicionalmente feito pela aplicação da coproscopia, que é incapaz de diferenciar a *E. histolytica* da *E. dispar*. A distinção entre as duas espécies vem sendo alvo de vários estudos, desde que Sargeant *et al.* (1978), demonstraram que a espécie patogênica e a não patogênica poderiam ser distinguidas individualmente usando eletroforese isoenzimática. Estimar a verdadeira prevalência da amebíase não é uma tarefa fácil, uma vez que, a maioria das pesquisas foram baseadas no resultado da coproscopia, limitando o entendimento da magnitude e epidemiologia desta infecção (Tanyuksel; Petri, 2003).

Em 1875, Feder Aleksandrovich Lösch, em São Petersburgo, na Rússia, encontrou amebas nas fezes de um fazendeiro que sofria de desintéria crônica. Ele fez a descrição microscópica da ameba patogênica que denominou de *Ameba coli* e demonstrou que produziam ulcerações e disenteria em cachorros. O paciente de São Petersburgo, foi o primeiro registro de morte por amebíase, com demonstração em sua necropsia de numerosas e extensas ulcerações na mucosa do cólon (Ackers, 2002).

O zoólogo alemão Fritz Schaudinn em 1903, renomeou o microorganismo de Lösch de *Entamoeba histolytica*. Ele morreu em 1906 aos 35 anos de idade por complicações secundárias a amebíase adquirida por autoinfecção. Schaudinn decidiu chamar *E. histolytica* por ser produtora de lise tecidual (Galindo, 2000).

Com base em observações clínicas e epidemiológicas e estudos experimentais em gatos, o parasitologista francês Emile Brumpt em 1925 apontou a existência de *E. histolytica* como um complexo de duas espécies morfologicamente iguais ao que ele chamou de *E. dysenteriae* causando a infecção sintomática e *E. dispar* encontrados em assintomáticos, porém essa abordagem foi inicialmente rejeitada pela comunidade científica internacional na época (Marín *et al.*, 2000; Reyes; León, 2002).

No início da década de 1970, começaram a acumular dados que sustentavam a hipótese de Brumpt da existência de duas espécies diferentes de *E. histolytica*, e em 1973 Martinez-Palomo demonstrou diferenças na aglutinação das amebas patogênicas e não patogênicas. (Huston; Petri, 1999; Ackers, 2002). Somente em 1978, após vários anos de pesquisa, pela primeira vez foi possível diferenciar por meio de estudos eletroforéticos de isoenzimas da hexoquinase do parasito, cepas de *E. histolytica* isoladas de pacientes com manifestações clínicas de amebíase e portadores



assintomáticos, confirmando a existência de duas espécies de amebas, uma vez que dois zimodemas distintos foram observados, permitindo diferenciar as cepas patogênicas e não patogênicas (Sargeant *et al.*, 1984; Nozaki *et al.*, 1990).

Os estudos evoluíram e diferenças bioquímicas, imunológicas e genéticas entre as duas cepas foram observadas. Tannich *et al.* (1989), demonstraram através da análise do DNA genômico espécies distintas geneticamente. Diamond e Clark (1993), confirmaram a hipótese de Brumpt de 1925, encontrando evidências de que existem duas espécies morfologicamente idênticas, uma patogênica e outra não patogênica, que correspondiam a *E. histolytica* e *E. dispar*, respectivamente. Finalmente, em 1997 a OMS aceitou essa hipótese por um comitê de especialistas, reunido na Cidade do México, formalizou esta nova definição e recomendou vários critérios para diferenciação entre as duas espécies (Who, 1997).

4. CONCLUSÃO

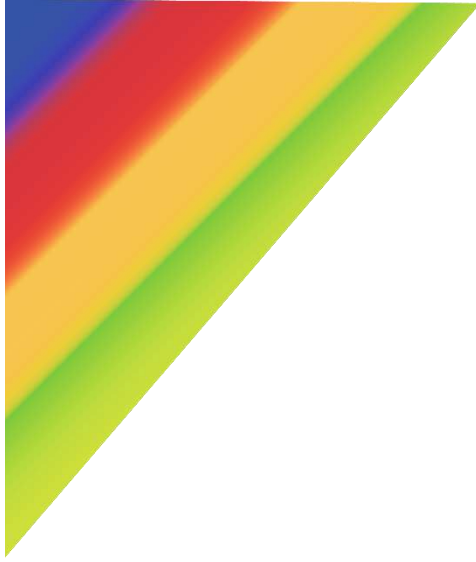
A microscopia tem uma sensibilidade de apenas 60% comparada com a cultura e análise isoenzimática, resultando em dados superestimados e tratamentos desnecessário para a doença. Diante da incapacidade da microscopia de distinguir entre as duas espécies, a OMS, recomenda que o resultado do exame parasitológico de fezes realizado deva ser registrado como *E. histolytica/E.dispar*. As duas espécies podem ser diferenciadas por métodos bioquímicos, imunológicos e de biologia molecular. Entre estes, os testes de detecção do antígeno têm sido aplicados em várias pesquisas mediante sua rapidez, precisão e viabilidade, sendo um instrumento para confirmar a infecção pela *E. histolytica*.

5. REFERÊNCIAS

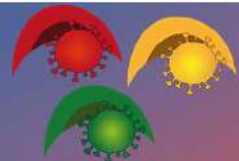
- ACKERS, J. P. The diagnostic implications of the separation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *J. Bioscience*, v. 27, n. 6, suppl. 3, 2002.
- BAXT, L. A.; SINGH, U. New insights into *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, v. 21 n. 5, p. 489–494, 2008.
- CLARK, C. G.; DIAMOND, L. S. *Entamoeba histolytica*: An explanation for the reported conversion of “nonpathogenic” amebae to the “pathogenic” from. *Exp. Parasitol.*, v. 77, p. 456-460, 1993.
- CLARK, C. G.; DIAMOND, L. S. The Laredo strain and other *Entamoeba histolytica*-like amoebae are *Entamoeba moshkovskii*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 46, p. 11–18, 1991.
- CORDEIRO, T. G. P; MACEDO, H. W. Amebíase. *Rev. Patologia Tropical*, v. 36, n. 2, p. 119-128, 2007.
- DIAMOND, L. S.; CLARK, C. G. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *JEukaryot Microbiol.*, v. 40 p. 340-344, 1993.
- GALINDO, L. F. *Amebiasis: enfoques actuales sobre su diagnóstico, tratamiento y control*. Ciudad de La Habana: Editorial Elfos Scientiae, 2000.
- HUSTON, C. D.; PETTRI, W. A. Amebiasis: Clinical Implications of the recognition of *Entamoeba dispar*. *Curr. Infect. Dis. Rep.*, v. 1, p. 441-447, 1999.
- MARÍN, E; PINILLA A. E; LÓPEZ, M. C. Absceso hepático amebiano. Revisión de 100 años de esta patología en Colombia. *Acta Med Colomb.*, v. 25 p. 218-26, 2000.



- NOZAKI, T.; ACA, I. D. A. S.; OKUZAWA, E.; MAGALHAES, M.; TATENO, S.; TAKEUCHI, T. Zymodemes of *Entamoeba histolytica* isolated in the Amazon and the northeast of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, v. 84, p. 387-388, 1990.
- REYES, L.; LEÓN, R. Diferenciación de *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* y los nuevos hallazgos en la patogénesis de la amibiasis intestinal. *Rev Costarric Cieñe Med.*, v. 23, p. 161-173, 2002.
- SARGEAUNT, P. G.; BAVEJA, U. K.; NANDA, R.; ANAND, B. S. Influence of geographical factors in the distribution of pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica*: identification of zymodeme XIV in India. *Trans RSoc Trop Med Hyg.*, v. 78 p. 96-101, 1984.
- SARGEAUNT, P.G.; WILLIAMS, J. E.; GRENE, J. D. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, v. 72, n. 5, p. 519-521, 1978.
- SINGH, A.; HOUP, E.; PETRI, W.A. Rapid diagnosis of intestinal protozoa, with focus on *Entamoeba histolytica*. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.*, p. 1-8, 2009.
- TANNICH, E.; HORSTMANN, R. D.; KNOBLOCH, J.; ARNOLD H.H. Genomic DNA differences between pathogenic and nopathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, v. 86, p. 5118-5122, 1989.
- TANYUKSELM, M; PETRI, W. A. Laboratory Diagnosis of Amebiasis. *Clin Microbiol Rev.*, v. 16, p. 713-29, 2003.
- WHO/PAHO/UNESCO Report. A consultation with experts on amoebiasis. Mexico City, Mexico 28-29 January 1997. *Epidemiol Bull.*, v. 18, p. 13-14, 1997.
- XIMÉNEZ, C.; CERRITOS, R.; ROJAS, L.; DOLABELLA, S.; MORÁN, P.; SHIBAYAMA, M.; SILVA, E. F. Human amebiasis: breaking the paradigm?. *Int. J. Environ. Res. Public Health.*, v. 7, n. 3, p. 1105–1120, 2010.



NUTRIÇÃO E SAÚDE



ÁREA DE SUBMISSÃO: Nutrição e Saúde

APLICAÇÃO DE “SEMÁFORO NUTRICIONAL” PARA AVALIAÇÃO DE ALIMENTOS INDUSTRIALIZADOS VOLTADOS AO PÚBLICO INFANTIL

R. R. de CARVALHO¹, M. G. P. ARAUJO¹ e M. M. B. de OLIVEIRA¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas;

E-mail para contato: mmbonutricao@gmail.com

RESUMO – *O alto consumo de alimentos industrializados podem contribuir para agravamento de índices de excesso de peso e obesidade da população mundial e desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). A rotulagem nutricional se apresenta como um instrumento para o consumidor quando escolhe alimentos, especialmente os industrializados. Há informações ainda não claras e objetivas, dando abertura a interpretações errôneas, falsas ou distantes do conteúdo total da embalagem. O trabalho objetivou avaliar, classificar alimentos industrializados para consumidor infantil. Foram coletadas informações nutricionais de 221 alimentos industrializados do público infantil e utilizados os valores para teores de sódio, gorduras totais, gordura saturada e fibras classificando-os segundo a tabela Traffic Light Labels da Food Standards Agency (FSA), do Reino Unido como alto, médio ou baixo teor, classificando-os dentro do sistema do “Semáforo Nutricional”, obtendo-se o percentual para cada grupo. Observou-se: maioria dos alimentos se enquadraram na faixa vermelha para nutrientes estudados, apenas grupos de produtos derivados de vegetais, frutas apresentou melhores classificações. O sistema abordado apresenta-se como método válido à classificar, alertar sobre alimentos que contribuem para desenvolvimento da obesidade infantil. Grupos de alimentos derivados de carboidratos, carnes, leite e açúcares, apresentaram maiores percentuais de alerta, se empregados no rótulo de alimentos seriam um alerta para o consumidor.*

Palavras-chave – *obesidade, rotulagem, alimentos*

ABSTRACT- *The high consumption of processed foods can contribute to the worsening of overweight and obesity rates in the world population and the Development of Chronic Non-communicable Diseases (DCNT). Nutritional labeling presents itself as an instrument for consumers when choosing foods, especially industrialized foods. . There is still unclear and objective information, opening up to misinterpretations, false or distant from the total contents of the package. The work aimed to evaluate, classify processed foods for infant consumers. Nutritional information was collected from 221 processed foods for children and the values for sodium, total fat, saturated fat and fiber were used, classifying them according to the Traffic Light Labels table of the Food Standards Agency (FSA), from the United Kingdom, as high, medium or low content, classifying them within the “Nutritional Traffic Light” system, obtaining*



the percentage for each group. It was observed: most foods fit in the red range for studied nutrients, only groups of products derived from vegetables, fruits had better classifications. The approached system presents itself as a valid method to classify, warn about foods that contribute to the development of obesity. Groups of foods derived from carbohydrates, meats, milk and sugars, had higher percentages of alert, if used on the food label would be an alert for the consumer.

Keywords – obesity, labeling, food.

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é considerada uma doença crônica, multifatorial, com componentes inflamatórios que se apresenta como um dos principais problemas de saúde pública e vem atingindo níveis alarmantes em escala mundial (CUPPARI, 2019). Segundo a ABESO (2012) no Brasil, a obesidade apresenta-se em escala crescente. Pesquisas populacionais recentes apontam que mais da metade da população brasileira está acima do peso, ou seja, na faixa de sobrepeso e obesidade (LOUZADA et al., 2015)

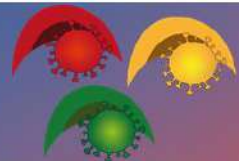
A prevalência da obesidade em crianças apresenta-se como um fator de risco para a morbimortalidade precoce e que pode afetar o desenvolvimento infantil adequado, trazendo repercussões a esses indivíduos na vida adulta. Ressalta-se que o excesso de peso na infância predispõe a várias complicações de saúde como: problemas respiratórios, articulares e cardiovasculares além de predispor a doenças como *diabetes mellitus*, hipertensão arterial, dislipidemias, elevando assim o risco de mortalidade na vida adulta (ABRANTES et al., 2002).

Uma das principais causas da obesidade é o consumo de alimentos ultraprocessados, ou seja, que sofrem industrialização com ingredientes de baixa qualidade nutricional. Geralmente produtos ultraprocessados contém alta densidade energética, e apresentam na sua composição altos teores de gorduras totais e saturadas além de baixas concentrações de fibras e altas de sódio e açúcares simples, em comparação com alimentos que sofrem processamentos mais amenos (MARTINS E MOUBARAC, 2013).

Para tanto, o rótulo dos alimentos se apresenta um importante instrumento para o consumidor no momento da escolha dos alimentos que irão compor sua dieta habitual e tem como função principal fornecer as informações sobre o produto desde a sua origem e ingredientes utilizados na formulação até as informações dos nutrientes que este possui (STELLA, 2008). Ferramentas que auxiliem o consumidor na escolha precisa do alimento processado ainda são escassas e nem sempre aplicadas pelos órgãos regulamentadores, como indicadores nutricionais relacionados a riscos a saúde que poderiam ser destacados na informação nutricional.

Assim, o “Semáforo Nutricional” apresenta-se como uma proposta que relaciona o teor de determinados nutrientes que afetam diretamente a saúde (gordura total, gordura saturada, açúcar, sódio) a valores de 100g do alimento, classificando-os em níveis de alerta, o que permite ao consumidor identificar com mais clareza a contribuição que o teor de uma embalagem completa do alimento pode trazer de benefícios ou malefícios a saúde (FSA, 2013). É baseado nas cores verde, amarelo e vermelho, auxiliando na análise destrinchada de concentração de gorduras totais, gorduras saturadas, açúcares e sal, correspondente a 100 g ou 100 mL de cada produto (LONGO-SILVA; TOLONI; TADEI, 2010).

Portanto, este estudo teve como objetivo analisar a rotulagem de alimentos industrializados ultraprocessados voltado ao público infantil, a partir da informação nutricional, classificando-os quanto ao “Semáforo Nutricional” traçando assim um perfil nutricional destes alimentos.



2. MATERIAIS E MÉTODOS

Estudo do tipo transversal e descritivo realizado no período de outubro a novembro de 2017. As informações foram coletadas em produtos selecionados em hipermercados na região metropolitana do Recife-PE.

2.1 MATERIAL DE ESTUDO

O material de estudo constituiu-se de alimentos processados e ultraprocessados direcionados ao público infantil, escolhidos de acordo com características relacionadas a esse público (ilustrações, propagandas etc.). Os produtos foram classificados de acordo com os alimentos que fazem parte dos grupos da pirâmide alimentar brasileira, em que o (n) foi maior para os grupos que representam alimentos mais consumidos por crianças de acordo com a Pesquisa de Orçamento Familiar (POF 2008-2009), totalizando universo de 221 produtos. Foram excluídos da pesquisa os alimentos não necessitam de rotulagem obrigatória (BRASIL, 2002)

Os alimentos estudados foram divididos de acordo com os grupos de alimentos na Pirâmide Alimentar Brasileira (PHILIPPI et. al., 1999) e também representados na RDC 359/2003- ANVISA que descreve os grupos de alimentos com seus respectivos representantes (Quadro 1).

Quadro 1. Caracterização do material de estudo para conformidade para rotulagem obrigatória, densidade energética e por porção de sódio, gordura total e saturada e teor de fibras por porção (n=221).

Grupos de alimentos	Caracterização do grupo	N	Alimentos industrializados pesquisados
I	Produtos de panificação, cereais, leguminosas, raízes, tubérculos e seus derivados	38	Pães embalados, pão tipo bisnaguinha, biscoito de leite, biscoito amanteigado, biscoito recheado, bolachas tipo lanche, macarrão instantâneo, cereal matinal, barra de cereal, farinha láctea, massas para pastel, pipocas, pós para preparo de bolos e similares.
II	Verduras, hortaliças, e conservas vegetais	87	Sucos de frutas com soja, vegetais em conserva
III	Frutas, sucos, néctares e refrescos de frutas	114	Polpa de frutas, sucos concentrados, néctar, suco pronto para beber, uvas passas e frutas em conserva
IV	Leite e derivados	330	Leite fermentado, iogurte, bebida láctea, leite em pó, fórmula láctea em pó, queijo ralado, queijos, requeijão, pós para preparo de sorvete
V	Carnes e ovos	223	Atum/sardinha em conserva, charque, hambúrguer, lingüiça, salsicha, espetinhos, nuggets, empanado de frango, presunto, peito de peru
VI	Óleos, gorduras e sementes oleaginosas	219	Óleos vegetais, maionese, manteiga, margarina, chantilly, creme de leite, leite de coco, coco ralado, amendoim
VII	Açúcares e produtos que fornecem energia provenientes de carboidratos e gorduras	558	Açúcares do tipo: mascavo, cristal, orgânico, refinado. Achocolatado em pó, pós a base de cacau, geléias, mel, leite condensado, cobertura para sorvete. Produtos considerados de consumo ocasional: balas, pirulitos, pastilhas, goma de mascar, chocolates, sorvetes individuais, sorvetes, chás prontos, refrigerantes, pós para preparo de refresco, panettones, bolos com recheio, snacks a base de cereal (salgadinhos)
VIII	Molhos, temperos prontos e caldos	116	Catchup, mostarda, molhos a base de soja, molhos a base de produtos lácteos, pós para preparo de molhos

Todas as embalagens foram fotografadas em todos os ângulos (frente, verso e laterais) permitindo a criação de banco de dados.

Foram selecionadas 03 marcas de cada produto avaliado dentro de cada grupo de estudo para coleta das informações da quantidade de sódio, gorduras totais, gorduras saturadas e fibras por porção.

2.2 ANÁLISE DA PROPORÇÃO DE GORDURA TOTAL, GORDURA SATURADA, SÓDIO E FIBRAS

O conteúdo de sódio, gordura total e gordura saturada contidos na informação nutricional para porção foram transformados para 100g ou 100 mL dos alimentos estudados. Os resultados foram comparados de acordo com os pontos de corte da tabela *Traffic Light Labels* da *Food Standards Agency (FSA)*, como alto, médio ou baixo, para se gerar uma classificação dos seguindo as cores do “Semáforo Nutricional” (MARTINS, 2012).

Para avaliação de fibras nos rótulos presentes foi adotada a Resolução - RDC nº 360, de 23 de setembro de 2003 – ANVISA, de acordo como o VD% recomendado para fibras, gerando pontos de corte para alto, médio e baixo nível. Adaptou-se a regra de classificação dos alimentos analisados segundo o preconizado pela legislação brasileira e de acordo com LONGO-SILVA; TOLONI; TADEI (2010) (Tabela 1).

Tabela 1: Adaptação do Semáforo Nutricional as normas brasileiras vigentes para classificação de alimentos industrializados processados e ultraprocessados voltados ao público infantil.

Nutrientes	VERDE		AMARELO		VERMELHO	
	Sólido	Líquido	Sólido	Líquido	Sólido	Líquido
Gorduras	≤3,0	≤1,5	>3,0 e ≤20,0	>1,50 e ≤10,0	>20,0	>10,0
Totais						
Gordura	0,1	0,05	>0,1 e ≤1,0	>0,05≤1,0	>1,0	>1,0
Trans						
Gordura	≤1,5	≤0,75	>1,5 e ≤5	>0,75 e ≤2,50	>5,0	>2,5
Saturada						
Sódio	≤40,0	≤40,0	>40 e ≥120	>40 e ≥120	>120,00	>120
Fibras	≥6,0	≥3,00	≥3e <6	≥1,50 e <3,0	<3,0	<1,5

Fonte: (BRASIL, 2012); FOOD STANDARDS AGENCY (2007); (LONGO-SILVA; TOLONI; TADEI, 2010).

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação dos valores de gordura total, gordura saturada, sódio e fibras presentes em produtos alimentícios industrializados voltados ao público infantil

Ao avaliar todos os alimentos (n=221), de acordo com os parâmetros propostos para Gorduras Totais (GT) e gorduras saturadas (GS), foi possível observar isoladamente a performance de cada grupo alimentar de acordo com o número de produtos alimentares coletados (Figura 1).

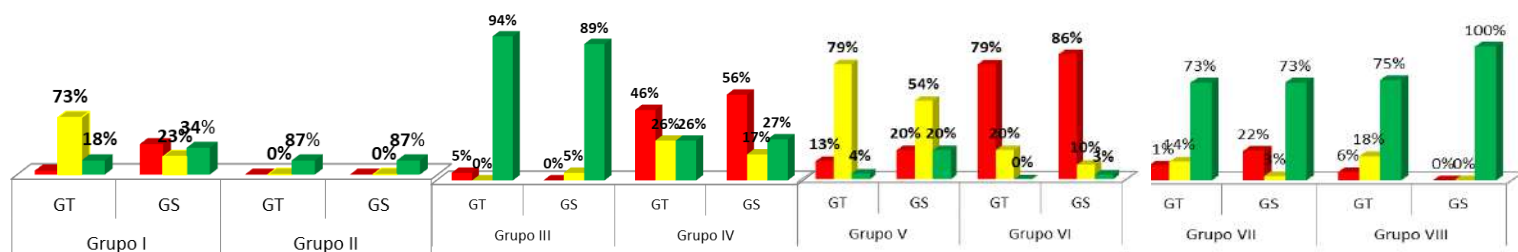


Figura 1- Semáforo Nutricional aplicado a gordura total (GT) e gordura saturada (GS) para alimentos processados e ultraprocessados destinados ao público infantil segundo grupos de alimentos (Grupo I, II, III, IV, V, VI, VII e VIII) (n=221).

Legenda: Percentual de alimentos dos Grupos I (n=38), II (n=7), III (n=14), IV (n=30), V (n=23), VI (n=19), VII (n=58) e VIII (n=16) classificados frente ao sistema de “Semáforo Nutricional” **Fonte:** Dados da pesquisa.

A predominância da cor verde foi observada para os grupos II, III, VII e VIII. Os grupos II e III são representados por derivados de vegetais e frutas e assim justifica-se a classificação já que estes alimentos são pobres em gorduras. Os grupos VII e VIII aparecem também com cor verde por possuírem pouca gordura originalmente em sua composição (açúcares e doces; molhos e temperos respectivamente).

O grupo I apresentou valor expressivo de produtos classificados na cor amarela, 66% (n=38), representado por alimentos, tais como, biscoitos de leite, biscoito recheado, biscoito amanteigado, macarrão instantâneo e massas para pastel. Silva, Latini e Teixeira (2017) ao analisar alimentos industrializados consumidos pelo público infantil baseado no Semáforo Nutricional, constatou que os tipos de alimentos com pior composição nutricional foram: macarrões instantâneos e biscoitos recheados, obtendo classificação vermelha em quatro a cinco tipo de nutrientes. O mesmo foi observado para o grupo V, carnes e derivados, que possuem em sua natureza composição de gorduras de valor mais expressivo, especialmente as saturadas.

O grupo IV e VI apresentaram alto valor de gordura total e saturada, classificados com cor vermelha. O IV é representando por leite e derivados, e o grupo VI representados por óleos vegetais e gorduras, produtos naturalmente fontes de gorduras.

A quantidade de produtos ultraprocessados analisados neste estudo, que apresentou concentrações elevadas de gordura saturada, condiz com Dumke, Chalemborguer e Bannetti, (2016) no que relaciona que há presença significativa de gordura trans e saturadas em alimentos processados. Um estudo realizado para avaliar o excesso de consumo de lipídios na dieta de pré-escolares mostrou associações a uma tendência ao excesso de peso nesses grupos (VALENTE; HECKTHEUER, BRASIL, 2010).

O consumo de gorduras saturadas estabelece funções estruturais ao organismo, por isso seu consumo não deve ser abolido, contudo, o consumo excessivo de ácidos graxos saturados acarreta em riscos ao organismo, com elevação do LDL-c plasmático e da concentração plasmática de colesterol total, levando a uma maior exposição a riscos cardiovasculares (LONGO-SILVA; LATINI; TEIXEIRA, 2017b).

Quando avaliado o teor de sódio, os grupos que se apresentaram classificados para a cor vermelha foram o I, V e VIII. Destaca-se o grupo VIII correspondente aos molhos, temperos prontos, caldos, sopas e pratos preparados, em que todos os produtos analisados foram classificados como contendo concentrações altas de sódio na sua composição. No grupo V (carnes e derivados)



a maioria dos produtos avaliados também apresentaram concentrações altas de sódio (Figura 2), bem como altas concentrações de GT e GS.

O grupo I também se apresentou valores elevados, devido as características inerentes aos produtos alimentícios, tais como, macarrões instantâneos, biscoitos, pipoca, bolachas além dos pães embalados.

Outro fator alarmante é a concentração de sódio presentes nesses alimentos, em que a classificação vermelha esteve presente em todos os grupos analisados, exceto no grupo III. O consumo de sódio é um dos fatores determinantes dos níveis de pressão arterial para indivíduos. As recomendações para a ingestão de sal segundo a OMS e a FAO, é de 5 g de sal/dia, correspondente a uma dieta de 2000 mg sódio/dia (MARTINS,2012). No presente estudo algumas categorias de alimentos apresentaram alto teor de sódio, excedendo as recomendações (g/dia).

Crianças e adolescentes portadoras de hipertensão primária estão aumentando frequentemente, fruto de uma dieta de alta densidade energética que acarreta na obesidade, fator predominante para hipertensão, associado a uma dieta hipersódica (CORDEIRO et al .,2017)

Os grupos I e III foram classificados com cor verde por apresentarem os maiores percentuais de produtos dentro do parâmetro de avaliação de fibras seguindo o semáforo nutricional, 78% e 68% respectivamente. Os demais grupos apresentaram percentuais pequenos de alimentos com fibras na sua composição. Já o grupo VII não apresentou nenhum alimento com fibras na composição, o que é bastante expressivo, pois é o grupo formado por muitos alimentos que são os mais consumidos por crianças e adolescentes segundo dados da POF (2008-2009).

AS DCNT são prevenidas pela redução do consumo de carboidratos simples e gordura saturada e o aumento do consumo de fibras (SCHIMALTZ, 2012). Os estudos têm demonstrado a associação positiva das fibras contra doenças cardiovasculares e redução no aparecimento de doenças como câncer de colón e reto, câncer de mama, diabetes, doença de Crohn e doença de ventricular, patologias crônicas comumente apresentadas por idosos (LOPES et al., 2017).

As tendências alimentares infantis conduzem ao consumo de alimentos com baixo valor nutricional com quantidade elevadas de gorduras e com baixo teor de fibra (MELO et al.,2010). Conforme observado no grupo VII, o qual representa alimentos mais consumidos por crianças, dos 58 alimentos analisados, nenhum apresentou qualquer teor de fibras. O declínio da saúde infantil está associado a uma alimentação inadequada, ao consumo de alimentos com características de baixo valor nutricional encontrados majoritariamente em alimentos que passaram por algum tipo de processamento, e todos os fatores em conjunto contemplam associações a problemas de saúde que irão perpetuar na vida do indivíduo.

Longo-Silva Latini e Texeira (2017c) enfatizam em seu estudo a necessidade das informações nutricionais atuais na maioria dos rótulos dos produtos industrializados não fazem distinção entre as necessidades nutricionais para crianças e adultos, que facilitaria a compreensão do consumidor ao avaliar a informação nutricional.

4. CONCLUSÃO

O rotulo dos alimentos é uma ferramenta muito útil para a informação do conteúdo dos produtos ofertados no mercado alimentício, especialmente sobre as características nutricionais do alimento, porém ainda de difícil interpretação.

O semáforo nutricional aponta como um instrumento que pode auxiliar na escolha mais consciente se inserido como sinalização em rotulagem nutricional de alimentos e bebidas industrializados e embalados. As cores indicaram que dentro dos grupos de alimentos analisados,



da presença de altas concentrações de gorduras, gordura saturada, sódio e que são pobres em fibras alimentares, especialmente para o Grupo I, II, IV, V e VI, para gordura total e saturada. O grupo I e V ainda apresentaram os maiores níveis de teores de sódio na composição dos alimentos, porém o grupo I assim como o III apresentaram os maiores valores para fibras.

Conclui-se que a maioria dos alimentos industrializados analisados se enquadraram em algum padrão considerado prejudicial à saúde. Os sistemas de alerta para presença de componentes que possam afetar a saúde humana, em especial de crianças, devem ser considerados e implementados pelas agências reguladoras de saúde.

5. REFERÊNCIAS

ABESO. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. OMS: Obesidade mata 2,8 milhões por ano. 2012. Disponível em: <http://www.abeso.org.br/oms-obesidade-mata-28-milhoes-por-ano/> Acesso em: outubro, 2017.

ABRANTES, M. M.; LAMOUNIER, J. A.; COLOSIMO, E.A. Prevalência de sobrepeso e obesidade em crianças e adolescentes das regiões Sudeste e Nordeste. **J pediatr**, v. 78, n. 4, p. 335-40, 2002.

BRASIL. Resolução – RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002. Regulamento Técnico para rotulagem de alimentos embalados. Brasil: Anvisa, 2002. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_259_2002.pdf/e40c2ebc-6be-4a3d-83ad-f3cf7c332ae2 Acessado em: outubro de 2017.

BRASIL. Resolução – RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para fins de Rotulagem Nutricional. Brasil: Anvisa, 2003. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0359_23_12_2003.pdf/7666765-a107-40d9-bb34-5f05ae897bf3 Acessado em: outubro de 2017.

BRASIL. Resolução – RDC nº 360, de 20 de dezembro de 2003. Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados. Brasil: Anvisa, 2003. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0360_23_12_2003.pdf/5d4fc713-9c66-4512-b3c1-afee57e7d9bc Acessado em: outubro de 2017.

CORDEIRO, Magliane Borges Lucero et al. Fatores de risco associados à hipertensão arterial primária em crianças e adolescentes: revisão bibliográfica. **Revista Recien-Revista Científica de Enfermagem**, v. 7, n. 19, p. 39- 48, 2017.

CUPPARI, L. **Nutrição clínica do adulto**. 4ªed. Barueri (SP): Manole, 2019.

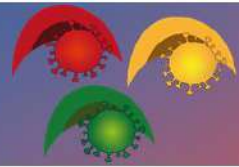
DUMKE, E; SCHALEMBERGUER, J.T. S; BENEDETTI, F. J. Consumo e análise de gorduras totais de alimentos ultraprocessados ingeridos por pré- escolares. **Disciplinarum Scientia Saúde**, v. 16, n. 1, p. 89-99, 2016.

LONGO-SILVA, G; TOLONI, M.H.A; TADDEI, J.A..A.C. Traffic light labelling: traduzindo a rotulagem de alimentos. **Revista de Nutrição**, 2010.

LONGO-SILVA, G et al. Age at introduction of ultra-processed food among preschool children attending day-care centers. **Jornal de Pediatria**, 2017.

LOPES, Joice Ferreira et al. Avaliação da quantidade de fibras ofertado no cardápio de uma instituição de longa permanência para Idosos. **Revista Saúde UniToledo**, v.1, n. 2, 2017.

LOUZADA, M. L.C. et al. Alimentos ultraprocessados e perfil nutricional da dieta no Brasil. **Rev Saúde Pública**, v. 49, n. 38, p. 1-11, 2015.



MARTINS, A.C. **Informação alimentar e nutricional de sódio em rótulos de alimentos ultraprocessados prontos e semiprontos para o consumo, comercializados no Brasil** [Dissertação de Mestrado]. Florianópolis (SC): Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

MELLO, Carolina Santos et al. Consumo de fibra alimentar por crianças e adolescentes com constipação crônica: influência da mãe ou cuidadora e relação com excesso de peso. **Rev. Paul. Pediatr.**, v. 28, n. 2, p. 188-93, 2010.

PHILIPPI, S. T.; et al. Pirâmide Alimentar Adaptada: guia para escolha dos alimentos. *Rer. Nut.*, Campinas, v. 12, nº1, p.65-80, jan./abr., 1999.

POF. **Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil/ IBGE**, Coordenação de Trabalho e Rendimento. Rio de Janeiro: IBGE, 2011. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv50063.pdf> Acessado: novembro de 2017.

SCHMALTZ, L. C.R.M. Avaliação do consumo alimentar de idosos institucionalizados da cidade de Paracatu, MG. **Revista Augustus**, v. 16, n. 32, 2012.

SILVA, F.S.V ; LATINI, Juliana Pacheco Tomaz; TEIXEIRA, Michelle Teixeira. Análise da rotulagem de alimentos industrializados destinados ao público infantil à luz da proposta de semáforo nutricional. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 5, n. 1, p. 36-44, 2017.

STELLA, R. H. **Densidade energética: relação com variáveis demográficas, de estilo de vida, nutricionais e socioeconômicas em amostra representativa da população adulta do município de São Paulo**. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

VALENTE, T. B; HECKTHEUER, L.H.R; BRASIL, C. C. B. Condições socioeconômicas, consumo alimentar e estado nutricional de pré-escolares pertencentes a uma creche Socioeconomic conditions, food intake and nutritional status of preschool children belonging to a day care center. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 21, n. 3, p. 421-428, 2010.

6. AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pernambuco, ao Centro de Ciências da Saúde e ao Departamento de Ciências Farmacêuticas pelo apoio ao desenvolvimento da pesquisa.

ÁREA DE SUBMISSÃO: Nutrição e Saúde

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DE ALIMENTOS PARA CONTROLE DE PESO (TIPO SHAKE) FRENTE AS LEGISLAÇÕES ATUAIS

R. R. de CARVALHO¹, M. M. B. de OLIVEIRA¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Farmacêuticas;

E-mail para contato: renata.rodrigues0@yahoo.com.br

E-mail para contato: mmbnutricao@gmail.com

RESUMO – *Os alimentos para controle de peso são produtos industrializados a fim de suprir as necessidades nutricionais do indivíduo e destinadas a propiciar redução, manutenção ou ganho de peso corporal. Podem ser classificados em alimentos para redução ou manutenção de peso por substituição parcial das refeições ou para ganho de peso por acréscimo às refeições e ainda em alimentos para redução de peso por substituição total das refeições. No entanto, os alimentos para controle de peso são isentos de registro e estão disponíveis em mercados, drogarias e academias sem restrições ao seu acesso e o marketing relacionado a esses produtos tem sido bem favorável para os indivíduos que buscam mudança por conta própria. Foram avaliados 14 produtos comercializados em 26 farmácias comerciais na região metropolitana do Recife (PE) no ano de 2018. Foi avaliada a composição nutricional desses produtos segundo legislações pertinentes a rotulagem desse grupo de alimentos através de um instrumento de coleta de dados. Evidenciaram-se inconsistências sobre a composição nutricional obrigatória para estes produtos. Como exemplo, os produtos 1, 6, 9, 11, 12,13 e 14 apresentaram o maior número de não conformidades quanto a qualidade nutricional expressa. Logo, ressalta-se a importância da avaliação para inclusão de registro desses produtos uma vez que ao substituir uma refeição não necessariamente estará adquirindo os nutrientes adequados, o que configura direito lesado do consumidor.*

Palavras-chave: controle, comida, peso.

ABSTRACT- *Weight control foods are industrialized products in order to meet the individual's nutritional needs and are designed to reduce, maintain or gain body weight. They can be classified into food for weight reduction or maintenance by partial replacement of meals or for weight gain by adding to meals and also in food for weight reduction by total replacement of meals. However, weight control foods are exempt from registration and are available in markets, drugstores and gyms with no restrictions on their access, and the marketing related to these products has been very favorable for individuals seeking change on their own. 14 products marketed in 26 commercial pharmacies in the metropolitan region of Recife (PE) were evaluated in 2018. The nutritional composition of these products was evaluated according to relevant legislation and the labeling of this group of foods through a data collection instrument. There were inconsistencies about the mandatory nutritional composition for these products. As an example, products 1, 6, 9, 11, 12,13 and 14 showed the highest number of non-conformities in terms of the expressed nutritional quality. Therefore, the importance of the evaluation for the inclusion of registration of*



these products is emphasized, since when replacing a meal, you will not necessarily be acquiring the appropriate nutrients, which constitutes the consumer's injured right.

Keywords: control, food, weight

1. INTRODUÇÃO

A busca pelo corpo perfeito e a endemia da obesidade tem propiciado o surgimento cada vez maior de alimentos e produtos alimentícios que favoreçam o processo de emagrecimento ou aceleração na performance física. Nesse contexto, os Alimentos para Controle de Peso (ACPs) despertam o interesse crescente de indivíduos que estão no processo de incorporação de dietas alimentares de restrição e buscam uma fonte energética completa e de fácil manipulação e consumo. Esses alimentos são formulados e elaborados para apresentar composição definida e adequada para suprir parcialmente as necessidades nutricionais do indivíduo e que sejam destinados a propiciar redução, manutenção ou ganho de peso corporal, segundo a única legislação vigente, Portaria nº 30, de 13 de Janeiro de 1998 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 1998).

Existe um estímulo mercadológico ao consumo desses alimentos especialmente vinculados à obtenção de um “corpo ideal” (RUSSO, 2005), emagrecimento rápido e melhoria na performance física quando associados à prática de atividade física o que pode resultar em estratégias equivocadas de consumo. Por se tratarem de produtos alimentícios, a aquisição sem controle efetivo desses produtos pelos consumidores nos estabelecimentos de venda, pode ser outro fator agravante. Supermercados, drogarias, casas que fornecem produtos naturais /esportivos e até mesmo em academias de ginástica, esses estão dispostos em gôndolas ou prateleiras estimulando o consumo e consequente administração por conta própria (DE ALMEIDA ET AL, 2016).

Os ACPs são classificados de acordo com a única legislação brasileira vigente em: 1) Alimentos para Redução ou manutenção de Peso por Substituição Parcial das Refeições ou para Ganho de peso por Acréscimo às Refeições; e 2) Alimentos para Redução de Peso por Substituição Total das refeições. No primeiro grupo, os que se destinam à redução de peso podem substituir até duas refeições da dieta diária, já os que se destinam à manutenção, podem substituir uma refeição diária. Quando destinados ao ganho de peso, até duas porções do alimento podem ser acrescentadas à dieta convencional diária. No segundo grupo, encontram-se os alimentos especialmente formulados e elaborados de forma a apresentarem composição definida, cujo consumo se destina a substituição total das refeições, com a finalidade de redução de peso corporal (BRASIL, 1998).

O uso adequado de Alimentos para Controle de Peso deve estar associado a comprovação científica prevista pela ANVISA, ou seja, estar adequada a composição química e nutricional previstas pela legislação e com ingredientes que não tragam malefícios a saúde, sendo a rotulagem deste produto o instrumento adequado para que o consumidor avalie e permita fazer escolhas adequadas (BRASIL, 2002). Portanto, esse trabalho tem como objetivo avaliar o nível de conformidade da composição nutricional para Alimentos para Controle de Peso frente as legislações brasileiras ainda vigentes.

A comercialização de produtos isentos de registro voltados ao controle de peso, visa a substituição de refeições sem o dimensionamento da contribuição nutricional que estes alimentos podem trazer a saúde do indivíduo. Através do órgão fiscalizador, é necessário traçar o perfil das marcas vinculadas especialmente no ambiente de drogarias. Sendo este, o local de maior acesso a essa categoria de produtos, uma vez que há a presença do profissional de saúde mais próximo a



população, o farmacêutico, que poderá orientar de forma mais apropriada o consumidor pretendente a este tipo de produto.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 LOCAL DE ESTUDO

A pesquisa foi realizada em visitas observacionais para registro fotográfico das embalagens do material de estudo em estabelecimentos comerciais da cidade do Recife-PE no ano de 2018.

A amostragem foi do tipo aleatória intencional. A visita para coleta de dados ocorreu em horário comercial, das 8:00 as 17:00h. A amostragem constou de n=26 estabelecimentos comerciais contemplando drogarias.

2.2 MATERIAL DE ESTUDO

O material de estudo foi composto por “Alimentos para Controle do Peso” segundo definição que consta na Portaria nº30 de 13 de janeiro de 1998 da ANVISA.

Como critério de inclusão, os produtos deveriam ser industrializados, embalados e estarem expostos para compra em gôndolas/prateleiras de livre acesso aos consumidores. Para este trabalho foram analisados os que se apresentaram na forma de pó para preparo de bebida popularmente conhecido como “shake” e que apresentou a denominação para redução/perda de peso.

A quantidade de produtos analisados se deu pela oferta no mercado comercial em número de marcas diferentes e de composição diferentes de uma mesma marca mediante o que foi encontrado durante as visitas para coleta de dados totalizando n=14.

2.3 ANÁLISE DA ROTULAGEM: INFORMAÇÃO NUTRICIONAL

A coleta de dados se deu em visitas as unidades para registro fotográfico das embalagens dos produtos comercializados. As embalagens foram fotografadas em todos os seus ângulos a fim de elaborar um banco de dados com os registros fotográficos para coleta de dados das informações contidas nas embalagens. Foram coletadas informações sobre rotulagem obrigatória quanto a Composição nutricional para os componentes: proteína, lipídeos totais, micronutrientes, além da composição dos ingredientes, a fim de avaliar a qualidade das fontes utilizadas.

Foram avaliados os percentuais de conformidade da adequação desses produtos frente a legislação específica para este produto.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os APCs foram verificados em 26 drogarias de grande, médio e pequeno porte da região metropolitana do Recife. Foram coletados dados de 14 produtos com variedade de 06 marcas entre eles. Todos os produtos foram classificados em alimentos para controle de peso por substituição parcial das refeições para perda de peso.

Os valores entre eles variaram de R\$ 14,00 até R\$ 40,00 reais do menor valor para o maior encontrado, respectivamente. Também houve variação de quantidade de porções oferecidas por cada produto para dietas que podem durar 7 dias com 210 g até dietas de 30 dias com 900 g. Houve um produto com o total de 280g que define suas porções para consumo através de sachês com 40 g cada.

Todos os produtos apresentam 35 g como valor médio da porção informada na tabela de informação nutricional. Excetuando-se 02 produtos, 12 deles mencionam a preparação com 300 ml de leite desnatado para consumo.

3.1 Avaliação da composição nutricional obrigatória para alimentos para controle de peso

De acordo com a Portaria nº 30, de 13 de janeiro de 1998, foi possível analisar a porcentagem quanto à sua conformidade e não conformidade quanto a composição nutricional obrigatória.

Como todos os ACPs analisados nesse estudo foram Alimentos para Redução de Peso por Substituição Parcial das Refeições, a energia fornecida pelo alimento não deve ser inferior a 200 kcal nem exceder a 400 kcal.

Quanto aos macronutrientes exige-se que as proteínas presentes devem fornecer no mínimo 25% e no máximo 50% do valor energético total desses alimentos e a ingestão total diária de proteínas não deve exceder a 125g. A energia fornecida pelos lipídios deve ser no máximo de 30% do valor energético total do alimento, incluindo o mínimo de 3% da energia proveniente dos lipídios derivados do ácido linoleico. Quanto aos micronutrientes quando na porção utilizada para substituição de uma refeição, devem conter no mínimo 33% da quantidade de vitaminas e minerais constantes em tabela anexa da própria legislação.

Os ACPs devem ser elaborados com elementos constituintes de proteínas de origem animal e/ou vegetal de alto valor biológico e com outros ingredientes apropriados para o consumo humano. É permitida a utilização de aditivos intencionais e coadjuvantes de tecnologia nos mesmos limites previstos para os alimentos convencionais similares, desde que não venham a alterar a finalidade a que o alimento se propõe.

Os produtos avaliados se caracterizaram por apresentar porção média de 34,5g (intervalo de 30g-58g), com conteúdo energético variando de 100-200 Kcal/porção (X=113 kcal/porção), teor proteico médio de 6,0g proteína/porção, conteúdo de gorduras totais de 0,9 g de lipídeos/porção com contribuição energética média de 8,1 Kcal/ porção, e nenhum dos produtos apresentou referencia a contribuição energética proveniente de ácido graxo linoleico, que é obrigatória ser de 3% das calorias provenientes dos lipídeos.

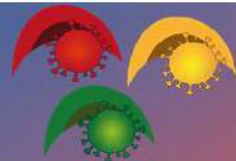
Segundo a Tabela 1, foram encontradas não conformidades quanto ao conteúdo energético para a porção em que a maioria se encontrava abaixo do preconizado (n=12) e para a contribuição do valor energético proveniente de proteínas, em que metade dos produtos apresentaram valor energético inferior ao mínimo preconizado que é de que 20% do valor energético total ser proveniente de proteínas.

Tabela 1. Percentual de não conformidade em relação as informações nutricionais contidas em rótulos de alimentos para controle de peso para valor energético e macronutrientes (n=14) (Fonte: Autor).

INFORMAÇÕES NUTRICIONAIS DE MACRONUTRIENTES	NÃO CONFORMIDADE (%)	PRODUTOS
Energia	86	1,3,4,6,6,8,9,10,11,12,13,14
*Proteínas	50	1,2,7,8,9,11,14
Ingestão diária máxima de proteínas	0	-
**Gordura total	0	-
***Ácido linoleico	100	Todos os produtos

*Contribuição energética por porção de 20-50% do Valor energético da porção; ** até 30% do Valor energético da porção;

***3% do valor energético proveniente das gorduras totais.



Apenas os critérios de ingestão diária máxima de proteínas e contribuição energética proveniente de lipídeos estiveram de acordo com a legislação. Com relação a energia fornecida pelos lipídios, é requerido o mínimo de 3% da energia proveniente dos lipídios derivados do ácido linoleico contido, todos os produtos analisados apresentaram não conformidade para com a legislação porque não apresentaram o percentual de valores diários na tabela de informação nutricional. Para se verificar se haveria presença de alguma possível fonte de lipídeos nas matrizes estudadas, foram analisadas as listas de ingredientes dos produtos. Pôde-se verificar a presença de fontes de gordura como gordura vegetal (n=1, produto 2), óleo de girassol (n=5, produtos 3,4,6,12 e13) e óleo de palma (n=1, produto 2) como fonte de ácido graxo em apenas 06 dos produtos investigados, os demais não citaram qualquer fonte. O prejuízo decorrente neste caso é de que o consumidor ao consumir um produto com a finalidade de substituir uma refeição acredita estar ingerindo um alimento completo e balanceado mesmo que este tenha como objetivo a redução de peso, e neste caso nenhum destes fornece fonte adequada deste ácido graxo poli-insaturado essencial que deve ser consumido a partir da alimentação, nem a quantidade mínima preconizada. Esses ácidos graxos possuem a capacidade de aumentar a lipólise, elevando a oxidação de ácidos graxos, tanto no músculo esquelético quanto no tecido adiposo (SILVEIRA et al., 2011).

Ao analisar as vitaminas que devem possuir no mínimo de 33% dos valores preconizados pela legislação por porção verificou-se que das doze vitaminas obrigatórias apenas 7 apresentavam conformidade quanto a este requisito para todos os produtos avaliados: Vitamina D, Ácido Patotênico, Vitamina B12, Vitamina C, Vitamina E, Biotina e Ácido Fólico. As demais vitaminas apresentaram não conformidade em pelo menos um produtos, com destaque para a Niacina que apresentou 5 produtos com valores abaixo do preconizado (Tabela 2).

Tabela 2. Percentual de não conformidade em relação as informações nutricionais contidas em rótulos de alimentos para controle de peso para micronutrientes (n=14) (Fonte: Autor).

MICRONUTRIENTES	NÃO CONFORMIDADE (%)	PRODUTOS
VITAMINAS		
Vitamina A	7,0	10
Vitamina B1	28,6	1,9,11,14
Vitamina B2	28,6	1,9,11,14
Niacina	35,7	1,5,9,11,14
Vitamina B6	21,4	6,12,13
MINERAIS		
Cálcio	42,8	1,7,8,9,11,14
Fosforo	50	1,2,7,8,9,11,14
Magnésio	57	1,6,9,10,11,12,13,14
Ferro	28,6	3,6,10,13
Zinco	35,7	1,9,10,11,14
Cobre	50	1,6,9,11,12,13,14
Iodo	21,4	6,12,13
Selenio	21,4	6,12,13
Potássio	42,8	1,2,7,8,9,11,14
Sódio	78,6	1,3,4,6,7,9,10,11,12,13,14



Ao analisar o teor presente dos minerais na rotulagem dos APC's em questão, observou-se apenas o mineral selênio apresentou conformidade para todos os produtos avaliados. Os demais ao menos 1 produto apresentava uma não conformidade, destacando-se o Fósforo, Magnésio, Cobre, Potássio e Sódio com os maiores números de não conformidades. Todos os minerais assim classificados apresentaram o teor abaixo do mínimo necessário para a porção preconizada pela legislação e muitos produtos apresentavam informações que chamavam a atenção para o conteúdo de vitaminas e minerais.

A baixa ingestão de vitaminas e minerais está envolvida em processos metabólicos e endócrinos importantes no que diz respeito à gênese e controle do excesso de peso. De acordo com Leão e Santos (2012), a deficiência no consumo de micronutrientes é um problema de saúde global, atingindo cerca de 2 bilhões de pessoas, e parece se associar com maior risco de doenças e agravos não transmissíveis, incluindo a obesidade. A insuficiente ingestão de vitamina A favorece o excesso de peso por alteração no metabolismo da tireoide, enquanto a vitamina C se relaciona à síntese de carnitina e a oxidação da gordura podendo causar escorbuto; e o baixo teor de vitamina D não favorece o controle da saciedade e do gasto energético.

Quanto a insuficiência dos minerais, o cálcio não auxilia a regulação da termogênese e lipogênese/lipólise; e o zinco está envolvido na regulação de insulina e leptina e a sua insuficiência pode causar psoríase, comprometimento da função neurológica e síndrome do intestino gotejante (LEÃO; SANTOS, 2012). A deficiência de ferro resulta em comprometimento do sistema, imune, com aumento da predisposição a infecções, aumento do risco de doenças e mortalidade perinatal para mães e recém-nascidos, diminuição da capacidade de aprendizagem em crianças escolares e menor produtividade em adultos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). A baixa ingestão de magnésio pela dieta e a perda renal excessiva do magnésio tem sido associada com a elevação da pressão sanguínea (MAFRA et al., 2014). A deficiência de iodo pode trazer consequências como cretinismo, nanismo, dificuldades na aprendizagem, desenvolvimento do bócio e abortos espontâneos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). A deficiência de selênio pode interferir no metabolismo da glândula tireoide, uma vez que ele é essencial à atividade da deiodinase tipo II, que transforma os hormônios T4 em T3 (mais ativo) (COZZOLINO, 2007).

3.2 Avaliação da composição de ingredientes para alimentos para controle de peso

Foi realizada uma análise dos ingredientes que constituem os 14 produtos no presente estudo a fim de traçar um perfil da qualidade nutricional ofertada. Pôde-se evidenciar que 11 produtos apresentaram como componente majoritário (primeiro componente da lista de ingredientes) o carboidrato maltodextrina, o que pode explicar o resultado de não conformidade quanto ao fornecimento de no mínimo 25% e no máximo 50% do valor energético total desses alimentos por proteínas. Corroborando ao se analisar a proporção de carboidratos fornecidos por porção que variaram de 40% a 73,3% g de carboidrato/porção. Logo, essa categoria de produtos contribuiu majoritariamente para a refeição substituída com carboidratos em detrimento das proteínas. A grande maioria apresentou como segunda fonte de carboidratos a farinha de aveia que podem também contribuir para o teor de fibras dos produtos em questão.

Conduzido pelo apelo ao consumo, do total, 12 dos produtos apresentaram a presença de colágeno na lista de ingredientes geralmente após 50% dos componentes serem apresentados, e seu conteúdo (g/porção) implicado para a contribuição na refeição não é mencionado. Segundo o estudo realizado por Gonçalves et al. (2015), houve a indicação de que os benefícios da ingestão de colágeno ainda são escassos o que indica que mais pesquisas são necessárias, apesar disso os



mesmos indicaram resultados positivos para rejuvenescimento e sem aparente contra indicação para o seu uso.

Quanto ao tipo de fonte proteica, todos os produtos apresentaram em sua lista de ingredientes pelo menos uma das fontes de proteínas completas como leite em pó desnatado, leite em pó integral, soro de leite em pó, proteína concentrada do soro do leite, caseinato, clara de ovo desidratada e iogurte em pó conforme requisitada pela legislação. Apenas produtos (3,5 e 10) apresentaram o leite desnatado como primeiro ingrediente, ou seja, maior componente da formulação.

Verificou-se que um grande número de produtos apresentou inadequação quanto a informação expressa quanto a qualidade nutricional. Os produtos 1, 6, 9, 11, 12,13 e 14 apresentaram o maior número de não conformidades neste quesito e que nenhum dos produtos avaliados esteve de acordo com as normas vigentes para a categoria de ACPs.

Pode-se assim inferir que a normatização desta categoria merece maiores estudos e uma ampla reavaliação da condição de alimentos que não necessitam de registro, além de uma atualização referente a legislação que vigora há 20 anos, uma vez que podem trazer prejuízos a saúde do consumidor se usados no status encontrado neste trabalho podendo seu uso indiscriminado e incentivado por informações contidas nas embalagens, acarretar deficiências nutricionais ao invés de contribuir para a perda de peso saudável.

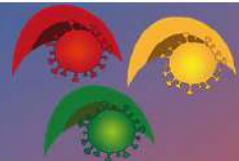
4. CONCLUSÃO

As irregularidades identificadas, mostram que o comprometimento das indústrias alimentícias com o consumidor ainda é falho frente às legislações vigentes, levando o consumidor ao acesso de uma gama de dados não totalmente fidedignos na rotulagem de alimentos para controle de peso.

Logo, vale a pena ressaltar a necessidade de um maior comprometimento das indústrias com o consumidor e da atualização de leis que exijam o registro desses produtos, aplicando integralmente os parâmetros estabelecidos pelas legislações vigentes como também de uma fiscalização eficiente, de forma a garantir a proteção, a saúde e a segurança alimentar, tendo em vista que o hábito de leitura dos rótulos dos produtos é a primeira linha de defesa do consumidor e sem isso não se pode confiar nos dados declarados.

5. REFERÊNCIAS

- ARNAIZ, M. G. **Paradojas de la alimentación contemporánea**, Barcelona: Icaria Editorial, 1996.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC N° 19, de 05 de Maio de 2010. Dispõe sobre a obrigatoriedade das empresas informarem à ANVISA a quantidade de fenilalanina, proteína e umidade de alimentos, para elaboração de tabela do conteúdo de fenilalanina em alimentos, assim como disponibilizar as informações nos sítios eletrônicos das empresas ou serviço de atendimento ao consumidor (SAC). **Diário Oficial da União**. Brasília (DF): Ministério da Saúde, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Portaria N° 30 de janeiro de 1998. Aprova o “Regulamento técnico referente a Alimentos para Controle de Peso. **Diário Oficial da União**. Brasília (DF): Ministério da Saúde, 1998.
- COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 5. ed. Barueri, SP: Manole, 2016.



- ESCOTT-STRUMP, S. **Nutrição relacionada ao diagnóstico e tratamento**. 6. ed. Barueri, SP: Manole, 2011.
- GONÇALVES, Gleidiana Rodrigues et al. Benefícios da ingestão de colágeno para o organismo humano. **Revista Eletrônica de Biologia (REB)**. ISSN 1983-7682, v. 8, n. 2, p. 190-206, 2015.
- PEREIRA, R. F.; LAJOLO, F. M.; HIRSCHBRUCH, M. D. Consumo de suplementos por alunos de academias de ginástica em São Paulo. **Revista de Nutrição**, 2003.
- SOUZA, A. P. L.; PESSA, R. P. Eating disorders treatment: factors associated with dropout. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 65, n. 1, p. 60-67, 2016.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: preventing and managing the global epidemic. **WHO Technical Report Series, 894**. Geneva: World Health Organization; 2000.

6. AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pernambuco e ao Departamento de Ciências Farmacêuticas.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Nutrição e Saúde

DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA AVALIAR OS EFEITOS DO DESMAME PRECOCE

M. L. F. de OLIVEIRA¹, J. A. da SILVA GOMES², J. M. de CARVALHO², G. H. F. GUEDES², M. A. S. da COSTA², M. E. da SILVA², F. C. A. M. TENÓRIO²

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição;

² Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Histologia e Embriologia

E-mail para contato: malufigueira_2@outlook.com

RESUMO – Introdução: O desmame precoce (DP) é uma prática preocupante, principalmente durante o período crítico do desenvolvimento, onde os processos de proliferação celular acontecem de forma acelerada; o leite materno contém nutrientes e anticorpos essenciais para o crescimento, e sua falta repercute na maturação do lactente. O DP tem interferências na saúde que se estendem até a vida adulta, alterando a atividade elétrica cortical. A Depressão Alastrante cortical (DAC) é um fenômeno usualmente utilizado para avaliar os efeitos da desnutrição na maturação, e pode ser um modelo promissor para avaliar os efeitos do DP. **Materiais e Métodos:** Realizou-se uma revisão literária em bases de dados digitais utilizando artigos e publicações relevantes para o tema proposto. **Resultados e Discussão:** Alterações ambientais e nutricionais que ocorrem por um curto período de tempo ou em baixa intensidade durante a janela crítica, influenciam na atividade eletrofisiológica. O DP causa aporte de quantidades inadequadas de nutrientes e de anticorpos, sendo capaz de alterar o status eletrofisiológico, bem como a cascata do desenvolvimento morfofisiológico. **Conclusão:** A atividade elétrica do cérebro reflete o estado do metabolismo e a condição de saúde do organismo, e por esse motivo, técnicas que possam registrá-la, como a DAC, são importantes para elucidar os mecanismos fisiológicos e patológicos presentes nos efeitos do desmame precoce, a fim de melhor compreendê-los.

Palavras-chave: Desmame precoce; Neurodesenvolvimento; DAC; Nutrição.

SUMMARY – Introduction: Early weaning (EW) is a worrying practice, mainly during the critical period of development, where the processes of cell proliferation happen in an accelerated way; breast milk contains essential nutrients and antibodies for growth, and its lack affects the infant's maturation. EW has health interferences that extend into adulthood, altering cortical electrical activity. Cortical spreading depression (CSD) is a phenomenon usually used to assess the effects of malnutrition on maturation, and can be a promising model for assessing the effects of EW. **Materials and Methods:** A literary review was carried out on digital databases using articles and publications relevant to the proposed theme. **Results and Discussion:** Environmental



*and nutritional changes that occur for a short period of time or at low intensity during the critical window, influence electrophysiological activity. EW causes an inadequate supply of nutrients and antibodies, being able to change the electrophysiological status, as well as the morphophysiological development cascade. **Conclusion:** The electrical activity of the brain reflects the state of metabolism and the health condition of the organism, and for this reason, techniques that can register it, such as CSD, are important to elucidate the physiological and pathological mechanisms present in the effects of weaning early in order to better understand them.*

Keywords: Early weaning; Neurodevelopment; CSD; Nutrition.

1. INTRODUÇÃO

O aleitamento materno é fundamental para o desenvolvimento metabólico e imunológico, devido ao fornecimento nutricional e da memória imunológica. Mesmo com todos os benefícios dessa prática, ainda são registrados muitos casos da interrupção precoce da amamentação, que é conhecida como Desmame Precoce (DP). O DP causa o aporte inadequado de nutrientes e de anticorpos provenientes na mãe, influenciando no desenvolvimento e no funcionamento do organismo (RODRIGUES *et al.*, 2018).

Animais desmamados precocemente têm maior preferência por dietas gordurosas, quando comparados àqueles com desmame regular. Isso altera no perfil fisiológico (peso corpóreo, gordura total e visceral, glicemia, níveis séricos de insulina e resistência à insulina), causando o desenvolvimento de doenças crônicas, com desordem metabólica e desequilíbrio nas espécies radicais reativas e nas defesas antioxidantes (DOS SANTOS OLIVEIRA *et al.*, 2011). Durante a amamentação, há estímulo para produção e liberação do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), uma neurotrofina que induz a sobrevivência das células neurais. Quando o aleitamento é interrompido, há redução dessa proteína, com queda da sobrevivência de células neuronais (ISHIKAWA *et al.*, 2015).

O período crítico do cérebro o torna vulnerável a deficiência nutricional, havendo alteração morfofisiológica, com consequências deletérias para o órgão (AIREY *et al.*, 2015). O modelo experimental da Depressão Alastrante Cortical (DAC), é uma metodologia utilizada para registrar a atividade elétrica do cérebro. Condições que alteram a excitabilidade da dinâmica neural, como a desnutrição ou hipernutrição, modificam as características da DAC (GUEDES, 2011). Assim, o presente estudo tem por objetivo investigar a DAC, o DP e dos efeitos por ele causados, e correlacionar suas propriedades, a fim de avaliar a possibilidade de utilizar o modelo da DAC para o estudo dos efeitos do DP.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo trata-se de uma revisão literária que utilizou como descritores: depressão alastrante cortical, neurodesenvolvimento, período crítico, desmame precoce e hiponutrição. Foram selecionados 19 artigos em bases de dados digitais (SciELO, PubMed e Google Scholar), dentre os quais 7 foram excluídos da seleção. Utilizou-se como critérios de inclusão, artigos originais correspondentes aos períodos de 2011 a 2019, nos idiomas inglês e português, com delineamento experimental ou observacional; foram excluídos artigos não originais, em idiomas que não fossem inglês ou português, publicados antes do ano de 2011.



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A DAC foi demonstrada em muitas espécies de vertebrados, inclusive no homem, acontecendo em diferentes áreas do encéfalo, como bulbo olfatório, córtex cerebelar, núcleo caudado e teto ótico (CLOSE *et al.*, 2019; FRANCISCO; GUEDES, 2015). A deflagração acontece de forma concêntrica e reversível a partir de um estímulo em um ponto da superfície cortical; nesta, há a variação rápida de voltagem, com a redução da amplitude do eletroencefalograma, e a variação lenta de voltagem, que se expressa em forma de onda. É possível calcular parâmetros da DAC (velocidade, amplitude e latência), que variam de acordo com o status metabólico (GUEDES, 2011).

Segundo MEDEIROS (2016), animais desnutridos apresentam maior sensibilidade na excitabilidade neural, logo, a atividade elétrica do sistema nervoso é afetada e sofre variações, a nível periférico e central. Segundo ALAMY (2012), até os períodos mais curtos de exposição à desnutrição alteram de forma consistente e prolongada a sensibilidade do córtex cerebral à DAC. Quando as variações nutricionais acontecem até a terceira semana de amamentação (correspondente ao período crítico), os impactos fisiológicos são severos, se estendendo até a vida adulta (ALVES *et al.*, 2019), inclusive no tecido cerebral (ISHIKAWA *et al.*, 2015), repercutindo no baixo desempenho cognitivo, bem como agressividade e ansiedade acentuadas, devido à queda do BDNF; além disso, a falta de dinâmica metabólica na dislipidemia, diabetes e hipertensão, eleva o estresse oxidativo, acentuando o comprometimento no sistema nervoso (AHOLA *et al.*, 2017).

A atividade elétrica neurológica é considerada uma das características fisiológicas mais importantes do tecido nervoso, e eventos ocorridos durante o período crítico, como o DP, podem alterá-la. Por meio dessa atividade, o tecido cerebral consegue executar ações de diferentes graus de complexidade neuronal (ALAMY, 2012). Logo, a DAC é uma técnica que permite o registro eletrofisiológico do tecido corticocerebral, e pode fornecer informações a respeito do funcionamento do órgão, bem como seus mecanismos frente a condições fisiológicas normais, anormais ou patológicas (GUEDES, 2011).

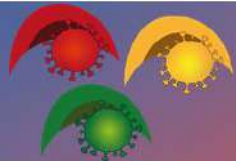
4. CONCLUSÃO

Diferentes estruturas cerebrais se desenvolvem em distintos períodos do aleitamento, e interferentes durante essas fases, como o desmame precoce, alteram a atividade elétrica. A DAC é um modelo experimental capaz de avaliar a excitabilidade cortical, e acontece em muitas espécies de vertebrados, inclusive no homem, podendo ser utilizada para compreender os mecanismos que alteram as funções fisiológicas ligadas ao desenvolvimento. Dessa forma, a DAC pode ser utilizada como ferramenta experimental eficaz para a investigação dos efeitos causados pelo DP.

5. REFERÊNCIAS

AHOLA, Milla K.; VAPALAHTI, Katariina; LOHI, Hannes. Early weaning increases aggression and stereotypic behaviour in cats. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2017.

AIREY, Chris J. *et al.* Maternal undernutrition affects neurogenesis in the foetal mouse brain. In: *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2015. p. 72.



ALAMY, Meryem; BENGELLOUN, Wail A. Malnutrition and brain development: an analysis of the effects of inadequate diet during different stages of life in rat. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 36, n. 6, p. 1463-1480, 2012.

ALVES, Danielle Viana de Souza *et al.* Enriquecimento ambiental reduz excitabilidade cerebral em ratos adultos hipernutridos durante a lactação. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 77, n. 8, p. 555-559, 2019.

CLOSE, Liesl N. *et al.* Cortical spreading depression as a site of origin for migraine: Role of CGRP. *Cephalalgia*, v. 39, n. 3, p. 428-434, 2019.

DA SILVA FRANCISCO, Elian; GUEDES, Rubem Carlos Araújo. Neonatal taurine and alanine modulate anxiety-like behavior and decelerate cortical spreading depression in rats previously suckled under different litter sizes. *Amino acids*, v. 47, n. 11, p. 2437-2445, 2015.

DOS SANTOS OLIVEIRA, Lisiane *et al.* Early weaning programs rats to have a dietary preference for fat and palatable foods in adulthood. *Behavioural processes*, v. 86, n. 1, p. 75-80, 2011.

GUEDES, Rubem Carlos Araújo. Cortical spreading depression: a model for studying brain consequences of malnutrition. In: *Handbook of behavior, food and nutrition*. Springer, New York, NY, 2011. p. 2343-2355.

ISHIKAWA, Junko; NISHIMURA, Ryoichi; ISHIKAWA, Akinori. Early - life stress induces anxiety - like behaviors and activity imbalances in the medial prefrontal cortex and amygdala in adult rats. *European Journal of Neuroscience*, v. 41, n. 4, p. 442-453, 2015.

MEDEIROS, Larissa de Brito. Soro do leite caprino e depressão alastrante cortical e memória em ratos albinos: papel do ácido siálico. 2016. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

RODRIGUES, Vanessa Silva Tavares *et al.* Supplementation of suckling rats with cow's milk induces hyperphagia and higher visceral adiposity in females at adulthood, but not in males. *The Journal of nutritional biochemistry*, v. 55, p. 89-103, 2018.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Nutrição e Saúde

RELAÇÃO ENTRE O ALEITAMENTO MATERNO E A PREVENÇÃO DE DOENÇAS

M. L. F. de OLIVEIRA¹, J. A. da SILVA GOMES², J. M. de CARVALHO², G. H. F. GUEDES², M. A. S. da COSTA², M. E. da SILVA², F. C. A. M. TENÓRIO²

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição;

² Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Histologia e Embriologia

E-mail para contato: malufigueira_2@outlook.com

RESUMO – Introdução: O aleitamento materno tem forte influência no desenvolvimento dos mamíferos, intervindo na fisiologia, na morfologia, no metabolismo e na imunidade, assim como no estado de saúde físico-mental. Porém, o aleitamento tem sido interrompido precocemente, devido a diferentes fatores culturais e socioeconômicos; assim, a oferta de nutrientes acontece de forma ineficiente, não suprimindo as demandas metabólicas de forma segura. O presente estudo tem por objetivo relacionar os mecanismos e características do leite materno que atuam no combate a doenças. **Materiais e Métodos:** Foi realizada uma revisão bibliográfica em bases de dados digitais utilizando artigos e publicações relevantes para o desenvolvimento do tema proposto. **Resultados e Discussão:** O leite materno possui compostos que atuam como imunomoduladores, anti-inflamatórios e antioxidantes, e o desmame precoce, faz com que ausência desses durante o período crítico do desenvolvimento exponha o organismo a interferentes que prejudicam na maturação dos sistemas, levando ao desenvolvimento de doenças crônicas e aumento da vulnerabilidade imunológica frente a infecções. **Conclusão:** É essencial que as mães lactantes sejam orientadas sobre as propriedades e benefícios na amamentação, pois esta prática influenciará na saúde da prole, onde os efeitos postergam-se até a vida adulta.

Palavras-chave: Amamentação; Desmame precoce; Saúde; Imunoproteção; Metabolismo.

ABSTRACT - Introduction: Breastfeeding has a strong influence on the development of mammals, intervening in physiology, morphology, metabolism and immunity, as well as in the state of physical and mental health. However, breastfeeding has been stopped early, due to different cultural and socioeconomic factors; thus, the supply of nutrients happens inefficiently, not meeting the metabolic demands in a safe way. The present study aims to relate the mechanisms and characteristics of breast milk that act to combat diseases. **Materials and Methods:** A bibliographic review was carried out on digital databases using articles and publications relevant to the development of the proposed theme. **Results and Discussion:** Breast milk has compounds that act as immunomodulators, anti-inflammatories and antioxidants, and early weaning causes the absence of these during the critical period of development to expose the organism to interfering



*with the maturation of the systems, leading to development of chronic diseases and increased immune vulnerability to infections. **Conclusion:** It is essential that lactating mothers are informed about the properties and benefits of breastfeeding, as this practice will influence the health of the offspring, where the effects are delayed until adulthood.*

Keywords: Breastfeeding; Early weaning; Cheers; Immunoprotection; Metabolism.

1. INTRODUÇÃO

A janela crítica do desenvolvimento corresponde do período da embriogênese ao período pós-natal, equivalente ao segundo ano de vida do mamífero. Durante essas fases, a diferenciação e proliferação celular acontecem de forma acelerada, tornando o organismo em desenvolvimento sensível às alterações ambientais, como é o caso de alterações nutricionais. O aleitamento materno exclusivo fornece macro e micronutrientes essenciais para a maturação morfofisiológica (DA SILVA *et al.*, 2016), promovendo dinâmica metabólica.

A nutrição fornecida por meio da amamentação é importante para a programação neural e para o desenvolvimento psicológico, sensorial e comportamental (AGOSTI *et al.*, 2017). Após o parto, o recém-nascido passa por uma transição de um ambiente estéril para um ambiente composto por microrganismos potencialmente infecciosos, como fungos, vírus e bactérias, e por ter o sistema imune imaturo, torna-se vulnerável a infecções. Logo, o leite materno possui anticorpos que já estão familiarizados com microrganismos que a mãe já entrou em contato anteriormente, apresentando memória imunológica (HANSON e GLUCKMAN, *et al.*, 2011)

Mesmo com os inúmeros benefícios apresentados pelo leite, a interrupção do aleitamento, chamada também de desmame precoce (DP), durante o período crítico, tem sido cada vez mais recorrente; quando essa descontinuação ocorre até o sexto mês de vida, as consequências são mais acentuadas. Este ato interfere negativamente sobre o lactente, devido ao déficit da demanda nutricional e da imunomodulação, afetando o desenvolvimento neuro-comportamental (SILVA *et al.*, 2015).

Dessa forma, se forma a hipótese de que os lactentes submetidos ao desmame precoce são vulneráveis ao desenvolvimento de patologias, bem como ao atraso na maturação morfofisiológica. Com isso, o presente estudo tem como objetivo investigar a relação entre o aleitamento materno e a prevenção frente ao desenvolvimento de doenças.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo trata-se de uma revisão bibliográfica, na qual as informações foram coletadas em bases de dado como Medline, SciELO e no conteúdo presente no Google Scholar, por meio de publicações relevantes para o desenvolvimento do tema proposto. Foram utilizadas as palavras-chave, aleitamento materno, desmame precoce, sistema imunológico e desenvolvimento neonatal.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A lactação é benéfica tanto para a mãe, quanto para o bebê. Segundo ACCIOLY, *et al.* (2006), os lactentes têm maior proteção contra doenças infecciosas e menor ocorrência do surgimento de alergias e de desnutrição. SGARBIERI (2004) indicou que a produção de leite para a mulher atua prevenindo os cânceres de mama, de ovário e de útero, auxiliando também na quebra



de gordura corporal e agindo como contraceptivo natural.

O aporte nutricional proporcionado pela lactação contribui significativamente para a redução da mortalidade infantil, reduzindo também as chances do desenvolvimento de doenças crônicas (ANTUNES *et al.*, 2008). O aleitamento materno também possui características anti-inflamatórias, imunomodulatórias e anti-infecciosas, influenciando na maturação funcional enzimática e hormonal dos lactentes, bem como na competência imunológica secretora e presente na superfície das mucosas (GOLDMAM, 1993).

Mesmo com as propriedades benéfica do leite materno, ainda é crescente o ato do DP. Motivos como a jornada de trabalho das mães, desconhecimento de informações sobre o aleitamento, dificuldades e dores ao amamentar, desnutrição materna, ou doenças infecciosas, como o HIV, influenciam no DP (SIQUEIRA *et al.*, 1994). Assim, além da mãe não se beneficiar mais da proteção natural contra neoplasias de mama, de útero e de ovário, os lactentes não conseguem ingerir anticorpos e imunoglobulinas de forma proporcional (SILVA, *et al.*, 2015), estando mais susceptíveis à contaminação pela nova dieta ofertada.

CARRASCOZA *et al.*, (2005), mostrou que em recém-nascidos desmamados precocemente e alimentados fórmulas dietéticas, houve maior concentração de insulina plasmática, quando comparados à crianças alimentadas regularmente com leite materno. O aumento desse hormônio indica que há maior quantidade de açúcar circulante, formando depósitos de gordura.

Estudos anteriores também evidenciaram que o surgimento da obesidade e de doenças como diabetes e hipertensão, tem relação direta com insultos ambientais, hormonais, metabólicos e nutricionais que aconteceram durante a infância, nos períodos críticos do desenvolvimento (TORRENS *et al.*, 2006). Segundo HANSON e GLUCKMAN, (2011), a carência nutricional predispõe o organismo à perda da função renal, que é seguida de instabilidade da pressão arterial, e de sobrecarga cardiovascular.

Assim, o aleitamento atribui importante influência no processo de desenvolvimento, e que a demanda inadequada de nutrientes durante a janela crítica do desenvolvimento, causada pelo desmame precoce, é associada à repercussão de doenças metabólicas na vida adulta, como hipertensão, diabetes e obesidade, assim como de debilidades no funcionamento do sistema imunológicos, tendo como consequência a manifestação de alergias.

4. CONCLUSÃO

Assim, é possível concluir que o DP durante os primeiros seis meses de vida, repercutem de forma negativa no crescimento da criança, havendo deficiência na imunoproteção e no desenvolvimento neurocomportamental e morfofisiológico. É essencial que campanhas de conscientização a respeito da importância da lactação, bem como do tempo ideal para a sua prática, sejam adotadas pelos serviços de saúde e pelas autoridades governamentais com a população, uma vez que é de interesse global promover a qualidade de vida da população, visto que o leite materno possui propriedades protetoras para os lactantes e para os lactentes.

5. REFERÊNCIAS

AGOSTI, Massimo *et al.* Nutritional and metabolic programming during the first thousand days of life. *La Pediatria medica e chirurgica: Medical and surgical pediatrics*, v. 39, n. 2, p. 157-157, 2017.



ANTUNES, Leonardo dos Santos *et al.* Amamentação natural como fonte de prevenção em saúde. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 13, n. 1, p. 103-109, 2008.

CARRASCOZA, Karina Camillo; COSTA JÚNIOR, Áderson Luiz; MORAES, Antônio Bento Alves de. Fatores que influenciam o desmame precoce e a extensão do aleitamento materno. *Estudos de Psicologia (Campinas)*, v. 22, n. 4, p. 433-440, 2005.

DA SILVA, JOSEANE DORNELES *et al.* Benefícios provenientes do aleitamento materno exclusivo. *Revista UNINGÁ Review*, v. 16, n. 2, 2013.

GOLDMAN, Armond S. The immune system of human milk: antimicrobial, antiinflammatory and immunomodulating properties. *The Pediatric infectious disease journal*, v. 12, n. 8, p. 664-672, 1993.

HANSON, Mark; GLUCKMAN, Peter. Developmental origins of noncommunicable disease: population and public health implications. *The American journal of clinical nutrition*, v. 94, n. suppl_6, p. 1754S-1758S, 2011.

NEWBORNS, How Breast Milk Protects; NEWMAN, Jack. Como o leite materno protege os recém-nascidos. *Scientific American*, v. 4, p. 76-79, 1995.

SGARBIERI, Valdemiro Carlos. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. *Revista de Nutrição*, v. 17, n. 4, p. 397-409, 2004.

SILVA, Rozália Almeida *et al.* Aleitamento materno: fatores que influenciam o desmame precoce. *Revista Brasileira de Educação e Saúde*, v. 5, n. 3, p. 01-07, 2015.

SIQUEIRA, Rosane *et al.* Reflexões sobre as causas do desmame precoce observadas em dinâmicas de grupo de incentivo ao aleitamento materno. *J Pediatr*, v. 70, n. 1, p. 16-20, 1994.

TORRENS, Christopher *et al.* Folate supplementation during pregnancy improves offspring cardiovascular dysfunction induced by protein restriction. *Hypertension*, v. 47, n. 5, p. 982-987, 2006.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Nutrição e Saúde

ATIVAÇÃO DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA NO RIM DE RATOS ADULTOS SUBMETIDOS À RESTRIÇÃO DIETÉTICA MATERNA NA GESTAÇÃO

J. M. DE CARVALHO¹, L. A. MELO¹, F. P. B. RIBEIRO¹, J. P. CAVALCANTE-JUNIOR¹, A. D. O. PAIXÃO¹, L. D. VIEIRA¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Fisiologia e Farmacologia;

E-mail para contato: jennah_martins@hotmail.com

RESUMO – Introdução: Insultos durante a vida intrauterina podem acarretar doenças crônicas durante a vida pós-natal. A restrição dietética materna (RD) durante a gravidez pode induzir hipertensão na idade adulta. Neste trabalho foram avaliados os efeitos da RD sobre os componentes do sistema renina angiotensina (SRA) no rim de ratos adultos. **Metodologia:** Este protocolo experimental teve aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais, sob nº23076.017536/2015-71. Ratas Wistar, foram divididas aleatoriamente em grupos e acasaladas aos 90 dias. O grupo controle de mães foi mantido com livre acesso a uma dieta padrão, enquanto o outro grupo foi mantido com 50% de RD, o grupo restrição. Durante a amamentação as mães foram mantidas com livre acesso à dieta e água. Cada grupo de mães foi composto por 7 animais, das quais foram randomicamente selecionados 2 filhotes machos para estudos aos 120 dias de idade. O desmame ocorreu aos 21 dias de idade. Durante o crescimento, os animais tiveram livre acesso à água e a dieta padrão. As expressões proteicas de renina, ECA2 e AT₁R, componentes do SRA foram avaliadas por Western blotting. **Resultados e Discussão:** O grupo restrição elevação da pressão arterial e das expressões de renina e ECA2. **Conclusão:** Os presentes dados indicam que a restrição dietética materna, durante a prenhez, programa hipertensão e eleva marcadores do sistema renina angiotensina, como renina e ECA2 no rim da prole.

Palavras chaves: Restrição dietética materna, sistema renina angiotensina, hipertensão arterial.

ABSTRACT – Introduction: Insults during intrauterine life can lead to chronic illnesses during postnatal life. Maternal dietary restriction (DR) during pregnancy can induce hypertension in adulthood. In this work, the effects of DR on the components of the renin angiotensin system (SARS) in the kidney of adult rats were analyzed. **Methodology** This experimental protocol had the Ethics Committee on the Use of Animals, under the number 23076.017536 / 2015-71. Wistar female rats were randomly divided into groups and were mated 90 days. The control group of mothers was maintained with free access to a standard diet, while the other group was maintained with 50% DR, or restriction group. During breastfeeding, mothers were maintained with free access to diet and water. Each group of mothers was composed of 7 animals, of which 2 male puppies were



*randomly selected for studies at 120 days of age. Weaning occurred at 21 days of age. During growth, the animals had free access to water and a standard diet. Like renal proteins, ECA2 and AT1R, the components of ARS were evaluated by Western blotting. **Results and Discussion** The blood pressure restriction group and renal expressions and ACE2. **Conclusion:** The present data indicate that maternal dietary restriction, during a pre-programmed period, hypertension and elevating markers of the renin angiotensin system, such as renin and ECA2 are not allowed.*

Key Words: Maternal dietary restriction, renin angiotensin system, arterial hypertension.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento intrauterino é um processo de demanda nutricional elevada. Portanto, o estado nutricional materno pode influenciar no crescimento fetal (Nomura *et al.*, 2012). Em paralelo, o estado gravídico constitui um momento fisiológico em que há o aumento do estresse oxidativo. A privação alimentar durante a gestação representa um fator que eleva a quantidade de espécies reativas do oxigênio na placenta (Gupta *et al.*, 2004). Se exacerbado, o estresse oxidativo e a desnutrição materna durante a gravidez podem favorecer o surgimento de doenças crônicas na vida adulta da prole (Chiarello *et al.*, 2018). A programação de enfermidades tardias ocorre parcialmente, devido a alterações funcionais que tornam a prole mais sensível a qualquer insulto enfrentado após o nascimento (Diz-Chaves *et al.*, 2013).

No rim de ratos submetidos à desnutrição materna, através de uma dieta multicarenciada, há alteração de componentes do sistema renina angiotensina (SRA) que ocorrem em paralelo com alterações de ROS ao longo do desenvolvimento juvenil e adulto. Além de alterações de ROS e de componentes do SRA, a desnutrição materna pode levar a diminuição do número de néfrons, e alterações na reabsorção tubular de sódio. Portanto, hipertensão e suas consequências são legados maternos (Zhao *et al.*, 2008; Kett & Denton, 2011; Paixão *et al.*, 2013; Vieira *et al.*, 2014).

Embora seja do conhecimento que desnutrição materna de causas diversas produz alteração da maquinaria celular renal e doenças tardias, ainda não está claro se restrição dietética materna induz alteração da produção de componentes do SRA no rim da prole na idade adulta. Nesse sentido, torna-se importante investigar se a expressão de componentes do SRA apresenta-se alterada no rim de ratos adultos submetidos à restrição dietética materna, durante a prenhez.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O protocolo experimental aqui descrito foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (Processo nº 23076.017536/2015-71.). Os ratos foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE, em ciclo 12h claro/escuro e temperatura em torno de 22°C. Ratas Wistar foram divididas aleatoriamente em grupos e acasaladas aos 90 dias. O grupo controle de mães foi mantido com livre acesso a uma dieta padrão (Presence, Neovia Nutrição e Saúde Animal LTDA, Paulínea, SP), enquanto o outro grupo foi mantido com 50% de restrição dietética, o grupo Restrição. Durante a amamentação as mães foram mantidas com livre acesso à dieta e água. Cada grupo de mães foi composto por 7 animais, das quais foram randomicamente selecionados 2 filhotes machos para estudos aos 120 dias de idade. O desmame ocorreu aos 21 dias de idade, quando os ratos machos foram alocados em gaiolas coletivas com quatro animais. Durante o crescimento, os animais tiveram livre acesso à água e ração. Aos 120 dias de idade, os 8 animais de cada grupo foram eutanasiados e tiveram os rins coletados. A expressão das proteínas que

compõem SRA foi realizada através de Western Blott. Diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram analisadas através do teste “t” de Student para dados não pareados. Estas análises foram realizadas usando o GraphPad Prism 5 (Version 5.01, GraphPad Software, Inc.). As médias foram consideradas diferentes quando $P < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A restrição dietética materna durante a gestação reduziu o ganho de peso materno e o peso de nascimento da prole. Estes resultados indicam a quão severa foi a desnutrição sofrida pelos animais. No entanto, esses animais no desmame, bem como, na idade adulta, com 120 dias de idade, apresentaram o mesmo peso corporal. Yura *et al* (2005) observaram que o peso corporal da prole assimilou-se ao controle na idade de 10 dias, após 30% de restrição alimentar materna durante a gravidez.

Na Figura 1A são apresentados os níveis de renina no rim de ratos adultos, aos 120 dias de idade. Observa-se que os níveis de renina são elevados no rim de ratos que foram submetidos à restrição dietética durante o período pré-natal. A renina é uma enzima largamente produzida nas células glomerulosas do aparelho justaglomerular que atua sobre o angiotensinogênio para produzir angiotensina I. A renina, além de ser responsável indireta pela síntese do principal derivado do SRA, atua em um receptor, o PRR, e ativa vias intracelulares que resultam na produção de fibrose (Chappell, 2016). Portanto, elevação dos níveis de renina no rim indica ativação do SRA, aumento de angiotensina II, aumento da reabsorção tubular de sódio, alterações de estruturas renais e hipertensão.

Na Figura 1B são apresentados dados sobre a presença de ECA2 no rim adultos, aos 120 dias de idade. A expressão se apresenta elevada no grupo de ratos submetidos à restrição dietética durante o desenvolvimento fetal. A ECA2 é uma enzima chave para síntese de angiotensina 1-7, cuja via de síntese é denominada via alternativa. A angiotensina 1-7, produto da ECA2 produz ações que se contrapõem à ação da angiotensina II através do AT₁R. Assim, a ação da angiotensina 1-7, produto da ECA2 resulta em ação antioxidante, natriurética e anti-proliferativa (Chappell, 2016).

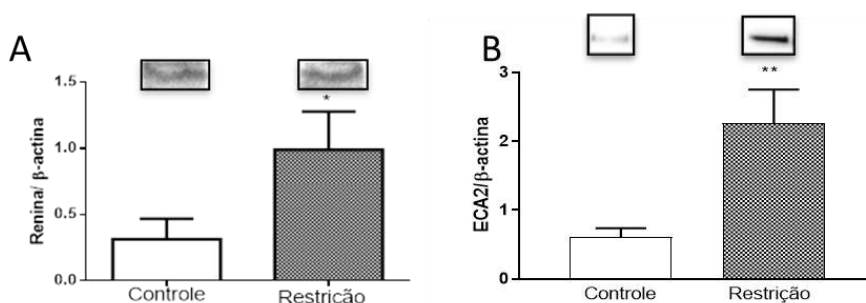


Figura 1. Expressão de renina(A) e ECA2(B) no rim de ratos com 120 dias de vida. Dados expressos com média ± EPM. Controle, grupo cujas mães receberam ração padrão *ad libitum* durante a prenhez. Restrição, grupo cujas mães foram submetidas a 50% de restrição dietética durante a prenhez. * $P < 0,05$, teste “t” de Student para dados não pareados.

4. CONCLUSÃO

Os presentes dados sugerem que a restrição dietética materna programa a elevação de marcadores do sistema renina angiotensina, como renina, e ECA2 no rim da prole. A elevação



destes componentes do SRA pode contribuir com o aumento da pressão arterial e com outras complicações cardiovasculares que são programadas pela desnutrição materna.

5. REFERÊNCIAS

CHAPPELL, M.C. Biochemical evaluation of the renin-angiotensin system: the good, bad, and absolute? *Am J Physiol Coração Circ Physiol* v. 310, n. 2, p. H137–H152, 2016.

CHIARELLO, D.I. *et al.* Oxidative stress: normal pregnancy versus preeclampsia. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, v. 1866, n. 2, p. 165354, 2020.

DIZ-CHAVES, Y. *et al.* Prenatal stress increases the expression of proinflammatory cytokines and exacerbates the inflammatory response to LPS in the hippocampal formation of adult male mice. *Brain Behav Immun*, v. 28, p. 196-206, 2013.

GUPTA, P. *et al.* Oxidative stress in term small for gestational age neonates born to undernourished mothers: a case control study. *BMC Pediatr*, v. 4, n. 1, p. 14, 2004.

KETT, M.M.; DENTON, K.M. Renal programming: cause for concern?. *Am J Physiol-Reg I*, v. 300, n. 4, p. R791-R803, 2011.

NOMURA, R. M.Y. *et al.* Influência do estado nutricional materno, ganho de peso e consumo energético sobre o crescimento fetal, em gestações de alto risco. *Rev Bras Ginecol Obstet*, v. 34, n. 3, p. 107-112, 2012.

PAIXÃO, A.D.O. *et al.* Age-dependent hypertension and renal sodium handling in the female intrauterine growth restricted rat.. *Exp Biol*. 27: 907-11. 2013.

VIEIRA, L.D. *et al.* Mecanismos moleculares renais subjacentes ao manuseio alterado de Na + e gênese da hipertensão durante a vida adulta em ratos desnutridos no pré-natal. *Brit J Nutr*, v. 111, n. 11, p. 1932-1944, 2014.

YURA, S. *et al.* Papel do aumento prematuro da leptina na obesidade resultante da desnutrição intra-uterina. *Cell Metab*, v. 1, n. 6, p. 371-378, 2005.

ZHAO, W. *et al.* Kidney fibrosis in hypertensive rats: role of oxidative stress. *Am. J. Nephrol.*, v. 28, n. 4, p. 548-554, 2008.

6. AGRADECIMENTOS

Agradeço à CNPq e a Facepe pelo auxílio financeiro.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Nutrição e Saúde

POTENCIAL TOXICOLÓGICO DO ÁCIDO OXÁLICO ORIUNDO DA DIETA

J. O. de C. BRANDÃO FILHO¹, R. V. L. da SILVA², J. P. M. BARBOSA FILHO³, R. D. SÁ⁴, K. P. RANDAU⁵

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica;

² Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas;

³ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas;

⁴ Centro Universitário da Vitória de Santo Antão, Curso de Farmácia;

⁵ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas

E-mail para contato: brandaoodimar@gmail.com

RESUMO – *Introdução: O ácido oxálico é encontrado em uma infinidade de espécies vegetais, mais de 215 famílias de plantas acumulam essa substância em seus tecidos na forma de sal de oxalato, exercendo um papel importante na regulação do cálcio celular. Há relatos na literatura sobre possíveis danos biológicos ocasionados pelo consumo do oxalato através da dieta, entretanto, são escassos e não muito aprofundados. Objetivo: Conduzir uma revisão literária sobre o potencial toxicológico do ácido oxálico. Metodologia: foi realizada uma busca literária nas plataformas Science Direct, PubMed e Scopus no período de 2000 a 2020. As palavras-chaves foram “Oxalato”, “Ácido Oxálico” e “intoxicação”. Resultados e discussão: Apesar do efeito antinutricional ocasionado, O principal desfecho ocasionado pela intoxicação por oxalato, são quadros de dano renal associado ao depósito de cristais de oxalato de cálcio e ocorre quando há uma ingestão excessiva de oxalato na dieta. Entretanto, os mecanismos bioquímicos envolvidos ainda não são muito claros. Conclusão: Em decorrência do alto teor de oxalato contido em alguns alimentos e espécies vegetais, recomenda-se evitar o consumo excessivo desses, embora ainda faltem estudos sobre o potencial tóxico do oxalato.*

Palavras-chaves: Oxalato, Intoxicação, Dano renal.

ABSTRACT – *Introduction: Oxalic acid is found in a multitude of plant species, more than 215 families of accumulated that substance in their tissues in the form of oxalate salt, playing an important role in the regulation of cellular calcium. There are reports in the literature about possible damages caused by the consumption of oxalate through diet, however, they are scarce*



and not very detailed. Objective: To carry out a literary review on the toxicological potential of oxalic acid. Methodology: A literary review was carried out on the Science Direct, PubMed and Scopus platforms. The keywords were "Oxalate", "Oxalic Acid" and "Intoxication" in the period of 2000 to 2020. Results and discussion: Although the addition to the anti-nutritional effect, the main outcome caused by oxalate poisoning, condition of kidney damage associated with the deposition of calcium oxalate crystals and occurs when there is an excessive intake of oxalate in the diet. However, the biochemical mechanisms involved are still unclear. Conclusion: Due to the theoretical content of oxalate, contained in some foods and plant species, it is recommended to avoid excessive consumption, although studies on potential oxalate toxicology are still lacking.

Keywords: Oxalate, Intoxication, Kidney Damage.

1. INTRODUÇÃO

Os vegetais sintetizam diversos compostos, cuja produção é dividida em dois tipos de metabolismo: o primário e o secundário. O primário é responsável pela produção de metabólitos encontrados em todas as espécies e em grande quantidade, desempenhando funções estruturais e de armazenamento de energia, como é o caso das proteínas e carboidratos. Já o metabolismo secundário é encarregado da produção de compostos que aparecem em determinados grupos de plantas, em resposta aos estímulos da natureza, desempenhando papéis de resistência e adaptação (Pereira; Cardoso, 2012).

Alguns metabólitos são responsáveis pela produção dos fatores antinutricionais (FANs), que quando consumidos, reduzem o valor nutritivo dos alimentos, pois interferem na digestão, absorção e utilização dos nutrientes. Quando os mesmos são consumidos de forma exagerada, podem inclusive gerar efeitos tóxicos e em casos mais graves, levar o indivíduo ao óbito (Higashijima *et al.*, 2020). O ácido oxálico, que é um ácido di-carboxílico, é um exemplo de fator antinutricional. Esse composto é encontrado em diversas plantas como cacau, espinafre, tomate e acelga, que fazem parte da dieta humana (Oliveira *et al.*, 2017). Nesses e em outros vegetais, o ácido oxálico ainda pode ser encontrado na forma de oxalato de cálcio, devido ao processo conhecido como biomineralização (Li *et al.*, 2012). Nas plantas, o ácido oxálico/oxalato de cálcio desempenha uma série de funções.

Entre elas, já foi observado que determinados vegetais secretam ácido oxálico como uma maneira de se proteger em solos contaminados por metais pesados. Essa ação propicia a criação de complexos com o metal em questão, impedindo que o mesmo intoxique a planta (Morita *et al.*, 2011). Além dessa, outras atividades como regulação dos níveis de cálcio intracelular e autodefesa contra o ataque de insetos e outros predadores já foram relatadas (Prasad; Shivay, 2017). Ryan *et al.* (2001), relataram que a presença de ânions orgânicos, como o oxalato, nas raízes de algumas espécies, diminui a toxicidade do alumínio, um metal pesado extremamente tóxico para os tecidos vegetais.

Embora o oxalato de cálcio exerça uma função fisiológica extremamente importante para os vegetais, nos seres humanos, há evidências de que o consumo de ácido oxálico/oxalato de cálcio está correlacionado com o surgimento de uma série de danos. E, embora esteja, natural e rotineiramente presente em nossa dieta, caso seu consumo seja exacerbado, problemas como a litíase renal podem ser adquiridos. Essa doença se caracteriza pela formação de cálculos (pedras) no sistema urinário, sendo a maioria desses cálculos composta por oxalato de cálcio (Steinbrun;



Briones, 2011). Porém, ainda existem poucos dados na literatura a respeito sobre o potencial tóxico desse composto presente na alimentação humana. Portanto, o objetivo deste trabalho foi realizar um levantamento bibliográfico sobre o potencial toxicológico do ácido oxálico/oxalato de cálcio.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de uma revisão bibliográfica realizada com os descritores “Oxalato/Oxalate”, Ácido Oxálico/ Oxalic Acid e “intoxicação/intoxicação”. A busca foi realizada no período de 2000-2020 nas plataformas de pesquisa ScienceDirect, Pubmed e Scopus. Foram selecionados artigos com informações referentes a principais quadros de intoxicação ocasionado pela ingestão de oxalato/ácido oxálico.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Alimentos e, principalmente, espécies vegetais, são as principais fontes de oxalato e algumas espécies podem conter grandes quantidades desse sal. A alta ingestão de ácido oxálico e seus sais podem ter um efeito deletério na nutrição e na saúde humana, principalmente pela diminuição da absorção de cálcio e pela formação de pedras nos rins. Dessa forma, pressupõe que dietas ricas em ácido oxálico precisam de suplementação de minerais para evitar deficiências e causar danos à saúde em indivíduos que já possuem problemas renais (Olawoye; Gbadamosi, 2017). Embora haja poucos estudos referentes a toxicidade do oxalato/ácido oxálico, o levantamento forneceu evidências de que o oxalato tem um alto potencial para comprometer o sistema renal. Marques *et al.* (2017), concluíram que o consumo de oxalato induz a nefropatia e é frequentemente uma causa inesperada de lesão renal aguda encontrada em biópsias renais e que as causas secundárias mais comuns da nefropatia por oxalato incluem síndromes de má absorção e ingestão excessiva de vitamina C.

O fruto da carambola é famoso por conter grandes quantidades de oxalato de cálcio e na literatura, são encontrados estudos mostrando os efeitos tóxicos da carambola. Diversos estudos alertam que a ingestão de sucos de frutos como a carambola podem acarretar em quadros de dano renal devido à alta concentração de oxalato de cálcio (Mahmood, 2015; Abeysekera *et al.*, 2015; Marques, *et al.*, 2017). Após realizar anamnese de pacientes admitidos na UTI nefrológica, Roberti *et al.* (2014), observaram que o consumo exacerbado dessa fruta ocasionou lesão renal aguda devido ao alto teor de oxalato. Mais recentemente, Duan *et al.*, (2018) concluíram que o oxalato induz a autofagia de células tubulares renais que por sua vez estão relacionadas com a formação de cálculos renais.

Grases *et al.* (2006), realizaram um levantamento de fatores que estão associados na formação da litíase urinária ou urolitiase e elencaram diversas substancias potenciais, dentre elas, está o oxalato. Os autores ainda alertaram que um consumo superior a 40 mg/24 h podem contribuir para gênese da litíase. O consumo de alimentos com alto teor de ácido oxálico pode causar hiperoxalúria, uma vez que o oxalato é a base conjugada do ácido oxálico. Por sua vez, o oxalato pode ligar-se a íons de cálcio presentes no trato urinário onde, posteriormente, poderá haver subsequente precipitação e formação de cristais de oxalato de cálcio, um componente primário do cálculo renal (Khan *et al.*, 2007; Wahsh; Liebman, 2012).

A hiperoxalúria pode ocorrer de várias maneiras e é clinicamente significativa podendo gerar insuficiência renal aguda, além de ferimentos. Ratkalkar e Kleinman (2011), relatam que existem diversos fatores de risco que predispõe a formação de cálculos renais, como, baixo volume urinário, hipercalcúria, fosfatúria, hiperuricosúria, alcalinidade do pH urinário e hiperoxalúria.



Segundo Filho e Júnior (2010), um fator de risco envolvido na litogênese é a hiperossalúria, na qual pode ser encontrada em indivíduos que têm uma dieta rica em oxalato e cálcio. Getting, *et al.*, (2013) após realizarem biópsia de tecido renal de um paciente com hábitos alimentares voltados para o consumo de vegetais e ingestão de sucos em geral, concluíram que o alto teor de oxalato presente na alimentação induziu o depósito de cristais de oxalato de cálcio, ocasionando dano renal severo.

4. CONCLUSÃO

Apesar de ainda haver poucos estudos em relação a ação tóxica do oxalato no organismo humano, com levantamento podemos concluir que a intoxicação por oxalato está relacionada com um efeito antinutritivo, pelo sequestro do cálcio, entretanto, o principal problema é o surgimento de dano renal, embora não se tenha identificado os mecanismos moleculares por trás do fato. O principal desfecho renal ocasionado pela intoxicação de oxalato é o surgimento da litíase urinária em decorrência do depósito de cristais de oxalato de cálcio ao longo do trato urinário. Portanto, existem recomendações para o não consumo exacerbado de alimentos que contenham altas concentrações de oxalato, como os vegetais, já que os mesmos produzem, naturalmente, oxalato de cálcio em seus tecidos.

5. REFERÊNCIAS

- ABEYSEKERA, R. A.; WIJETUNGE, S.; NANAYAKKARA, N.; WAZIL A. W. M. Star fruit toxicity: A cause of both acute kidney injury and chronic kidney disease: A report of two cases. *BMC Res. Notes*, v. 8, n. 1, p. 1–4, 2015.
- AL-WAHSH. I. A.; WU. Y.; LIEBMAN, M. A Comparison of Two Extraction Methods for Food Oxalate Assessment. *J. Food Res.*, v.1, n.2, p. 233-239, 2012.
- DUAN, X.; KONG, Z.; MAI, X.; LAN Y.; LIU Y.; YANG Z.; ZHAO Z.; DENG T. Redox Biology Autophagy inhibition attenuates hyperoxaluria-induced renal tubular oxidative injury and calcium oxalate crystal depositions in the rat kidney. *Redox Biol.*, v. 16, n. January, p. 414–425, 2018.
- FILHO, M. Z.; JUNIOR, REIS. *Urologia Fundamental*: 1. ed. São Paulo, 2010.
- GETTINGM J. E.; GREGOIRE, J. R.; PHUL, A. Oxalate Nephropathy Due to Juicing: Case Report and Review. *The Am Jr Med.*, v. 126, p. 768-772, 2013.
- GRASES, F.; COSTA-BAUZA, A.; PRIETO, R. M. Renal lithiasis and nutrition. *Nutr. J.*, n. 5, v. 23, p. 1-7, 2006.
- HIGASHIJIMA, N. S.; LUCCA, A.; REBIZZI, L. R. H.; REBIZZI, L. M. H. Fatores antinutricionais na alimentação humana. *Segur. Aliment. Nutr.*, v. 27, p. 1-16, 2020.
- KHAN, S. R.; GLENTON, P. A.; BYER, K. J. Dietary Oxalate and Calcium Oxalate Nephrolithiasis. *J. Nephrol.*, v. 178, n. November, p. 2191–2196, 2007.
- LI, X. L.; ZHANG, W. J.; LU, J. W.; WANG, L. J. Calcium oxalate biomineralization in plants. *Chin. Sci. Bull.*, v. 57, p. 2443-2455, 2012.
- MAHMOOD, N. Star Fruit Intoxication. *Akmmc j.*, v. 6, n. 2, p. 30–33, 2015.
- MARQUES, S. *et al.* Teaching Case A Case of Oxalate Nephropathy: When a Single Cause Is Not Crystal Clear. *Am. J. Kidney diseases.*, v. 70, n. vitamin C, p. 722–724, 2017.



- MORITA, A.; YANAGISAWA, O.; MAEDA, S.; TAKATSU, S.; IKKA, T. Tea plant (*Camellia sinensis* L.) roots secrete oxalic acid and caffeine into medium containing aluminum. *Soil Sci. Plant Nutr.*, v. 57, p. 796-802, 2011.
- OLAWOYE, B. T.; GBADAMOSI, S. O. Effect of different treatments on in vitro protein digestibility, antinutrients, antioxidant properties and mineral composition of *Amaranthus viridis* seed. *Cogent Food Agric.*, v. 3, n.1, p. 1-14, 2017.
- OLIVEIRA, L. C. S.; KAMONSEKI, D. H.; ROSTELATO-FERREIRA, S. Determinação dos teores de ácido oxálico em diferentes amostras de tomate. *Nutrivisa: Ver. Nutr. Vig. Saúde*, v. 4, p. 61-65, 2017.
- PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. *J. Biotec. Biodivers.*, v. 3, p. 146-152, 2012.
- PRASAD, R.; SHIVAY, Y. S. Oxalic acid/oxalates in plants: from self-defence to phytoremediation. *Curr. Sci.*, v. 112, p. 165-167, 2017.
- RATKALKAR, V. N.; KLEINMAN, J. G. Mechanisms of stone formation. *Clin Rev Bone Miner Metab.*, v. 9, n. 3-4, p. 187-197, 2011.
- RYAN, P., DELHAIZE, E., & JONES, D. function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, n. 52, v.1, p.527-560, 2001.
- STEINBRUN, D. S. E.; BRIONES, L. M. Litiasis renal e hipercalciuria en la infancia. *Med. Infan.*, v. 18, p. 355-364, 2011.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Nutrição e Saúde

PAPEL DA GRELINA NO ESTÔMAGO DA PROLE DE RATOS SUBMETIDOS AO DESMAME PRECOCE: UM REVISÃO DE LITERATURA

M. A. S. da COSTA¹, M. E. da SILVA¹, J. A. da SILVA GOMES¹, J. M. de CARVALHO¹, G. H. F. GUEDES¹, M. L. F. de OLIVEIRA¹, D.S. COSTA¹, J.P. de MEDEIROS¹, F. C. A. M. TENÓRIO¹ e S.P LEITE¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Histologia e Embriologia

E-mail para contato: marcosxp17@gmail.com

RESUMO – *No início do período neonatal o leite materno fornece ao neonato uma solução rica em proteínas, imunoglobulinas e fatores tróficos importantes para o desenvolvimento do corpo e evolui gradativamente para um padrão alimentar adulto. Entretanto, quando o desmame ocorre de forma abrupta pode acarretar danos morfofisiológicos e comportamentais no organismo. Quando a amamentação é interrompida pelo desmame precoce, a proliferação e diferenciação celular mudam na mucosa gástrica e os mecanismos reguladores podem envolver atividade da grelina. O presente estudo trata-se de uma revisão narrativa cujo o objetivo deste estudo é caracterizar os principais achados na literatura, que relatam a ação da grelina frente a mucosa gástrica da prole de ratos que foram submetidos ao desmame precoce. Foram encontrados, 554 artigos nas 4 bases de dados (Pubmed, BVS, Scielo e Science direct). Foram utilizadas as palavras-chave: desmame precoce, grelina e ratos. No entanto, após aplicar os critérios de inclusão / exclusão, restaram apenas 3 artigos. Como resultado observou-se que o desmame precoce aumentou os níveis de grelina no estômago e faz parte do controle da proliferação celular, essencial para o crescimento do estômago tendo em contrapartida expressão da grelina gástrica e na concentração plasmática de grelina apresentou-se em níveis baixos quando o desmame é tardio. Portanto, sugeriu-se que a grelina possa constituir um viés hormonal entre o tempo da amamentação e o desenvolvimento do peso corporal.*

Palavras-chave: Mucosa gástrica, grelina, amamentação

ABSTRACT - *At the beginning of the neonatal period or breast milk, it is possible to use a solution rich in proteins, immunoglobulins, and trophic factors important for the development of the body and gradually evolve into an adult eating pattern. However, when weaning occurs abruptly, it can cause morphophysiological and behavioral damage in the body. When breastfeeding is interrupted by early weaning, cell proliferation and differentiation are affected by the gastric mucosa and the regulatory mechanisms that may involve ghrelin activity. The present study deals with a narrative*



review whose objective of this study is to characterize the main articles found in the literature, which relate the action of ghrelin before a gastric mucosa of the group of rats that were submitted to early weaning. 554 articles were found in the 4 databases (Pubmed, BVS, Scielo and Science direct). We used the keyword: early weaning, ghrelin and rats. However, after applying the inclusion/exclusion requirements, only 3 articles remained. As a result, if early weaning increases the levels of ghrelin in the stomach and is part of the control of cell proliferation, essential for the growth of the stomach that suffers in return, expression of gastric ghrelin, and the plasma concentration of ghrelin is displayed at low levels. when weaning is late. Therefore, we suggest that ghrelin may constitute a hormone between the time of breastfeeding and the development of body weight.

Keywords: gastric mucosa, ghrelin, breast-feeding

1. INTRODUÇÃO

O aleitamento exclusivamente materno, é uma atividade que vai além da nutrição da criança, é responsável por auxiliar no desenvolvimento da criança, no nível social, imunológico e psíquico, é a melhor alimento para o lactente nos primeiros seis meses, devido a sua complexidade nutricional e seu auxílio no desenvolvimento e crescimento da criança, além de proteger e beneficiar a saúde da mãe (Azevedo, R. C. T., 2020; Martins, Q. C. M., *et al.* 2020). No início do período neonatal, a composição do leite materno é rica em proteínas, imunoglobulinas e fatores tróficos importantes para o desenvolvimento do corpo, e evolui gradativamente para um padrão alimentar adulto (Weaver, L. T., 1986).

A interrupção da lactação antes dos seis meses de vida é considerada “desmame precoce” (DP), um estado estressante que prejudica os bebês principalmente porque está associado a doenças gastrointestinais e das vias aéreas, desnutrição, obesidade e diabetes (Harder, T. *et al.* 2005). O DP induz mudanças morfofisiológicas na mucosa gástrica dos filhotes (Zonta, G. M. A. 2017). Filhotes submetidos ao DP respondem à privação alimentar com a inibição da proliferação celular (Gama, P., & Alvares, E. P., 2000), Lin, C. H. *et al.* verificaram que, sob essa condição alimentar, ocorre indução da atividade da enzima ornitina descarboxilase (ODC) no estômago, que está envolvida na síntese e acúmulo das poliaminas, necessárias para o crescimento celular rápido. Esses autores sugeriram então que o aumento da atividade da enzima ODC está associado ao crescimento da mucosa gástrica promovido pelo desmame precoce. Osaki, L. H. *et al.* (2010) observaram que o DP induz maturação acelerada da mucosa gástrica, através da diferenciação de células mucosas do colo, além de seus efeitos fisiológicos como a produção de muco por estas células. Embora a maioria dos efeitos do DP tenha sido imediata, essa mudança nutricional na infância pode afetar parte das funções digestivas gástricas de maneira permanente, pois alguns marcadores foram mantidos desequilibrados na idade adulta (Teles Silva, M., *et al.* 2020).

Em conjunto, essas informações mostram que quando o aleitamento materno deixa de ser exclusivo dentro dos seis primeiros meses, irá desencadear mudanças no desenvolvimento normal do trato gastrintestinal da prole, alterando sua morfologia e função, e sugerem que o leite por meio de suas moléculas possui papel modulador do crescimento e da renovação da mucosa gástrica (turnover) (Gama, P., & Alvares, E. P., 2000; . Osaki, L. H. *et al.* 2010; Zonta, G. M. A. 2017; Teles Silva, M., *et al.* 2020).



Quando a amamentação é interrompida pelo desmame precoce, a proliferação e diferenciação celular mudam na mucosa gástrica e os mecanismos reguladores podem envolver atividade da grelina (Bittar, N. M. V. R., *et al.* 2016). A expressão de grelina e receptor de grelina foi encontrada no desenvolvimento de tecidos fetais e neonatais gastrointestinais, e quantidades substanciais de grelina estão presentes no colostro, sugerindo assim seu papel presumível no desenvolvimento perinatal (Kotunia, A., & Zabielski, R. 2006).

Portanto, o objetivo deste estudo é caracterizar os principais achados na literatura, que relatam a ação da grelina frente a mucosa gástrica da prole de ratos que foram submetidos ao desmame precoce.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo é uma revisão narrativa. A pesquisa bibliográfica foi realizada no PUBMED (National Library of Medicine and The National Institute of Health), BVS (Biblioteca Virtual em Saúde), SciELO (Scientific Electronic Library Online), e Science Direct utilizando os seguintes descritores: grelina, desmame precoce e ratos, nos idiomas: inglês e português.

Posteriormente, foram analisados os títulos e resumos de cada artigo. Nesta revisão, foram incluídos artigos originais envolvendo todas as linhagens de ratos submetidos ao desmame precoce. Foram excluídos os artigos duplicados e em que os animais foram submetidos a intervenções farmacológicas ou cirúrgicas e aqueles em que os ratos apresentavam alguma doença ou alteração hormonal. Não houve limites temporais na seleção dos artigos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total foram encontrados, 554 artigos nas 4 bases de dados analisadas. O número de artigos encontrados em cada base de dados, de acordo com a respectiva combinação dos descritores, é mostrado na tabela 1. No entanto, após aplicar os critérios de inclusão / exclusão, restaram apenas 3 artigos.

Tabela 1. Número de artigos encontrados em cada base de dados com a combinação dos descritores.

Combinação das palavras			PubMed	BVS	SciELO	Science Direct
early weaning	ghrelin	rats	17	15	0	522

Ao investigar a distribuição da grelina e seu receptor (GHS-R) no epitélio gástrico de ratos durante o desenvolvimento pós-natal e avaliamos a efeitos do desmame precoce em seus níveis, observou-se, através de reação quantitativa em cadeia da polimerase com transcrição reversa quantitativa, immunoblots e imuno-histoquímica, que grelina e GHS-R são distribuídos na mucosa gástrica durante o desenvolvimento pós-natal, indicando que eles podem sinalizar e funcionar nas células epiteliais. Concluindo assim que o desmame precoce aumentou os níveis de grelina no estômago e faz parte do controle da proliferação celular, essencial para o crescimento do estômago (Bittar, N. M. V. R., *et al.* 2016). Os achados de Mitrović, Olivera *et al.* (2014) demonstraram pela primeira vez expressão duodenal abundante de células e receptores de grelina durante o desenvolvimento pré-natal humano, indicando um papel da grelina na regulação do crescimento e diferenciação do trato gastrointestinal humano.



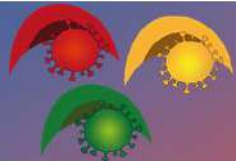
Em contrapartida, ao caracterizar a influência das perturbações do desmame no desenvolvimento das células da grelina, foi estudado o efeito do desmame tardio na expressão grelina gástrica e na concentração plasmática de grelina. Foi visto que a expressão grelina gástrica, por imunocitoquímica e hibridação *in situ*, e as concentrações plasmáticas de grelina, avaliadas por RIA, foram mantidas em um nível mais baixo pelo desmame tardio. Adicionalmente observou-se que a relação entre a expressão da grelina gástrica e o peso corporal foi alterada pelo atraso no desmame. Conclui-se que o desmame tardio exerce uma influência negativa na expressão da grelina e que o início da ingestão de alimentos sólidos pode desencadear a expressão normal da grelina. Portanto, sugeriu-se que a grelina possa constituir um viés hormonal entre o tempo da amamentação e o desenvolvimento do peso corporal (Fåk, F. et al. 2007).

4. CONCLUSÃO

Este trabalho investigou principais achados na literatura, que relatam a ação da grelina frente a mucosa gástrica da prole de ratos que foram submetidos ao desmame precoce. Conclui-se que o desmame precoce aumentou os níveis de grelina no estômago e faz parte do controle da proliferação celular, essencial para o crescimento do estômago tendo em contrapartida expressão da grelina gástrica e na concentração plasmática de grelina apresentou-se em níveis baixos quando o desmame é tardio. Portanto, sugeriu-se que a grelina possa constituir um viés hormonal entre o tempo da amamentação e o desenvolvimento do peso corporal.

5. REFERÊNCIAS

- Azevedo, R. C. T. Aleitamento exclusivamente materno: os benefícios e a proteção legislativa. Repositório de Trabalhos de Conclusão de Curso. (2020).
- Bittar, N. M. V. R. *et al.* (2016). Ghrelin and GHS-R in the rat gastric mucosa: Are they involved in regulation of growth during early weaning?. *Nutrition*, 32(1), 101-107.
- Fåk, F. *et al.* Gastric ghrelin cell development is hampered and plasma ghrelin is reduced by delayed weaning in rats. *Journal of endocrinology*, 192(2), 345-352. (2007).
- Gama, P., & Alvares, E. P. Early weaning and prolonged nursing induce changes in cell proliferation in the gastric epithelium of developing rats. *The Journal of nutrition*, 130(10), 2594-2598. (2000).
- Harder, T. *et al.* Duration of breastfeeding and risk of overweight: a meta-analysis. *American journal of epidemiology*, 162(5), 397-403. (2005).
- Kotunia, A., & Zabielski, R. (2006). Ghrelin in the postnatal development of the gastrointestinal tract. *Journal of physiology and pharmacology*, 57, 97.
- Lin, C. H. *et al.* Induction of gastric ornithine decarboxylase in early weaning rats. *Digestion*, 63(4), 214-219. (2001).
- Martins, Q. C. M., de Brito, S. M., & Pereira, C. A. Aleitamento materno: a importância da amamentação e das ações de enfermagem na prevenção, orientação e solução de dúvidas provenientes do período pós-parto. *HUMANIDADES E TECNOLOGIA (FINOM)*, 1(23), 448-474. (2020).
- Osaki, L. H., Curi, M. A., Alvares, E. P., & Gama, P. Early weaning accelerates the differentiation of mucous neck cells in rat gastric mucosa: Possible role of TGF α /EGFR. *Differentiation*, 79(1), 48-56. (2010).
- Teles Silva, M., *et al.* Immediate and Late Effects of Early Weaning on Rat Gastric Cell Differentiation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1), 196. (2020).

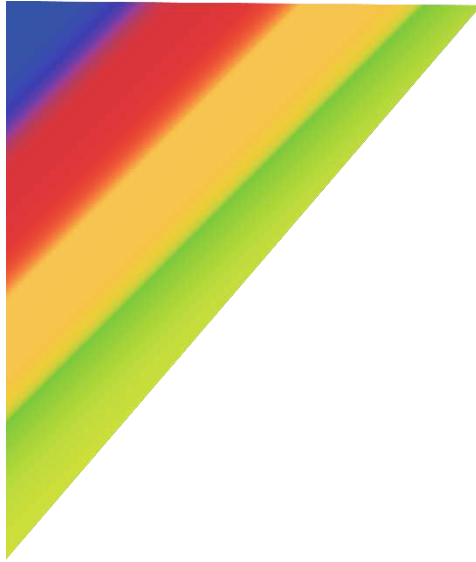


Weaver, L. T. Milk and the neonatal gut: comparative lessons to be learnt. *Equine veterinary journal*, 18(6), 427-429. (1986).

Zonta, G. M. A. Efeitos tardios do desmame precoce sobre a renovação e diferenciação do epitélio gástrico em ratos (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo). (2017).

6. AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado no Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia – UFPE.



PESQUISA CLÍNICA E PRÉ-CLÍNICA



ÁREA DE SUBMISSÃO: Pesquisa clínica e pré-clínica

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DA GALECTINA 7 EM PACIENTES COM MIELOMA MÚLTIPLO E SUA CORRELAÇÃO COM DADOS CLÍNICOS DA DOENÇA

L. V. N. CARVALHO¹, R. A. ASSIS², M. G. R. PITTA¹, J. B. M. RÊGO¹

¹Laboratório de Imunodulação e Novas Abordagens Terapêuticas –LINAT, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.

² Serviço de hematologia do Hospital de Câncer de Pernambuco, Recife, Brazil.

E-mail para contato: lidiane.vasconcelos@gmail.com

RESUMO – O Mieloma Múltiplo (MM) é uma malignidade hematopoiética que possui como característica principal a proliferação clonal de plasmócitos na medula óssea e como consequência, diversos sinais e sintomas relacionados. Seu estabelecimento e sustentação se dá através da dependência com o estroma medular, no qual os plasmócitos neoplásicos interagem com as células do microambiente induzindo a expressão de diversas moléculas levando a malignidade e resistência. Dentre as moléculas envolvidas no estabelecimento, progressão e agressividade do MM destacam-se as proteínas ligadoras de b-galactosídeos, conhecidas como galectinas. As galectinas (GAL) são uma grande família de proteínas que interagem com carboidratos e sua expressão pode ser associada aos parâmetros da doença. Diante deste contexto, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a expressão da galectina 7 em plasma de pacientes recém-diagnosticados e suas associações com os parâmetros clínicos e laboratoriais. Para tal, amostras de sangue periférico de 40 pacientes atendidos no serviço de oncohematologia do Hospital de Câncer de Pernambuco-HCP foram coletadas. Além destas, amostras de 30 indivíduos saudáveis foram utilizados como controle. O sangue periférico foi coletado em tubos de EDTA e a separação do plasma se deu por centrifugação. A análise da expressão plasmática evidenciou uma maior expressão da Galectina 7 em pacientes quando comparadas ao grupo controle ($p= 0.0239$). Foi possível observar também duas correlações negativas com índices hematológicos (hemoglobina e hematócrito), além de quatro correlações positivas moderadas com parâmetros de agressividade para doença (Uréia, Creatinina, VSH e B₂ microglobulina).

1. INTRODUÇÃO

O mieloma múltiplo (MM) é uma neoplasia mais comum em adultos acima de 65 anos e é considerada uma doença do idoso. É responsável por 10% dos distúrbios hematológicos malignos e



curso com a proliferação clonal plasmocitária na medula óssea e na maioria das vezes com a presença de uma proteína monoclonal quantificável no sangue e/ou urina e diversos danos orgânicos relacionados. Dentre os principais danos está a destruição óssea, insuficiência renal, anemia e hipercalemia (RAJKUMAR, 2016).

O MM surge a partir de uma proliferação pré-maligna assintomática de células plasmáticas derivadas de células B no centro pós-germinativo. Alterações genéticas, mudanças ambientais e microambientais levam à transformação dessas células em neoplásicas. Essas células além de alterar a homeostase medular também se envolvem em uma cascata de modificações, que inclui a disseminação de células neoplásicas para microambientes permissivos anatomicamente distantes (HOU et al., 2019). No tecido hematopoiético, diversas proteínas desempenham um papel fisiológico importante na medula óssea e no microambiente, criando interações específicas entre as células hematopoiéticas e estromais sustentando a formação de um nicho microambiental permissivo (KAWANO et al., 2015; RABIVINOVICH e VIDAL, 2011). Dentre essas moléculas estão as galectinas.

As galectinas são uma família de lectinas imunoreguladoras que se ligam à beta galactose e são expressas por uma grande variedade de células, elas têm uma gama de funções incluindo a mediação da interação célula-célula, adesão célula-matriz e apoptose (HAUSELMANN e BORSIG, 2014). Vários estudos apontam para um papel das galectinas na regulação das funções das células tumorais, como adesão, invasão e metástase (VASTA, 2012; RABINOVICH e CROCI, 2012). No MM, as galectinas já se mostraram associadas em múltiplos processos biológicos e podem ser um alvo terapêutico atrativo, bloqueando o crescimento tumoral. Nesse sentido, o presente trabalho tem como objetivo inicial a avaliação dos níveis da galectina 7 em plasma de pacientes com mieloma múltiplo e suas associações com parâmetros clínicos da doença.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Pacientes e controles

Após assinatura do TCLE (CAAE: 67445717.3.0000.5205), foram coletadas amostras de 50 pacientes recém diagnosticados e sem tratamento, encaminhados ao ambulatório de Onco-hematologia do Hospital do Câncer de Pernambuco (HCP). Como controles, foram convidados 30 indivíduos saudáveis pareados por sexo e idade, que não estavam em uso de medicamentos imunomoduladores, sem histórico prévio de câncer.

2.2 Coleta de amostras biológicas

Nos pacientes com mieloma múltiplo e nos controles saudáveis, foram coletados 8 mL de sangue periférico em tubo com anticoagulante, ácido etilendiamino tetra-acético (BD Vacutainer®) para dosagens das galectinas pelo método de ELISA. Para tal, após a coleta o sangue total foi centrifugado duas vezes para obtenção do plasma livre de plaqueta e o mesmo foi aliquoteado e armazenado em freezer-80 até a realização da técnica.

2.3 Ensaio imunoadsorvente ligado a enzima (ELISA)

A determinação da concentração de galectina no plasma foi feita pela técnica de ELISA sanduíche utilizando os kits para Gal-7 humano (R&D Systems), seguindo as instruções do fabricante. A análise foi feita no software *GraphPad®Prism* (Graphpad Software Inc, EUA) e as concentrações expressas em pg/ml.



2.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o *GraphPad®Prism6* (Graphpad Software Inc., EUA). As variáveis quantitativas de dois grupos independentes foram comparadas com teste não paramétrico de *MannWhitney U-test*. A correlação entre variáveis foi determinada calculando o coeficiente de correlação de Spearman, foi considerada uma correlação fraca com $r < 0,5$; correlação moderada entre 0.5 a 0.7, correlação forte 0.7 a 0.9 e acima de 0.9 muito forte.

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

A análise plasmática dos níveis das galectina 7 nas amostras permitiu uma observação de seus níveis elevados nos pacientes [7257 (156,5-15966) pg/ml] (**Figura 1**) em relação ao grupo controle [3074 (156.25-6006) pg/ml] pareados pelo mesmo sexo e média de idade. Essa maior expressão mostrou-se estatisticamente significativa com valor de $p=0,0239$.

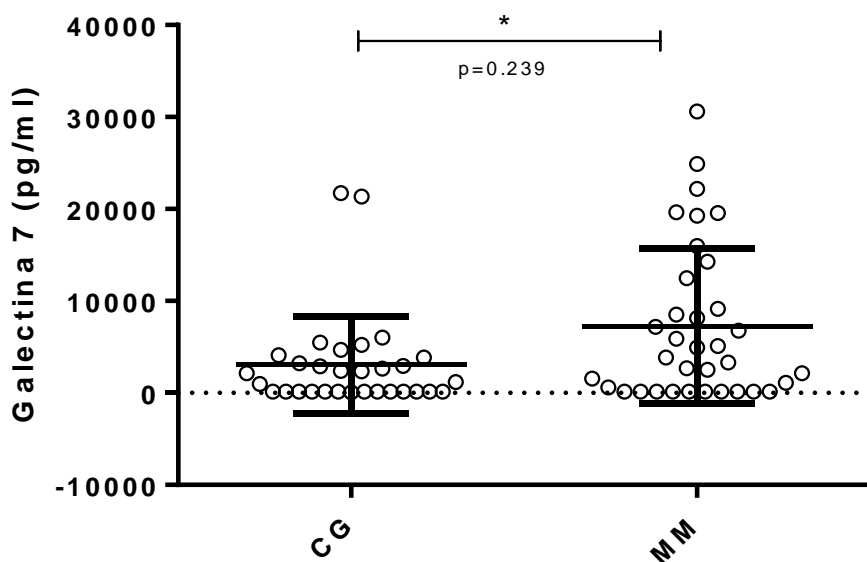


Figura 1. Expressão das galectina 1 em plasma de pacientes diagnosticados com MM e de indivíduos saudáveis. Os valores são dados em pg/mL. CG= grupo controle. MM= pacientes de mieloma múltiplo.

Na análise de correlação do nível da Gal-7 com os dados laboratoriais dos pacientes, foi possível encontrar algumas correlações moderadas. Houve correlação positiva moderada para os valores de creatinina, ureia, VSH e $\beta 2$ microglobulina. Ou seja, quanto maior os níveis de Gal-7 no plasma maior os valores para cada um desses parâmetros indicando maior agressividade da doença. Além disso, houve uma correlação negativa fraca entre os níveis de hemoglobina e hematócrito, porém, com p estatisticamente significativo $p=0.02$ e $p= 0.016$, respectivamente. Dados demonstrados na tabela 1.



Tabela 1. Análise das correlações entre os níveis plasmáticos de galectina 7 com parâmetros bioquímicos e hematológicos dos pacientes com MM.

Galectina 7	Coefficiente de Correlação	Valor de p
Ureia	0,5	0,003
Creatinina	0,7	<0.0001
VSH	0,5	0.005
B ₂	0,5	0.003
Hemoglobina	-0,4	0.02
Hematocrito	-0,4	0.016

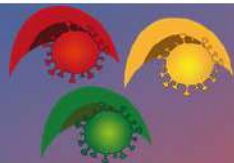
Vários estudos revelaram o papel tumoral da Gal-7 na resposta apoptótica, proliferação celular, diferenciação, migração e adesão (ADVEDISSIAN, DESHAYES E VIGUIER, 2017). Apesar de existirem dezenas de publicações com associações de galectinas no MM, até o presente momento nenhum estudo relacionou a expressão de GAL-7 em pacientes nem seu papel no contexto da doença.

No carcinoma epidermoide oral (CEO), a Gal-7 tem sido associada ao sistema de classificação de malignidade histológica (MESQUITA ET AL., 2016; ALVES et al., 2011). Consistentemente, em linhagens celulares de CEO, a sua regulação negativa reduz a migração e a invasão celular, enquanto sua superexpressão aumenta a migração e a invasão celular de células cancerígenas (GUO E LI, 2017). De maneira semelhante, no câncer epitelial de ovário, vários estudos descreveram uma correlação entre a expressão ectópica da galectina-7 nesse epitélio mono estratificado e a sobrevida geral do paciente (KIM et al., 2013). Além disso, a expressão da Gal-7 foi associada à progressão para tumores de alto grau e foi enriquecida em amostras metastáticas comparadas aos tumores de baixo grau (LABRIE et al., 2016).

Sua superexpressão foi associada ao potencial metastático de vários tecidos tumorais, principalmente no câncer de mama, estando correlacionada com o diagnóstico reservado quando aumentada. Recentemente, usando um modelo de camundongo para tumores mamários HER-2, a expressão de Gal-7 acelerou a progressão tumoral e a formação de nódulos tumorais em tumores positivos para HER-2 (GROSSET et al., 2016).

No contexto da oncohematologia, pouco foi publicado. A expressão ectópica da Gal-7 mostrou correlação com o potencial metastático das linhagens celulares de linfomas transplantados, observações adicionais em doenças linfoides humanas sugeriram correlações entre a progressão do tumor e o acúmulo de Gal-7, enquanto nenhuma expressão foi detectada em tecidos normais (MOISAN et al., 2003; DEMERS et al., 2007; KAUR et al., 2016).

Dada a relevância do papel de Gal-7, o desenvolvimento de inibidores específicos que atingirão seletivamente as funções intracelulares e/ou extracelulares pode ser uma estratégia para inibir processos tumorais específicos mediados por ela.



4. REFERÊNCIAS

- Advedissian T, Deshayes F, Viguier M. Galectin-7 in Epithelial Homeostasis and Carcinomas. *Int J Mol Sci.* 2017;18(12):2760. Published 2017 Dec 19.
- Alves, P.M.; Godoy, G.P.; Gomes, D.Q.; Medeiros, A.M.C.; de Souza, L.B.; da Silveira, E.J.D.; Vasconcelos, M.G.; Queiroz, L.M.G. Significance of galectins-1, -3, -4 and -7 in the progression of squamous cell carcinoma of the tongue. *Pathol. Res. Pract.* 2011, 207, 236–240.
- DEMERS M, et al. Galectin-7 in lymphoma: Elevated expression in human lymphoid malignancies and decreased lymphoma dissemination by antisense strategies in experimental model. *Cancer Res.* 67:2824–2829. 2007.
- Grosset, A.-A.; Poirier, F.; Gaboury, L.; St-Pierre, Y. Galectin-7 Expression Potentiates HER-2-Positive Phenotype in Breast Cancer. *PLoS ONE* 2016, 11, e0166731.
- Guo, J.-P.; Li, X.-G. Galectin-7 promotes the invasiveness of human oral squamous cell carcinoma cells via activation of ERK and JNK signaling. *Oncol. Lett.* 2017, 13, 1919–1924.
- Hou J, Wei R, Qian J, et al. The impact of the bone marrow microenvironment on multiple myeloma (Review) [published online ahead of print, 2019 Aug 5]. *Oncol Rep.* 2019.
- KAUR M et al. Roles of Galectin-7 in Cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 17:455–461. 2016.
- Kim, H.-J.; Jeon, H.-K.; Lee, J.-K.; Sung, C.O.; Do, I.-G.; Choi, C.H.; Kim, T.-J.; Kim, B.-G.; Bae, D.-S.; Lee, J.-W. Clinical significance of galectin-7 in epithelial ovarian cancer. *Anticancer Res.* 2013, 33, 1555–1561.
- Kawano Y, Moschetta M, Manier S, Glavey S, Görgün GT, Roccaro AM, Anderson KC and Ghobrial IM: Targeting the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *Immunol Rev* 263: 160-172, 2015.
- Labrie, M.; Vladioiu, M.C.; Grosset, A.-A.; Gaboury, L.; St-Pierre, Y. Expression and functions of galectin-7 in ovarian cancer. *Oncotarget* 2014, 5, 7705–7721.
- MOISAN S, et al. Upregulation of galectin-7 in murine lymphoma cells is associated with progression toward an aggressive phenotype. *Leukemia.* 17:751–759. 2003.
- Mesquita, J.A.; Queiroz, L.M.G.; Silveira, É.J.D.; Gordon-Nunez, M.A.; Godoy, G.P.; Nonaka, C.F.W.; Alves, P.M. Association of immunoexpression of the galectins-3 and -7 with histopathological and clinical parameters in oral squamous cell carcinoma in young patients. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol.* 2016, 273, 237–243.
- RABINOVICH, G.A.; VIDAL, M. Galectins and microenvironmental niches during hematopoiesis. *Curr. Opin. Hematol.* 18, 443–451. 2011.
- RABINOVICH, G.A.; CROCI, D.O. Regulatory circuits mediated by lectin-glycan interactions in autoimmunity and cancer. *Immunity.* 322–335. 36 2012.
- Rajkumar SV: Myeloma today: Disease definitions and treatment advances. *Am J Hematol* 91: 90-100, 2016.
- KUMAR, S.V et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 15(12):e538-48, 2014.
- VASTA, G.R. Galectins as pattern recognition receptors: structure, function, and evolution. *Advances in experimental medicine and biology.* 946:21-36. 2012.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Pesquisa Clínica e Pré-clínica

ASPECTOS MOLECULARES DA TROMBOSE EM PACIENTES COM COVID-19: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA

I. H. A da SILVA¹, A. H. P. LEITE² e A. M. S. TELLES³

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia;

² Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Médicas, Departamento de Patologia;

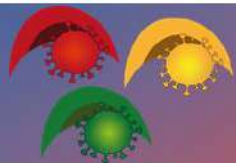
³ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Médica, Departamento Patologia.

E-mail para contato: italohenriquealves7@gmail.com

RESUMO – A Covid-19 apresenta-se como uma virose respiratória de caráter pandêmico. Além das complicações pulmonares relacionadas à essa doença outro evento vem chamando a atenção dos especialistas, a trombose. Este trabalho teve como objetivo realizar uma revisão da literatura sobre os eventos moleculares relacionados à formação da trombose, em pacientes com Covid-19. Para responder a esse objetivo, realizamos uma revisão sistemática da literatura com artigos publicados nessa temática. A busca e a seleção dos artigos foram realizadas nas seguintes bases de dados: PubMed, ScienceDirect e Scielo, entre os meses de Junho e Julho de 2020. Após a utilização dos critérios de inclusão e exclusão estabelecidos foram selecionados 11 artigos originais elegíveis para este trabalho. Estudos demonstram a relação entre a Covid-19 e a formação de trombos intravasculares. Esse evento pode ser explicado pela intensa ativação do sistema imunológico, a chamada “tempestade de citocina”, que contribui para um estado de hipercoagulabilidade sanguínea, resultando na formação dos trombos. O processo de coagulação intravascular é um ponto chave na fisiopatologia da Covid-19, representando um alvo importante para o tratamento desta doença.

Palavras-Chave: Coronavírus, hipercoagulação, trombo.

ABSTRACT – Covid-19 presents itself as a respiratory virus of a pandemic character. In addition to pulmonary complications related to this disease, another event has been drawing the attention of specialists, thrombosis. This study aimed to perform a literature review on the molecular events related to the formation of thrombosis in patients with Covid-19. To answer this objective, we conducted a narrative review of the literature with articles published on this topic. The search and selection of articles were carried out in the following databases: PubMed, ScienceDirect and Scielo, between the months of June and July 2020. After using the established inclusion and exclusion criteria, 11 original articles eligible for this work were selected. Studies demonstrate the relationship between Covid-19 and the formation of intravascular thrombi. This event can be explained by the intense activation of the immune system, the called “cytokine storm”, which



contributes to a state of blood hypercoagulability, resulting in the formation of thrombi. The intravascular coagulation process is a key point in the pathophysiology of Covid-19, representing an important target for the treatment of disease.

Keywords: Coronavirus, hypercoagulation, thrombus.

1. INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019, a Organização Mundial da Saúde (OMS) foi notificada sobre eventos de pneumonia, de causas desconhecidas, na cidade de Wuhan, na China. Esses eventos pulmonares foram denominados de Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2 (SARS-Cov-2), também conhecida como Covid-19, causada pelo novo Coronavírus (CHEN et al., 2020; SHEN et al., 2020).

Até o presente momento, aproximadamente 14.951.347 de pessoas foram diagnosticadas mundialmente com essa virose, com mais de 616.000 mortes em todo o mundo. Esses dados refletem a emergência de saúde pública mundial atual, caracterizando essa patologia como uma pandemia (LOTFOLLAH et al., 2020).

Relatórios clínicos iniciais estabeleceram que a Covid-19 apresenta-se como uma doença respiratória febril aguda, como uma característica dominante de doença sistêmica que acomete múltiplos órgãos e sistemas. Mas, o espectro completo das manifestações e complicações desta doença ainda não está completamente estabelecido. As manifestações clínicas variam de doença assintomática ou leve, à grave, podendo evoluir com sepse e morte (WEI et al., 2020).

Nos casos mais graves da doença observa-se falência pulmonar, com dano alveolar difuso, edema, inflamação e hiperplasia de pneumócitos do tipo II, dados estes compatíveis com a Síndrome Respiratória Aguda Grave. Estes pacientes evoluem com desconforto respiratório, hipóxia, e necessidade de intubação e de ventilação mecânica (ARENTZ et al., 2020).

As alterações das funções orgânicas observadas durante a infecção pelo novo Coronavírus estão relacionadas à ativação da resposta imune não adaptativa, do qual o sistema complemento é parte integrante. Por se tratar de uma doença sistêmica, a Covid-19 apresenta complicações não apenas pulmonares, mas em outros sistemas, como por exemplo o sistema de coagulação sanguínea. Dados preliminares demonstram que pacientes infectados desenvolvem redução na produção de plaquetas (trombocitopenia) (36,2%) e podem apresentar elevação dos fragmentos da degradação da fibrina, como o dímero D (44,4%), sendo esses valores mais elevados de acordo com a gravidade da doença (FAZZAH et al., 2020).

Os efeitos do novo Coronavírus sobre a cascata de coagulação vem sendo avaliados por meio de ensaios pré-clínicos e clínicos. Diversos estudos vêm demonstrando a necessidade de uma melhor compreensão das complicações trombóticas em pacientes com Covid-19, tendo em vista a crescente relação entres os portadores desta doença e os eventos tromboembólicos apresentados. Assim, o objetivo deste trabalho foi elaborar uma revisão da literatura sobre os mecanismos de formação da trombose em pacientes com a Covid-19.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho caracteriza-se como uma revisão sistemática da literatura. Para a obtenção dos resultados qualitativos deste estudo foi realizada uma busca de artigos científicos nas seguintes bases de dados: PubMed, ScienceDirect e Scielo. A seleção deu-se por meio da utilização



de descritores fornecidos pela plataforma “Descritores em Ciências da Saúde – DeSC”. Os descritores utilizados foram: Coronavirus, SARS Virus, Coronavirus Infections, Thrombosis e Anticoagulants, que foram cruzados entre si por meio do operador booleano “AND”. A busca e seleção dos artigos foram realizadas nos meses de Junho e Julho de 2020, por dois pesquisadores independentes, sendo complementada por um terceiro pesquisador, quando necessário. Como critérios de inclusão dos artigos, na pesquisa, estabeleceu-se artigos originais escritos em inglês, publicados no ano de 2020 e que abordassem o tema proposto.

Os critérios de exclusão foram: artigos de revisão da literatura, enciclopédias, capítulos de livros, resumos publicados em anais, artigos incompletos e com metodologias duvidosas. O processo de seleção dos artigos seguiu os seguintes passos metodológicos: (1) leitura dos títulos. Os artigos recuperados após a utilização dos descritores foram filtrados mediante a leitura dos respectivos títulos; (2) leitura dos resumos. Após a leitura dos títulos, os artigos selecionados foram avaliados pelos resumos. Nessa etapa, os pesquisadores deram maior atenção ao objetivo e às metodologias; (3) leitura completa dos artigos. Os artigos selecionados nessa etapa foram utilizados para a estruturação textual deste trabalho. As etapas do processo de seleção, bem como o número de artigos selecionados em cada etapa estão esquematizadas na tabela 1.

Tabela 1: Esquematização da seleção de artigos nas bases de dados analisadas.

Bases de dados utilizadas		
PubMed	ScienceDirect	SciELO
<p>Descritores: Coronavirus (22,876 artigos) Coronavirus and SARS virus (3,173 artigos) Coronavirus and SARS virus and Coronavirus infections (1,996 artigos) Coronavirus and SARS virus and Coronavirus infections and Thrombosis (26 artigos) Coronavirus and SARS virus and Coronavirus infections and Thrombosis and Anticoagulants (6 artigos)</p> <p>Total = 6 artigos</p>	<p>Descritores: Coronavirus (24,926 artigos) Coronavirus and SARS virus (10,284 artigos) Coronavirus and SARS vírus and Coronavirus infections (9,181 artigos) Coronavirus and SARS virus and Coronavirus infections and Thrombosis (569 artigos) Coronavirus and SARS virus and Coronavirus infections and Thrombosis and Anticoagulants (26 artigos)</p> <p>Total = 26 artigos</p>	<p>Descritores: Coronavirus (610 artigos) Coronavirus and SARS virus (104 artigos) Coronavirus and SARS virus and Coronavirus infections (48 artigos) Coronavirus and SARS virus and Coronavirus infections and Thrombosis (5 artigos) Coronavirus and SARS virus and Coronavirus infections and Thrombosis and Anticoagulants (4 artigos)</p> <p>Total = 4 artigos</p>
Seleção dos artigos mediante leitura dos títulos (4 artigos)	Seleção dos artigos mediante leitura dos títulos (20 artigos)	Seleção dos artigos mediante leitura dos títulos (3 artigos)
Seleção dos artigos mediante leitura dos resumos (2 artigos)	Seleção dos artigos mediante leitura dos resumos (10 artigos)	Seleção dos artigos mediante leitura dos resumos (1 artigos)



Seleção após leitura completa dos artigos (1 artigos)	Seleção após leitura completa dos artigos (5 artigos)	Seleção após leitura completa dos artigos (0 artigos)
--	--	--

Quantitativo final dos artigos selecionados para a realização do estudo

6 artigos científicos

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo realizar um levantamento bibliográfico sobre a relação da Covid-19 e os eventos trombotogênicos que vem sendo observados na rotina médica. Com os critérios de seleção utilizados, para a busca e inclusão dos artigos científicos, foram selecionados 6 (seis) artigos originais, desenvolvidos e disponibilizados no ano de 2020. As informações mais relevantes destes trabalhos estão descritas no quadro 1.

Quadro 1: Principais informações contidas nos artigos selecionados após adoção dos critérios metodológicos (n = 6).

Autor/Ano	Objetivo	Resultados	Conclusão
Longchamp et al., 2020.	Determinar a prevalência de tromboembolismo venoso em pacientes com Covid-19 grave utilizando ultrassonografia venosa de membros inferiores.	32% dos pacientes analisados tiveram tromboembolismo venoso; 24% evoluíram com trombose venosa profunda e 20% tiveram embolismo pulmonar. Nenhum dos pacientes analisados tinham histórico de trombose.	Neste estudo a prevalência de tromboembolismo entre os portadores da Covid-19 foi elevada (32%). Os eventos tromboticos ocorreram no início da doença.
Kananeh et al., 2020.	Apresentar 3 casos de derrames isquêmicos e 1 infarto venoso de uma trombose do seio venoso cerebral na configuração da infecção pelo novo Coronavirus.	Houve três casos de acidente vascular cerebral arterial isquêmico e um caso de acidente vascular cerebral venoso: três homens e uma mulher. Todos os casos de acidente vascular arterial apresentaram grande oclusão do vaso e foi realizado trombectomia mecânica.	É importante reconhecer as manifestações neurológicas da Covid-19, principalmente o acidente vascular cerebral isquêmico, de natureza arterial ou venoso. A hipercoagulabilidade e o aumento de citocinas são provavelmente as causas do acidente vascular isquêmico, nesses pacientes.
Grosse et al., 2020.	Avaliar o espectro de doenças cardiopulmares da Covid-19 com bases em autópsias.	O dano alveolar difuso bilateral foi observado em todos os pacientes analisados. Quadros de broncopneumonia aguda estavam presentes em 11	Este estudo mostra que a broncopneumonia aguda pode ser encontrada em um número considerável em pacientes com Covid-19. Além disso, uma elevada



		dos 14 pacientes. Um achado importante foi a presença de oclusões vasculares por trombose.	incidência de quadros de trombose é observada em quadros graves de Covid-19.
López et al., 2020.	Descrever quatro pacientes com Covid-19 que apresentaram acidente vascular encefálico isquêmicos.	A associação entre a Covid-19 e o acidente encefálico isquêmico foi provavelmente causal em dois pacientes, que apresentavam hipercoagulabilidade e inflamação sistêmica.	A inflamação sistêmica e a ação direta do vírus, podem causar disfunção endotelial resultando em um estado de hipercoagulação podendo estar relacionado ao acidente vascular encefálico (AVE) isquêmico. Com tudo, o AVE envolve múltiplas fisiopatologias. Portanto, estudos com amostras maiores são necessários para confirmar essa associação.
Choudry et al., 2020.	Descrever os aspectos demográficos, angiográficos e procedimentais, bem como dos resultados clínicos de casos consecutivos de infarto do miocárdio positivo para Covid-19.	Os pacientes com infarto do miocárdio que apresentaram infecção concomitante com Covid-19 apresentaram níveis mais elevados de Troponina T, menor contagem de linfócitos, mas elevação do dímero-D e proteína C reativa.	Nos pacientes que apresentaram infarto do miocárdio e Covid-19 houve um forte sinal de maior carga de trombo. Mais trabalhos são necessários para o entendimento dos mecanismos de formação da trombose em pacientes com Covid-19.
Carsana et al., 2020.	Descrever os achados histopatológicos do pulmão de pacientes que faleceram de Covid-19.	Todos os casos analisados apresentaram congestão capilar, necrose de pneumócitos. Além disso 37 casos apresentaram edema intra-alveolar e 33 casos apresentaram quadros de trombose.	O padrão predominante de lesões pulmonares em pacientes com Covid-19 é o dano alveolar difuso. A presença de trombos em pequenos vasos arteriais é consistente com coagulopatia, que parece ser comum em pacientes com Covid-19 e deve ser um dos principais alvos da terapia.

Diversas linhas de investigação demonstram uma tendência pró-coagulante associada à Covid-19, que promove eventos trombogênicos micro e macro vasculares, tanto no sistema venoso quanto no sistema arterial. Acredita-se que a trombose seja secundária ao processo inflamatório, à ativação plaquetária, à estase e à disfunção endotelial. Esses dados são corroborados por evidências histológicas de microangiopatias trombóticas em estudos *post-mortem* (KLOK et al., 2020).

A trombose pode provocar uma isquemia local, micro hemorragia e inflamação que, no pulmão são consistentes com as observações de que alguns pacientes apresentam hipóxia com complacência pulmonar relativamente preservada. Além disso, a micro angiopatia trombótica pode estar subjacente à lesão renal aguda que afeta até 25,2% dos pacientes internados em unidades de terapia intensiva com Covid-19 (GATTINONI et al., 2020).

Em alguns pacientes, a resposta inflamatória é altamente pronunciada, desencadeando uma “tempestade de citocinas” e considerável ativação dos linfócitos T, com níveis elevados de



proteínas pró-inflamatórias como a interleucina 6 (IL-6), a ferritina e a proteína C reativa (PCR), estando esses achados estritamente relacionados a elevadas taxas de mortalidade (PROMPETCHARA et al., 2020).

A “tempestade de citocinas”, que geralmente ocorre entre cinco e sete dias após o início dos sintomas, promove a disfunção endotelial. Com isso há a ativação da cascata de coagulação sanguínea, bem como a ativação de plaquetas, mediada pela IL-6 e pelo fator tecidual. Além disso a disfunção endotelial também pode ser favorecida pela invasão viral direta em células endoteliais, por meio da interação entre a proteína S do Coronavírus e receptores expressos no endotélio vascular como a enzima conversora de angiotensina 2, a ACE2, e pela estase promovida pela inflamação permanente, completaria os critérios da tríade de Virchow (DIMITRIOS et al., 2020).

Com a lesão endotelial, há o aumento na produção de trombina e posterior síntese de fibrina, com redução da fibrinólise, eventos que contribuem para o estado de hipercoagulabilidade. Além disso, pode haver elevação nos números das plaquetas (trombocitose), bem como elevação do D-dímero e do fibrinogênio, com critérios de coagulação disseminada intravascular frequentemente preenchidos. Esses fatores podem explicar a elevada taxa de complicações trombóticas observadas em pacientes com Covid-19 (ZHOU et al., 2020).

4. CONCLUSÃO

A desregulação da cascata de coagulação e a subsequente formação de coágulos intra-alveolares ou sistêmicos de fibrina são achados proeminentes nas infecções por coronavírus associadas à doença respiratória grave e foram demonstradas em modelos humanos e animais. Eles podem ser atribuídos à resposta protrombótica, que tenta impedir a hemorragia alveolar difusa, mas pode resultar em formação de coágulo evidente com efeitos prejudiciais na recuperação e sobrevivência do paciente.

5. REFERÊNCIAS

A, M., Y, E., K, L. Characteristics and Outcomes of 21 Critically Ill Patients With COVID-19 in Washington State. *N Engl J Med.*, v. 323, p. 1612-1614, 2020.

C, H.; G, J.; W, C. Clinical characteristics and intrauterine vertical transmission potential of COVID-19 infection in nine pregnant women: a retrospective review of medical records. *Lancet.*, v. 395, p. 809-815, 2020.

D, G., IA, Z., P, G. Coagulation disorders in coronavirus infected patients: COVID-19, SARS-CoV-1, MERS-CoV and lessons from the past. *Journal of Clinical Virology.*, v. 127, 2020.

FA, D., SM, H., KS, R. High Thrombus Burden in Patients with COVID-19 Presenting with ST-Elevation Myocardial Infarction. *Journal of the American College of Cardiology.*, 2020.

G, L., C, D., C, P. COVID-19 pneumonia: different respiratory treatments for different phenotypes? *Intensive Care Med.*, v. 46, p. 1099-1102, 2020.



KF, A., K, M., NJ, M. Confirmation of the high cumulative incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19: Na updated analysis. *Thrombosis research.*, v. 191, p. 148-150, 2020.

L, D.; H, J.; M, T.; A, R. COVID-19 Presented With Deep Vein Thrombosis: An Unusual Presenting. *Journal of Investigative Medicine.*, v. 8, p. 1-4, 2020.

P, E., K, C., P, T. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic. *Asian Pac J Allergy Immunol.*, v. 38, p. 1-9, 2020.

S, K.; Y, Y.; W, T. Diagnosis, treatment, and prevention of 2019 novel coronavirus infection in children: experts' consensus statement. *World J Pediatr.*, v. 16, p. 223-231, 2020.

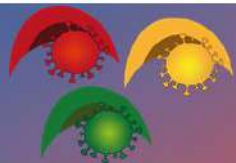
W, J.; G, Z.; Y, Ni.; Y, Hu.; W, H.; LC, Q. China Medical Treatment Expert Group for Covid-19. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med.*, v. 382, p. 1708-1720, 2020.

Z, F., Y, T., D., RF, G., L, Y., L, Z. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet.*, v. 395, p. 1054-1062, 2020.

L, A., L, J., BM, S. Venous thromboembolism in critically ill patients with COVID-19: Results of a screening study for deep vein thrombosis. *RPTH.*, v. 4, n. 5, p. 842-847, 2020.

G, C., G, A., F, S, J, H., D, W, M. Analysis of cardiopulmonary findings in COVID-19 fatalities: High incidence of pulmonary artery thrombi and acute suppurative bronchopneumonia. *Cardiovascular Pathology.*, 2020.

LB, J, M., GR, I., M, M, C., RF, J, C. Ischaemic stroke and SARS-CoV-2 infection: a causal or incidental association?. *Neurología.*, v. 35, n. 5, p. 295-302, 2020.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Pesquisa Clínica e Pré-clínica

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES STRESSES MICROAMBIENTAIS NA MIGRAÇÃO DA LINHAGEM DE CÂNCER DE MAMA MDA-MB-231

R. S. MIGUEL^{1,2}, A. F. S. FILHO² e M. J. B. M. RÊGO Jr^{1,2}

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica e Fisiologia;

² Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), Departamento de Bioquímica e Fisiologia;

E-mail para contato: faelmiguel@hotmail.com

RESUMO – *O câncer de mama é a forma mais comum dessa doença em mulheres, tendo alta mortalidade e morbidade. A maioria dos cânceres de tecidos sólidos possui regiões de hipóxia, devido à baixa angiogênese e alta taxa de proliferação celular. Esse microambiente influencia no comportamento celular, aumentando a agressividade, a capacidade metastática e a resistência a quimioterapia por meio da modulação da expressão de diversas proteínas. Com isso, foi avaliado a modulação exercida pelos fatores do microambiente tumoral hipóxia e privação de soro fetal bovino (SFB) sobre a motilidade nas células do câncer mamário MDA-MB-231. Para isso, avaliamos a migração das células por meio do ensaio de wound healing, nas condições de hipóxia e/ou privação de SFB. Foi observado que as células submetidas a privação simultânea de oxigênio e SFB, e principalmente aquelas submetidas apenas a hipóxia apresentaram aumento da motilidade celular. A análise dos resultados indica que privação de oxigênio é um potencial determinante para o aumento da motilidade celular tumoral mamária neste modelo.*

Palavras chave: MDA-MB-231, migração, privação de soro fetal bovino

ABSTRACT - *Breast cancer is the most common form of this disease in women, with high mortality and morbidity. Most cancers of solid tissues have regions of hypoxia, due to low angiogenesis and high rate of cell proliferation. This microenvironment influences cellular behavior, increasing aggressiveness, metastatic capacity and resistance to chemotherapy by modulating the expression of several proteins. With that, the modulation exerted by the factors of the hypoxia tumor microenvironment and deprivation of fetal bovine serum (SFB) on motility in breast cancer cells MDA-MB-231 was evaluated. For this, we evaluated the migration of the cells through the wound healing assay, under conditions of hypoxia and / or SFB deprivation. It was observed that cells subjected to simultaneous deprivation of oxygen and SFB, and especially those submitted only to hypoxia, showed increased cellular motility. The analysis of the results indicates that oxygen deprivation is a potential determinant for the increase of mammary tumor cell motility in this*

model.

Keywords: MDA-MB-231, migration, fetal bovine serum deprivation

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama representa a neoplasia mais significativa entre as mulheres ao redor do mundo, depois do câncer de pele não melanoma (INCA, 2020). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer, este tumor corresponde a 29% dos casos diagnosticados por ano, tendo sido esperado quase 60 mil casos só no ano de 2020. Apesar de haver variação na taxa de sobrevivência, nos países em desenvolvimento a sobrevida é inferior a 40% (Akram, 2017).

No processo de crescimento tumoral mamário, a multiplicação celular exacerbada promove a privação nutricional, falta de oxigênio e elevado estresse oxidativo devido a angiogênese retardada (Oliveira, 2015). Este microambiente têm sido estudado devido a sua influência sobre a regulação da expressão de diversos genes e sobre o comportamento das células malignas (Liu, 2015). Com base nisto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do microambiente tumoral mamário, especificamente hipóxia e privação de nutrientes, sobre a motilidade celular.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A linhagem celular MDA-MB-231 foi adquirida a partir do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram cultivadas em meio L15-F12 (Gibco, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), sendo mantida em atmosfera úmida com 5% de CO₂ à 37°C. A condição de hipóxia foi estabelecida em câmara de hipóxia à 37°C com 95% de N₂ e 5% de CO₂, sendo PO₂<1%. No ensaio de migração, a linhagem foi semeada a uma densidade de 3x10⁵ por poço em placa de 24 poços, sendo incubada por 24 horas nas condições atmosféricas da estufa descritas anteriormente. Após esse período, foi realizado uma ferida (risco) em forma de cruz. Na sequência, sob um microscópio acoplado a um sistema de captura de imagens, fotos foram feitas no tempo inicial zero (imediatamente à submissão das condições experimentais) e após 24 horas. Os resultados da área livre foram analisados através do programa ImageJ.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através das análises foi possível observar que a condição hipóxica associada ou não a privação de nutrientes promoveu o aumento da migração da célula mamária MDA-MB-231, principalmente na condição de hipóxia isolada no período de 24h (Figura 1 E-F), onde a área livre foi reduzida.

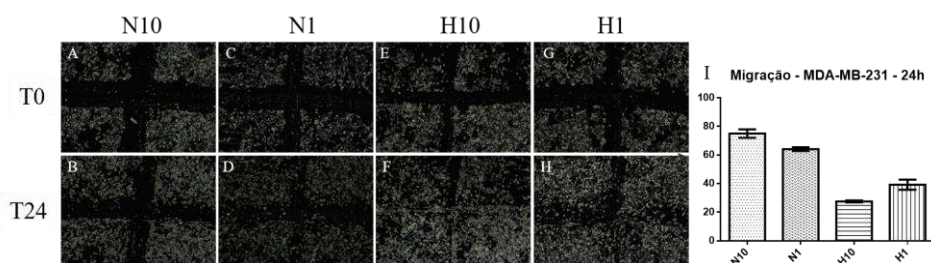


Figura 1 – Em (I) o Ensaio de Migração (*Wound healing*) da célula mamária MDA-MB-231 no período de 24h, onde N10 – Normóxia com soro fetal bovino; N1 – Normóxia e privação de soro fetal bovino; H10 – Hipóxia com soro fetal bovino; H1 – Hipóxia com soro fetal bovino; e em (II) o gráfico correspondente.



A evolução do câncer de mama não consiste apenas na proliferação celular, mas também em alterações no estroma e no microambiente tumoral. Alteração de vários componentes desse ambiente favorece a progressão e metástase do tumor. (Soysal, 2015). A hipóxia desempenha um papel relevante na alteração de vias metabólicas, além de estar relacionado a promoção da sobrevivência celular e indução de transição epitélio-mesênquima (Xiang, 2019).

Liu *et al.* (2014) demonstrou que Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) estabiliza o Fator Induzido por Hipóxia-1 α (HIF-1 α) via ERK 1/2 e que o acúmulo de HIF-1 α estaria associado ao aumento da capacidade migratória e invasiva na célula MDA-MB-231.

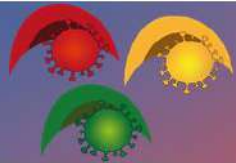
Em nossos achados, a associação entre a hipóxia e a privação de SFB diminuiu a área livre de célula, mas não tão expressivo quando a condição de hipóxia isolada. Foi verificado que em reposta a retirada do SFB ocorre a supressão da apoptose e o aumento a migração e invasão da linhagem celular MDA-MB-231 (Zheng, 2006; Ye, 2013)

4. CONCLUSÃO

O microambiente hipóxico desempenha função essencial no desenvolvimento tumoral através da indução da migração na linhagem mamária investigada, revelando o papel crucial que a hipóxia desempenha na sobrevivência celular e na capacidade metastática.

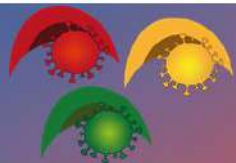
5. REFERÊNCIAS

- AKRAM, M.; IQBAL, M.; DANİYAL, M.; KHAN, A. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol. Res.*, v. 50, n. 33, 2017.
- LIU, Z.; SEMENZA, G.; ZHANG, H. Hypoxia-inducible factor 1 and breast cancer metastasis, *J. Zhejiang Univ-Sci. B.*, v. 15, p. 32-43, 2015
- LIU, Y.; CUI, Y.; SHI, M.; ZHANG, Q.; WANG, Q.; CHEN, X. Deferoxamine Promotes MDA-MB-231 Cell Migration and Invasion through Increased ROS-Dependent HIF-1 α Accumulation, *Cell. Physiol. and Biochem.*, v. 33, p. 1036-1046, 2014.
- Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Tipo de câncer: Mama. INCa: Rio de Janeiro. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancerde-mama>
- OLIVEIRA, J.; RIBEIRO, C.; BARROS, R.; GOMES, C.; MATOS, A. J.; REIS, C. A.; RUTTEMAN, G. R.; GARTNER, F. Hypoxia Up-Regulates Galectin-3 in Mammary Tumor Progression and Metastasis, *Plos One*, v. 10, 2015.
- SOYSAL, S. D.; TZANKOV, A.; MUENST, S. E. Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer, *Pathobiology*, v. 82, p. 142–152, 2015.
- XIANG, L.; SEMENZA, G. L. Hypoxia-inducible factors promote breast cancer stem cell specification and maintenance in response to hypoxia or cytotoxic chemotherapy, *Adv. Cancer Res.*, v. 141, p. 175-212, 2019.
- YE, Q.; KANTONEN, S.; CAMBRONERO, J. G. Serum deprivation confers the MDA-MB-231 breast cancer line with an EGFR/JAK3/PLD2 system that maximizes cancer cell invasion, *J. Mol. Biol.*, v. 425, p. 755-66, 2013
- ZHENG, Y.; RODRIK, V.; TOSCHI, A.; SHI, M.; HUI, L.; SHEN, Y.; FOSTER, D. A. Phospholipase D Couples Survival and Migration Signals in Stress Response of Human Cancer Cells, *J. Biol. Chem.* v. 281, p. 15862–15868, 2006.



6. AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão do auxílio financeiro.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Pesquisa clínica e Pré-clínica

AVALIAÇÃO DAS MOLÉCULAS NITROAROMÁTICAS EM MODELOS CELULARES DE NEOPLASIAS PANCREÁTICAS

V. A. BRITO¹, V. C. M. COSTA², A. P. B. ALBUQUERQUE², M. C. A. LIMA³, M. G. R. PITTA², I. R. PITTA² e M. J. B. M. RÊGO²

¹ Centro Universitário Boa Viagem, Graduação em Farmácia;

² Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT);

³ Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Química e Inovação Terapêutica (LQIT).

E-mail para contato: moacyr.rego@ufpe.br

RESUMO – O câncer pancreático (CP) é um tipo tumoral agressivo, com rápida evolução e baixa taxa de sobrevida. Além de apresentar o elevado índice de resistência medicamentosa, o que evidencia a urgente necessidade de novas abordagens terapêuticas a fim de aumentar a taxa de sobrevida do paciente. Com isso, o objetivo deste estudo é avaliar a atividade antineoplásica de moléculas nitroaromáticas em modelos celulares de câncer de pâncreas. Foram utilizados seis derivados nitroaromáticos, os quais foram testados nas linhagens tumorais pancreáticas PANC-1 e MIAPaCa-2. O ensaio de viabilidade celular por MTT foi realizado para avaliar o potencial antineoplásico e determinou-se o valor de IC₅₀. Os resultados revelaram que todos os derivados nitroaromáticos, exceto o PR-18, apresentaram valores de IC₅₀ consideráveis em ambas as linhagens neoplásicas, variando de 2,75 a 10,24 µM, com destaque para os derivados PR-13, PR-16 e PR-19 que possuem menores valores de IC₅₀. Em conclusão, os derivados PR-13, PR-16 e PR-19 mostraram-se promissores e com potencial antineoplásico *in vitro*.

Palavras-chave: “Atividade antineoplásica”. “Derivados nitroaromáticos”. “Câncer de pâncreas”.

ABSTRACT – Pancreatic cancer (CP) is an aggressive tumor type, with rapid evolution and low survival rate. In addition to presenting a high drug resistance index, which highlights the urgent need for new therapeutic approaches in order to increase the patient's survival rate. Thus, the aim of this study is to evaluate the antineoplastic activity of nitroaromatic molecules in pancreatic cancer cell models. Six nitroaromatic derivatives were used, which were tested in the pancreatic tumor lines PANC-1 and MIAPaCa-2. The MTT cell viability assay was performed to assess the antineoplastic potential and the IC₅₀ value was determined. The results revealed that all nitroaromatic derivatives, except PR-18, presented considerable IC₅₀ values in both neoplastic strains, varying from 2.75 to 10.24 µM, with emphasis on PR-13, PR-16 and PR-19 that have lower IC₅₀ values. In conclusion, the derivatives PR-13, PR-16 and PR-19 proved to be promising



and with antineoplastic potential in vitro.

Keywords: "Antineoplastic activity". "Nitroaromatic derivatives". "Pancreatic cancer".

1. INTRODUÇÃO

O câncer de pâncreas (CP) é um dos tumores malignos mais comuns, com alta incidência e mortalidade em todo o mundo. Em 90% dos casos, o CP está avançado ou metastático no momento do diagnóstico devido aos sintomas altamente inespecíficos. Esse é o fator principal pelo qual apenas menos de 20% dos pacientes estão aptos para a pancreatoduodenectomia (ressecção cirúrgica), assim como também justifica o fato do tumor não ter uma responsividade positiva frente aos quimioterápicos vigentes (GILABERT *et al.*, 2018). A droga de primeira linha de escolha atualmente é a gemcitabina sozinha ou em combinação com outros quimioterápicos. Porém, o tratamento para o CP ainda é considerado um desafio devido as características intrínsecas do tumor que conferem, em grande parte dos casos, ineficácia e insucesso terapêutico (DAUER *et al.*, 2017).

Apesar dos avanços na terapia quimioterápica, ainda existem uma grande problemática em torno destes medicamentos. Com isso, novas alternativas terapêuticas eficazes e seguras se fazem necessárias para os pacientes com CP. Os derivados nitroaromáticos são compostos que apresentam em sua estrutura átomos de nitrogênio (N) ligado a um ou mais anéis aromáticos. Foram observadas diversas atividades biológicas relacionadas a estes compostos, como antibacteriana e antifúngica (DE ARAÚJO NETO *et al.*, 2017). Diante do exposto, o objetivo deste trabalho consiste em avaliar a atividade antineoplásica de moléculas nitroaromáticas em modelos celulares de câncer de pâncreas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Moléculas nitroaromáticas

Os seis derivados nitroaromáticos PR-12, PR-13, PR-16, PR-17, PR-18 e PR-19 foram sintetizados, caracterizados e publicados pelo Laboratório de Química e Inovação Terapêutica (LQIT) da Universidade Federal de Pernambuco (DE ARAÚJO NETO *et al.*, 2017).

2.2 Manutenção de linhagens neoplásicas

As linhagens celulares de câncer de pâncreas MIAPaCa-2 e PANC-1 foram cultivadas em meio DMEM e suplementadas com 10% de soro fetal bovino e 2,5% de soro de cavalo, apenas para MIAPaCa-2. As mesmas foram acondicionadas em estufa de 5% de CO₂ à 37°C.

2.3 Avaliação da atividade antineoplásica

As linhagens neoplásicas foram semeadas em uma concentração de 1×10^4 de células, em placa de 96 poços. Após 24 horas, os derivados nitroaromáticos foram adicionados nas concentrações de 1, 10, 50 e 100 μ M por 72 horas. Em seguida, foi adicionado 20 μ L da solução de MTT (3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) na concentração de 5 mg/mL diluída em PBS, as placas foram incubadas por mais 3 horas protegidas da luz. Após esse tempo, foi acrescentado 130 μ L de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 20% (KUMAR *et al.*, 2018). A leitura foi feita em espectrofotômetro a 570nm. Os testes foram realizados em triplicata para a linhagem de MIAPaCa-2 e dois ensaios independentes para PANC-1.



2.4 Análise de dados

O cálculo do IC₅₀ foi realizado utilizando o programa OriginPro 8, a partir da porcentagem de viabilidade de cada composto/concentração, obtidos no excel.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os derivados nitroaromáticos utilizados nesse estudo, apresentam uma porção tiossemicarbazona ligada a um ou mais anéis aromáticos na sua estrutura, sendo esta ligação responsável por diversas atividades biológicas como antifúngica, antibacteriana e antiparasitária (DE ARAÚJO NETO *et al.*, 2017).

Para investigação do potencial antineoplásico os derivados nitroaromáticos foram avaliados nas linhagens de câncer de pâncreas para obter os valores de IC₅₀, como descrito na Tabela 1. Os resultados revelaram que os derivados PR-13, PR-16 e PR-19 apresentaram menor valor de IC₅₀. Isto sugere a potencialidade citotóxica destes derivados frente às linhagens tumorais de câncer de pâncreas e a importância da ligação direta entre o anel aromático e a porção tiossemicarbazona. A presença do grupo fenil como substituinte no derivado PR-16 e de dois anéis aromáticos no derivado PR-13 pode estar relacionada ao aumento da atividade antineoplásica observada nas duas linhagens (CHHILLAR *et al.*, 2006). O derivado PR-19 tem como substituinte um metil ligado ao anel aromático, conformação estrutural que também foi positiva frente às linhagens (CONGIU *et al.*, 2013).

Tabela 1 – Valores de IC₅₀ e os seus respectivos desvios-padrões obtidos a partir dos ensaios de viabilidade celular por MTT

COMPOSTOS	MIAPACA-2	PANC-1
PR-12 (C ₁₂ H ₅ BRN ₄ O ₂ S ₂)	8,82±4,01	6,75±0,47
PR-13 (C ₁₆ H ₁₂ N ₄ O ₂ S ₂)	6,09±4,11	2,75*
PR-16 (C ₁₂ H ₁₀ N ₄ O ₂ S ₂)	4,65±0,07	4,76±1,62
PR-17 (C ₁₂ H ₅ CLN ₄ O ₂ S ₂)	10,24±4,56	5,56±3,16
PR-18 (C ₁₄ H ₁₂ N ₄ O ₂ S ₂)	>100	>100
PR-19 (C ₁₃ H ₁₂ N ₄ O ₂ S ₂)	7,98±3,44	5,71±1,70

*Este IC₅₀ representa apenas um ensaio independente.

Além disso, foi observado que os derivados PR-12 e PR-17 apresentaram maiores valores de IC₅₀, e conseqüente inferior atividade antineoplásica, quando comparado com os demais. Este resultado sugere que a presença dos átomos Br e Cl ligados a porção fenil destes derivados, respectivamente, influencia diretamente no tamanho destas moléculas e, conseqüentemente, altera algumas características farmacocinéticas, levando a baixa citotoxicidade (DE ARAÚJO NETO *et al.*, 2017). Apesar desta diferença, estes compostos também se mostraram promissores acerca da atividade antineoplásica. Por outro lado, o derivado PR-18 não apresentou citotoxicidade diante de nenhuma das duas linhagens utilizadas neste estudo.



4. CONCLUSÃO

Os derivados nitroaromáticos utilizados neste estudo, exceto o PR-18, apresentaram atividade antineoplásica promissora frente as linhagens neoplásicas de câncer de pâncreas, destacando-se os compostos PR-13, PR-16 e PR-19.

5. REFERÊNCIAS

CHHILLAR, P. A.; ARYA, K.; MUKHERJEE, C.; KUMAR, P.; YADAV, Y.; SHARMA, A. K.; YADAV, V.; GUPTA, J.; DABUR, R.; JHA, H. N.; WATTERSON, A. C. Microwave-assisted synthesis of antimicrobial dihydropyridines and tetrahydropyrimidin-2-ones: novel compounds against aspergillosis. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 14, n. 4, p. 973-981, 2006.

CONGIU, C.; ONNIS, V. Synthesis and biological evaluation of novel acylhydrazone derivatives as potential antitumor agentes. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 21 n. 21, p. 6592-6599, 2013.

DAUER, P.; NOMURA, A.; SALUJA, A.; BANERJEE, S. Microenvironment in determining chemo-resistance in pancreatic cancer: Neighborhood matters. *Pancreat.*, v. 17, n. 1, p. 7-12, 2017.

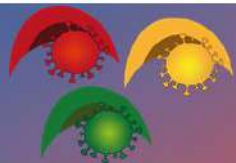
DE ARAÚJO NETO, L. N.; LIMA, M. D. C. A. D.; OLIVEIRA, J. F. D.; SOUZA, E. R. D.; BUONAFINA, M. D. S.; ANJOS, M. N. V.; BRAYNER, F. A.; ALVES, L. C.; NEVES, R. P.; MENDONÇA-JÚNIOR, F. J. B. Synthesis, cytotoxicity and antifungal activity of 5-nitrothiophene-thiosemicarbazones derivatives. *Chemico-Biolog. Inter.*, v. 272, p. 172-181, 2017.

GILABERT, M.; TURRINI, O.; EWALD, J.; MOUREAU-ZABOTTO, L.; POIZAT, F.; RAOUL, J. L.; DELPERO, J. R. Patients with resectable pancreatic adenocarcinoma: A 15-years single tertiary cancer center study of laparotomy findings, treatments and outcomes. *Surg.l oncol.*, v. 27, n. 4, p. 619-624, 2018.

KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P. D. Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Sprig. Har. Prot.*, v. 2018, n. 6, p. pdb. prot095505, 2018.

6. AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pernambuco. Ao Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT-SG).



ÁREA DE SUBMISSÃO: Pesquisa Clínica e Pré-clínica

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS CIRCULANTES DA GALECTINA-4 NO DIAGNÓSTICO DO CÂNCER GÁSTRICO

M. F. D. SOUZA¹, A. F. S. FILHO¹, L. A. MATTOS², M. R. MARTINS³, I. R. PITTA¹, M.C. PEREIRA¹, M.G.R. PITTA¹, L. R. A. LIMA⁴, M. J.B.M. RÊGO¹

¹ Laboratório de Imunomodulação e novas abordagens terapêuticas/ LINAT, Núcleo de Pesquisa em Inovação

Terapêutica Suely Galdino – NUPIT SG, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

² Hospital das Clínicas de Pernambuco, UFPE, Recife-PE.

³ Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer (SPCC), Recife – PE.

⁴ Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento Socioambiental, Campus Garanhuns da Universidade de Pernambuco, Garanhuns – PE.

E-mail para contato: deodatomariadefatima@gmail.com

RESUMO – O Câncer Gástrico (CG) é associado a um prognóstico desfavorável, principalmente na doença avançada. Os marcadores séricos dispostos na clínica, não apresentam parâmetros de acurácia para um diagnóstico preciso. Galectina-4 (Gal-4) com afinidade β -galactosídeos, apresenta papéis importantes na carcinogênese e progressão tumoral. Dessa forma, o estudo objetivou-se a avaliar os níveis circulantes da Gal-4 para distinguir pacientes com câncer gástrico de indivíduos saudáveis. 116 pacientes (41 mulheres, 75 homens; idade média 60,01 anos, range 29-82 anos) e 93 indivíduos saudáveis (74 mulheres, 19 homens; idade média 42,4 anos, range 19-82) foram incluídos no estudo. Os pacientes foram recrutados do Serviço de Oncologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e da Sociedade Pernambucana de Combate as Câncer (SPCC). Os níveis circulantes de Gal-4 foram determinados por ELISA. Os níveis de Gal-4 foram maiores nos pacientes com CG comparado aos controles ($p < 0.0001$). O ponto de corte para distinguir pacientes com CG de indivíduos saudáveis foi de 434,7 pg/ml (sensibilidade 51,61%, especificidade 95,69%, LR+: 11,97) (AUC: 0,8881, $p < 0,0001$). Ademais, não foram detectadas associações entre os níveis circulantes de Gal-4 e os parâmetros clínico-patológicos avaliados ($p > 0,05$). Dessa forma, Gal-4 emerge como um potencial biomarcador para o diagnóstico dessa malignidade.

Palavras-chave: Acurácia, Biomarcador, Câncer de Estômago.

ABSTRACT: Gastric Cancer (GC) is associated with an unfavorable prognosis, especially in advanced disease. The serum markers arranged in the clinic do not present parameters of accuracy for an accurate diagnosis. Galectin-4 (Gal-4) with β -galactoside affinity, plays important roles in carcinogenesis and tumor progression. Thus, the study aimed to assess the circulating levels of Gal-4 to distinguish patients with gastric cancer from healthy individuals. 116 patients



(41 women, 75 men; mean age 60.01 years, range 29-82 years) and 93 healthy individuals (74 women, 19 men; mean age 42.4 years, range 19-82) were included in the study. Patients were recruited from the Oncology Service of the Hospital das Clínicas of the Federal University of Pernambuco (UFPE) and from the Pernambuco Society of Cancer Fighting (SPCC). Circulating levels of Gal-4 were determined by ELISA. Gal-4 levels were higher in patients with GC compared to controls. The cut-off point to distinguishing GC patients from healthy individuals was 434.7 pg / ml (sensitivity 51.61%, specificity 95.69%, LR +: 11.97) (AUC: 0.8888, $p < 0, 0001$). Furthermore, no associations were detected between circulating levels of Gal-4 and the clinical and pathological parameters evaluated ($p > 0.05$). Thus, Gal-4 emerges as a potential biomarker for the diagnosis of this malignancy.

Keywords: Accuracy, Biomarker, Stomach Cancer.

1. INTRODUÇÃO

O câncer gástrico é uma malignidade que apresenta alta morbimortalidade (BARETTON; AUST, 2017). Ocupando o ranking como o quinto tipo de câncer mais frequente e a terceira principal causa de morte associada ao câncer mundialmente (RAWLA; BARSOUK, 2019). A ausência de sintomas específicos é um considerável empecilho para o diagnóstico precoce, e reflete em um prognóstico desvantajoso (WU et al., 2019). O diagnóstico clínico da doença é auxiliado pela dosagem dos marcadores séricos tumorais. Entretanto, esses apresentam sensibilidade e especificidade relativamente baixas, tornando-os limitantes (NECULA et al., 2019; ZHOU et al., 2020).

As galectinas são proteínas que apresentam afinidade aos β -galactósidos através dos domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC) (BALAN; NANGIA-MAKKER; RAZ, 2010). Gal-4 é membro dessa família de proteínas e desempenha importantes atividades no desenvolvimento e progressão tumoral (CAO; GUO, 2016). Dessa forma, o presente estudo visou investigar os níveis circulantes da Gal-4 para distinguir pacientes com câncer gástrico de indivíduos saudáveis.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Pacientes: Amostras de sangue periférico de 116 pacientes diagnosticados com CG foram obtidas do Departamento de Oncologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE) e da Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer (SPCC). 93 indivíduos saudáveis, sem doenças de cunho inflamatório, e que não utilizavam drogas imunomoduladora construíram o grupo controle.

ELISA: Os níveis circulantes de Gal-4 foram determinados através de kit específico de Solid Phase Sandwich ELISA (R&D Systems), de acordo com as recomendações do fabricante. Os limites de detecção do teste foram: 2000 - 31,25 pg/ml.

Análises estatísticas: As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste de Mann-Whitney em GraphPad Prism software versão 8.0. Os resultados foram mostrados considerando o valor da mediana, mínimo e máximo, sendo $P < 0,05$ considerado como significativo. As características operacionais do receptor (ROC), sensibilidade, especificidade e razão de verossimilhança (LR) também foram calculados.

Considerações éticas: O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do HC/UFPE (CAEE: 00988018.1.3001.8807) e SPCC (CAEE: 26501319.3.0000.5205).



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram avaliados 116 pacientes com CG (41 mulheres, 75 homens; idade média 60,01 anos, range 29-82); e 93 indivíduos saudáveis (74 mulheres, 19 homens; idade média de 42,4 anos, faixa 19-82) foram incluídos como controle. A mediana dos níveis circulantes de Gal-4 em pacientes com CG (1612,0 pg/mL; 110,4 – 6646,0 pg/mL) foi aproximadamente 4 vezes maior do que a encontrada nos indivíduos saudáveis (394,5 pg/mL; 4,5 – 3197,0 pg/mL) ($p < 0,0001$) (Figura 1).

Analisamos os parâmetros de acurácia dos níveis circulantes de Gal-4 para distinguir pacientes com GC dos indivíduos saudáveis. A AUC da curva ROC foi de 0,8881 (IC: 0,8427 - 0,9335) ($p < 0,0001$). O ponto de corte de 434,7 pg/ml correspondeu a valores de sensibilidade, especificidade e razão de verossimilhança positiva (LR+) de 51,61%, 95,69%, 11,97 respectivamente (Tabela 1).

Adicionalmente, não houve associação significativa entre os níveis circulantes de Gal-4 e os parâmetros clínico-patológicos avaliados (sexo, idade, tabagismo, etilismo, localização do tumor, estadiamento (TNM), grau histológico, tratamento inicial, tipo de cirurgia, quimioterapia, radioterapia e invasão angiolinfática) $p > 0,05$.

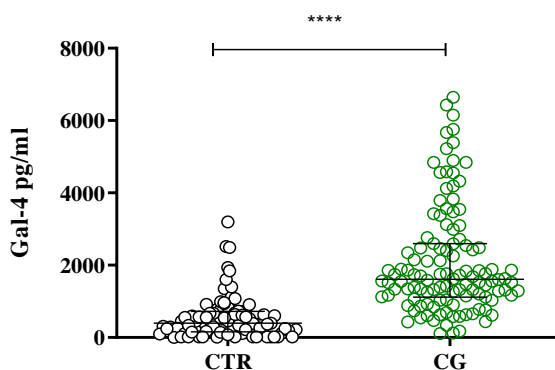


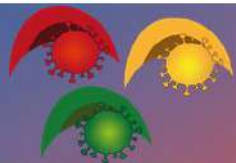
Figura 1. Diferença significativa entre os níveis circulantes de Gal-4 em voluntários saudáveis e em pacientes com câncer gástrico.

	AUC/CI	P	Cut-off	Sensibilidade %	Especificidade %	LR+
Níveis Circulantes Gal-4	0.8881 (0.8427 – 0.9335)	< 0,0001	434,7 pg/ml	51,61%	95,69%	11,97

Área sob a curva (AUC), Intervalo de Confiança (CI), Razão de verossimilhança positiva (LR+).

Tabela 1. Medidas de acurácia dos níveis circulantes da Gal-4 para distinguir pacientes com CG de voluntários saudáveis.

O aumento na expressão de Gal-4 também foi observado em outros tipos tumorais, incluindo o câncer de mama e o câncer hepático (HUFLEJT; LEFFLER, 2003). Em analogia aos nossos dados, Arnaout e Ibrahim (2017) descreveram altos níveis de Gal-4 em 25 pacientes com adenocarcinoma gástrico em relação aos controles; AUC de 0,924, sensibilidade 100% e



especificidade 40%, referentes ao ponto de corte de 0,42 ng/ml (ARNAOUT; IBRAHIM, 2017). Entretanto, o nosso número amostral foi consideravelmente maior, o que confere uma maior assertividade.

Adicionalmente, Gal-4 apresenta maior valor da AUC e da sensibilidade comparado aos marcadores utilizados na clínica CEA (AUC:0,712, Sensib.: 20,10%, Espec.: 94,70%), CA19.9 (AUC:0,585, Sensib.: 21,40%, Espec.: 96,20%) e CA72.4 (AUC:0,722, Sensib.: 27,60%, Espec.: 85,10%) utilizando ponto de corte com valores convencionais (LIANG et al., 2016).

4. CONCLUSÃO

Nossos dados denotam que os níveis circulantes de Gal-4 são significativamente maiores em pacientes diagnosticados com CG. Além disso, apresentam bons parâmetros de acurácia para distinguir pacientes com GC de controles saudáveis. Por conseguinte, esses achados podem estimular novos estudos, afim de comprovar a eficácia diagnóstica da Gal-4 para o CG.

5. REFERÊNCIAS

- ARNAOUT, A. H.; IBRAHIM, L. M. Serum Galectin-4 (Gal-4) in Patients With Gastric Adenocarcinoma: Active Player in the Field. **International Journal of Advanced Research**, v. 5, n. 2, p. 1162–1167, 2017.
- BALAN, V.; NANGIA-MAKKER, P.; RAZ, A. Galectins as cancer biomarkers. **Cancers**, v. 2, n. 2, p. 592–610, 2010.
- BARETTON, G. B.; AUST, D. E. Aktuelle Biomarker beim Magenkarzinom. **Pathologe**, v. 38, n. 2, p. 93–97, 2017.
- CAO, Z. Q.; GUO, X. L. The role of galectin-4 in physiology and diseases. **Protein and Cell**, v. 7, n. 5, p. 314–324, 2016.
- HUFLEJT, M. E.; LEFFLER, H. Galectin-4 in normal tissues and cancer. **Glycoconjugate Journal**, v. 20, n. 4, p. 247–255, 2003.
- LIANG, Y. et al. Clinical significance and diagnostic value of serum CEA, CA19-9 and CA72-4 in patients with gastric cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 31, p. 49565–49573, 2016.
- NECULA, L. et al. Recent advances in gastric cancer early diagnosis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 25, n. 17, p. 2029–2044, 2019.
- RAWLA, P.; BARSOUK, A. Epidemiology of gastric cancer: Global trends, risk factors and prevention. **Przegląd Gastroenterologiczny**, v. 14, n. 1, p. 26–38, 2019.
- WU, D. et al. Serum biomarker panels for the diagnosis of gastric cancer. **Cancer Medicine**, v. 8, n. 4, p. 1576–1583, 2019.
- ZHOU, B. et al. Plasma proteomics-based identification of novel biomarkers in early gastric cancer. **Clinical Biochemistry**, v. 76, p. 5–10, 2020.

6. AGRADECIMENTOS

Apoio financeiro: FACEPE, CNPq e CAPES.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Pesquisa clínica e Pré-clínica

DERIVADO TIAZOLIDÍNICO MODULA PRODUÇÃO DE IL-10 E IL-13 EM PBMC DE PACIENTES COM ESCLEROSE SISTÊMICA

M. E. de O. GONÇALVES¹, A. R. de ALMEIDA¹, E. G. C. CUNHA¹, J. V. de M. GOMES¹, H. I. LEÃO¹, A. T. DANTAS², M. A. B. CORREIA¹, L. D. de A. VALADARES², A. L. B. P. DUARTE², M. R. GALDINO-PITTA³, D. S. P. ABDALLA⁴, M. J. B. de M. RÊGO¹, M. C. PEREIRA¹, M. G. da R. PITTA¹.

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica - Suely Galdino, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas;

² Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas - UFPE;

³ Universidade Federal de Pernambuco, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica - Suely Galdino, Laboratório de Síntese e Planejamento de Fármacos;

⁴ Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

E-mail para contato: maddu-13@live.com

RESUMO – A esclerose sistêmica (ES) é uma doença autoimune do tecido conjuntivo, sendo composta pela soma de três mecanismos principais: fibrose cutânea e de órgãos internos, desregulação imunológica, com produção de citocinas, e alterações vasculares. As tiazolidinodionas (TZDs) são ligantes sintéticos do receptor ativado por PPAR- γ , que atua regulando a expressão de genes alvo e que apresenta funções anti-inflamatórias. Nessa perspectiva, o objetivo do trabalho foi avaliar a atividade imunomoduladora *in vitro* de um novo derivado tiazolidínico na produção de citocinas envolvidas na fisiopatogênese da ES. Foram realizadas coletas de sangue de 20 pacientes com ES para isolar as células mononucleadas de sangue periférico (PBMCs). As PBMCs foram estimuladas e incubadas com o TZD nas concentrações de 25, 50 e 75 μ M. Após 48 horas, o sobrenadante da cultura foi coletado e as citocinas foram quantificadas através dos ensaios CBA e ELISA. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de Wilcoxon e os resultados foram considerados significativos quando $p < 0.05$. O LPSF-SF-33 reduziu significativamente os níveis de IL-10 nas concentrações 25 μ M ($p = 0.002$), 50 μ M ($p = 0.0003$) e 75 μ M ($p = 0.018$), na concentração de 75 μ M reduziu IL-13 ($p = 0.0004$). Diante dos resultados obtidos, sugere-se uma atividade imunomoduladora do TZD avaliado em células de pacientes com ES.



Palavras chave: *thiazolidinodionas, imunomodulação, citocinas, esclerodermia.*

ABSTRACT – *Systemic sclerosis (SSc) is an autoimmune disease of the connective tissue, comprising the sum of three main mechanisms: cutaneous and internal organ fibrosis, immune dysregulation, with cytokines production, and vascular disorders. Thiazolidinediones (TZDs) are synthetic ligands of the PPAR- γ activated receptor, which regulate the expression of target genes and have anti-inflammatory functions. In this perspective, the aim of the work was to evaluate the in vitro immunomodulatory activity of new thiazolidine derivative in the production of cytokines involved in the pathogenesis of SSc. Blood samples were drawn from 20 patients with SSc to isolate peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). PBMCs were stimulated and incubated with TZD at concentrations of 25, 50 and 75 μ M. After 48 hours, the culture supernatant was collected and the cytokines were quantified using the CBA and ELISA assays. Statistical analysis was performed using the Wilcoxon test, and the results were considered significant when $p < 0.05$. LPSF-SF-33 at the concentrations of 25 μ M ($p = 0.002$), 50 μ M ($p = 0.0003$) and 75 μ M ($p = 0.018$), significantly reduced the levels of IL-10, at the concentration of 75 μ M it reduced IL-13 ($p = 0.0004$). In view of the results obtained, it is suggested an immunomodulatory activity of TZD evaluated in cells of patients with SSc.*

Keywords: *thiazolidinediones, immunomodulation, cytokines, scleroderma.*

1. INTRODUÇÃO

A Esclerose Sistêmica (ES) é uma doença autoimune do tecido conjuntivo. A fisiopatogênese é composta pela soma de três eventos principais, sendo eles, o dano vascular de pequenas artérias e arteríolas, a desregulação imunológica e a fibrose da pele e de vários órgãos internos. A soma desses eventos resulta na heterogeneidade da expressão fenotípica da doença (Zimmermann et al., 2013; Kumar et al., 2017). A etiologia da ES ainda não é conhecida, mas estudos apontam que possivelmente envolve fatores ambientais e genéticos (Zimmermann et al., 2013; Zuo et al., 2016).

Citocinas das vias Th1 e Th2 têm sido tradicionalmente implicadas na patogênese da ES. Células Th1 parecem inibir a deposição de colágeno e aumentar a produção de metaloproteinases, através da liberação de interferon- γ (IFN- γ) ou pelo contato direto com fibroblastos e, dessa forma, apresentam efeito antifibrótico. Por outro lado, as células Th2 estimulam a produção de colágeno e inibem metaloproteinases da matriz a partir da liberação de interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10) e interleucina-13 (IL-13), apresentando propriedades pró-fibróticas e proangiogênicas (Chizzolini et al., 2011). De uma maneira geral, postula-se que um desequilíbrio na produção de citocinas por esses subconjuntos de células induzem a inflamação nos estágios iniciais da doença (Th1 e Th17 predominante) e fibrose nos estágios mais avançados da ES (Th2 predominante) (Baraut et al., 2010).

Os tratamentos da ES geralmente são determinados pela extensão e gravidade das manifestações da doença, e a maior parte é direcionada para os sintomas (Raja et al., 2016). Portanto, existe uma grande necessidade, não atendida, para novas estratégias terapêuticas na ES.



As tiazolidinodionas (TZDs) são ligantes sintéticos do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gamma (PPAR- γ), e estão envolvidos em uma variedade de funções, como diminuição da resistência à insulina, inflamação, angiogênese, níveis de leptina e adipogênese. Estudos realizados mostram que as TZDs apresentam propriedades anti-inflamatórias, por meio da redução de marcadores inflamatórios, como a IL-6, TNF- α , MCP-1, proteína C-reativa e moléculas de adesão celular (Patel *et al.*, 2006). Nessa perspectiva, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade imunomoduladora *in vitro* do novo derivado tiazolidínico, LPSF-SF-33, na produção de citocinas envolvidas na fisiopatogênese da ES em células mononucleadas de sangue periférico de pacientes com esclerose sistêmica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram incluídos no estudo 20 pacientes com ES atendidos no ambulatório de pesquisa clínica do Serviço de Reumatologia do HC-UFPE. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) (CAAE: 97393718.0.0000.5208) e todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O composto LPSF-SF-33 (5-(3,5-Dimethoxy-benzylidene)-3-(4-nitro-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione) foi sintetizado no Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos da UFPE (LPSF-UFPE) e cedido para a realização dos testes biológicos.

A partir das amostras de sangue colhidas em tubos contendo o anticoagulante heparina, foi feito o isolamento das células mononucleares de sangue periférico (PBMCs), em seguida o cultivo das mesmas em placas de 24 poços na concentração de 1×10^6 células/poço. As PBMCs foram estimuladas com Fitohemaglutinina (PHA), exceto o poço que só continha células, e tratadas com o LPSF-SF-33 nas concentrações de 25, 50 e $75 \mu\text{M}$. A Metilprednisolona foi usada como controle positivo na concentração de $100 \mu\text{M}$. Após 48 horas, as placas foram centrifugadas para coleta do sobrenadante e realizou-se a dosagem das citocinas IL-10 e IL-13 por kit CBA (Cytometric Bead Array) e ELISA, seguindo as informações recomendadas pelos fornecedores. A análise estatística foi realizada utilizando o teste Wilcoxon's signed rank e os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0.05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após esclarecimentos sobre a pesquisa, os pacientes que aceitaram participar do trabalho assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). De 17 pacientes com ES, 15 eram mulheres e 2 homens; 6 pacientes tinham a forma clínica cutânea disufa e 11 a forma cutânea limitada; as demais características clínicas e os tratamentos utilizados pelos pacientes podem ser encontrado na Tabela 1.



Tabela 1 - Características clínicas e laboratoriais de pacientes com esclerose sistêmica

Características	Pacientes com ES (n=17)*
Idade (anos)	
Média ± DP (intervalo)	47.9 ± 12.8 (30 - 76)
Sexo N (%)	
Feminino	15 (88.2)
Masculino	2 (11.8)
Duração da doença (meses)	
Média ± DP (intervalo)	131 ± 97.3 (8 - 348)
Subgrupos clínicos N (%)	
Cutâneo difuso	6 (35.3)
Cutâneo limitado	11 (64.7)
Manifestações clínicas N (%)	
Disfunção esofágica	13 (76.5)
Úlcera digital	12 (70.6)
Doença pulmonar intersticial	10 (58.9)
Hipertensão arterial pulmonar	1 (5.9)
Artrite	14 (82.3)
Score Rodnan	
Mediana (intervalo)	20 (4 - 38)
Tratamento N (%)	
Glicocorticóides	9 (52.9)
Azatioprina	4 (23.5)
Metotrexato	6 (35.3)
Micofenolato de mofetil	1 (5.9)

*Não foi possível coletar os dados clínicos de 3 pacientes com ES.

DP = desvio padrão

Após o tratamento com o derivado tiazolídínico nas culturas de PBMCs de pacientes com ES foi possível observar que, o derivado LPSF-SF-33 reduziu significativamente os níveis de IL-10 nas concentrações 25µM (p= 0.002), 50µM (p=0.0003) e 75µM (p= 0.018), conforme mostra a Figura 1 A. Além disso, na concentração de 75 µM o LPSF-SF-33 reduziu significativamente os níveis da IL-13 (p=0.0004) conforme mostra a Figura 1 B. As comparações foram realizadas com a condição de estímulo PHA.

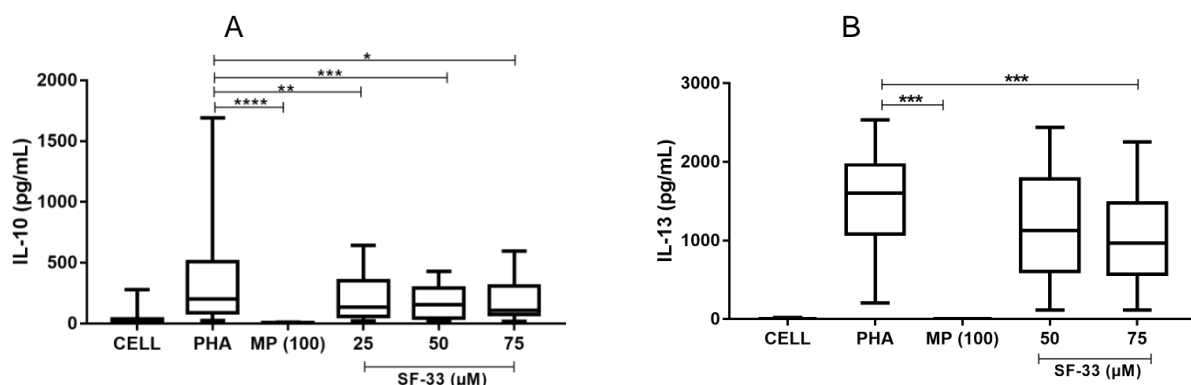


Figura 1 - Atividade imunomoduladora do derivado tiazolidínico LPSF-SF-33. Níveis de IL-10 (A) e IL-13 (B) em sobrenadante de PBMC de pacientes com ES.

Como esperado, o controle positivo, Metilprednisolona reduziu significativamente os níveis de IL-10 e IL-13 em sobrenadante de PBMC de pacientes com ES, quando comparado com a condição de estímulo por PHA.

O tratamento para pacientes com ES continua sendo complexo, principalmente porque a doença é heterogênea e é difícil encontrar alvos em todos os três mecanismos envolvidos na fisiopatogênese da ES: a ativação do sistema imunológico, anormalidades vasculares e fibrose tecidual. Embora avanços substanciais para os primeiros dois mecanismos foram feitos nos últimos anos, ainda falta um tratamento antifibrótico eficaz (Orlandi M *et al.*, 2018).

Além do TGF- β , outros indutores cruciais de fibrose foram descritos, incluindo IL-13. Essa citocina é produzida por células Th2 ativadas e compartilha muitas atividades funcionais usando a mesma cadeia α do receptor de IL-4. A inibição da IL-4 e IL-13 de maneira independente identificou a IL-13 como a citocina efetiva dominante da fibrose. Além disso, a IL-13 induz a produção de TGF- β 1 latente a partir de macrófagos e a ativação do TGF- β 1 através da regulação positiva da expressão de MMP9, levando à fibrose pulmonar (Baraut *et al.*, 2015). A IL-13 não só pode ativar diretamente a proliferação e diferenciação de fibroblastos, como também pode induzir expressão de colágeno I e outros genes críticos associados à fibrose, como a actina do músculo liso (SMA) (Huang XL *et al.*, 2015). Citocinas Th2, como IL-10, parecem atuar sobre os fibroblastos regulando seu metabolismo e aumento da deposição da matriz extracelular (De Almeida *et al.*, 2019).

Foi demonstrado que os linfócitos T CD8⁺ citotóxico são secretadores de altos níveis de IL-13 e mediam a fibrose dérmica em pacientes com esclerose sistêmica. Em modelos de camundongos, a superexpressão de IL-13 resulta em fibrose pulmonar, enquanto a exclusão genética de IL-13 atenua (O'Reilly S, 2013). A IL-13 participa da fase inflamatória da ES, contribuindo para a transição da fase inflamatória para a fibrótica. Essa citocina media a interação entre células T CD4⁺ e CD8⁺ e fibroblastos. Bloqueadores da conversa cruzada entre essas células podem ser uma estratégia terapêutica para modular a inflamação, prevenir a fibrose e favorecer a remodelação do tecido fibrótico em pacientes com ES (Gasparini G *et al.*, 2020). Nessa perspectiva, os resultados obtidos no presente estudo com o LPSF-SF-33 reduzindo significativamente os níveis de IL-13,



surtem como um indicativo de que esse derivado tiazolidínico possa agir prevenindo a progressão da ES.

Os principais agonistas do PPAR- γ conhecidos e no mercado são a Pioglitazona, Rosiglitazona, Troglitazona, Ciglitazona e GW7845. Estudos confirmam sua atividade anti-inflamatória uma vez que puderam reduzir a produção de citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-1, genes inflamatórios como NOS e COX-2, bem como metaloproteinases de matriz MMP-1 e MMP-13 (Lima *et al.*, 2013). De Almeida *et al.*, (2019) observaram uma supressão nos níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ , TNF e IL-1 β em PBMC de pacientes com ES após o tratamento *in vitro* com Dexametasona. Resultados semelhantes foram obtidos nesse estudo, mostrando o potencial imunomodulador *in vitro* do derivado tiazolidínico LPSF-SF-33 ao promover uma redução significativa nos níveis da citocina IL-10, que desempenha papel pró-fibrótico, atuando no desenvolvimento da fibrose na ES.

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicam que o derivado tiazolidínico LPSF-SF-33 *in vitro* reduz significativamente os níveis das citocinas pró-fibróticas IL-10 e IL-13 em sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes com ES.

Diante das evidências apresentadas, sugere-se a continuidade de mais estudos com o derivado tiazolidínico LPSF-SF-33 para mais confirmações referente a atividade imunomoduladora, podendo assim ser um possível agente terapêutico para o tratamento da esclerose sistêmica.

5. REFERÊNCIAS

- BARAUT J, MICHEL L, Verrecchia F, Farge D. Relationship between cytokine profiles and clinical outcomes in patients with systemic sclerosis. **Rev. Autoimmun.**, v. 10 (2), p. 65-73, 2010.
- BARAUT, JULIE et al. Transforming growth factor- β increases interleukin-13 synthesis via GATA-3 transcription factor in T-lymphocytes from patients with systemic sclerosis. **Arthritis Research & Therapy**, [s.l.], v. 17, p.196-201, 2015.
- CHIZZOLINI, C. et al. Fibrosis and immune dysregulation in systemic sclerosis. **Autoimmun Rev**, v. 10, p. 276-281, 2011.
- DE ALMEIDA AR, DANTAS AT, PEREIRA MC, et al. Dexamethasone inhibits cytokine production in PBMC from systemic sclerosis patients. **Inflammopharmacology.**, v. 27(4), p.723-730, 2019.
- GASPARINI G, COZZANI E, PARODI A. Interleukin-4 and interleukin-13 as possible therapeutic targets in systemic sclerosis. **Cytokine.**, v. 125, p. 154799, 2020.
- HUANG XL, WANG YJ, YAN JW, et al. Role of anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-13 in systemic sclerosis. **Inflamm Res.**, V. 64(3-4), p. 151-159, 2015.
- KUMAR S, SINGH J, RATTAN S, DIMARINO AJ, COHEN S, JIMENEZ SA. Review article: pathogenesis and clinical manifestations of gastrointestinal involvement in systemic sclerosis. **Aliment Pharmacol Ther.**, v. 45(7), p. 883-898, 2017.



LIMA, E. E. A. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists (PPARs): a promising prospect in the treatment of psoriasis and psoriatic arthritis. *An Bras Dermatol.*, v. 88, p. 1029-35, 2013

O'REILLY S. Role of interleukin-13 in fibrosis, particularly systemic sclerosis. *Biofactors*. v. 39(6), p. 593-596, 2013.

PATEL, C. B. et al. Thiazolidinediones and risk for atherosclerosis: pleiotropic effects of PPAR gamma agonism. *Diabetes & vascular disease research : official journal of the International Society of Diabetes and Vascular Disease*, v. 3, p. 65–71, 2006.

RAJA, J., DENTON, C.P. Cytokines in the immunopathology of systemic sclerosis. *Semin Immunopathol.*, v. 37, p. 543–557, 2015.

ZIMMERMANN, A. F.; PIZZICHINI, M. M. M.. Atualização na etiopatogênese da esclerose sistêmica. *Rev. Bras. Reumatol.*, v. 53, p. 516-524, 2013.

ZUO X, ZHANG L, LUO H, LI Y, ZHU H. Systematic approach to understanding the pathogenesis of systemic sclerosis. *Clin Genet.*, v. 92(4), p. 365-371, 2017.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecimentos a Universidade Federal de Pernambuco, ao Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT) e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pelas oportunidades oferecidas que permitiram a realização desse trabalho.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Pesquisa Clínica e Pré-Clínica

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DA GALECTINA-12 EM NEOPLASIAS HEPATO-PANCREATO-BILIARES

L. V. GALDINO¹, A. P. B. ALBUQUERQUE¹; A. F. S. FILHO¹; L. R. A. LIMA²; M. J. B. M. RÊGO¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT-SG), Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT)

² Universidade de Pernambuco Campus Garanhuns (UPE Garanhuns), Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento Socioambiental, Laboratório de Biologia Celular e Molecular

E-mail para contato: liliavieiragaldino@gmail.com

RESUMO – *O fígado, pâncreas e a vesícula biliar apresentam uma aproximação anatômica que os classifica como tríade hepato-pancreato-biliar (HPB). As neoplasias malignas que acometem essa tríade possuem as maiores taxas de mortalidade por câncer no Brasil. As galectinas estão sendo frequentemente investigadas como possíveis biomarcadores e alvo terapêutico em diversos tipos de câncer. Contudo, nada se conhece sobre a influência da Galectina-12 (Gal-12) no microambiente tumoral das neoplasias HPB, no entanto visto que o tecido adiposo está envolvido nos riscos ambientais inerentes a essas neoplasias e que a Gal-12 possui relevante atividade neste tecido a mesma foi selecionada como alvo deste estudo. Diante disso, o objetivo do estudo foi investigar os níveis séricos da Gal-12 em pacientes diagnosticados com neoplasias HPB e avaliar a possível correlação com os dados clínicos dos pacientes. Foram avaliados 70 pacientes com neoplasias HPB e destes 21,43% (15) foram produtores de Gal-12, entretanto não houve associação dos níveis séricos com os dados clínicos. Os resultados ainda revelaram que os níveis séricos de Gal-12 são maiores no câncer de vesícula biliar e vias biliares intra-hepáticas, mas é necessário aumento dos grupos amostrais e estudos adicionais para melhor caracterizar o papel da Gal-12 sérica nas neoplasias HPB.*

Palavras-chave: Câncer. Glicobiologia. Neoplasias Hepáto-Pancreáto-Biliar.

ABSTRACT – *The liver, pancreas and gallbladder present an anatomical approach which classifies them as the Hepato-Pancreato-Biliary triad (HPB). The malignant neoplasms, that affect this triad, have the highest cancer mortality rates in Brazil. Galectins are frequently being investigated as possible biomarkers and therapeutic targets in several types of cancer. However, nothing is known about the influence of Galectin-12 (Gal-12) on the tumor microenvironment of HPB neoplasms, nevertheless, since the adipose tissue is involved in the environmental risks inherent to these neoplasms and Gal-12 has relevant activity in this tissue, the Gal-12 was selected*



as the target of this study. Therefore, the aim of the study was to investigate the serum levels of Gal-12 in patients diagnosed with HPB neoplasms and to evaluate the possible interconnection with the patients' clinical data. Seventy patients with HPB neoplasms were evaluated and 21.43% (15) of these were producers of Gal-12, however there was no association of serum levels with clinical data. The results also revealed that serum levels of Gal-12 are higher in gallbladder cancer and intrahepatic bile ducts, but it is necessary to increase the sample groups and additional studies to better characterize the role of serum Gal-12 in HPB neoplasms.

Keywords: Cancer. Glycobiology. Hepato-Pancreato-Biliary Neoplasms.

1. INTRODUÇÃO

O câncer denomina um conjunto de doenças que se dividem de forma anormal, descontrolada e com potencial de invadir outros tecidos. Quando as células cancerígenas acometem a tríade Hepato-Pancreato-Biliar (HPB) caracterizam neoplasias extremamente agressivas, com altas taxas de mortalidade e os piores índices de sobrevivência global em cinco anos (BRAY et al., 2018). O potencial maligno dessas neoplasias ocorre devido a ausência de sintomas precoces e a dificuldades no diagnóstico e prognóstico (AIER et al., 2019; DWIVEDI et al., 2015). As galectinas são glicoproteínas que apresentam afinidade por β -galactosídeos e os seus níveis estão frequentemente alterados em diversas doenças, possibilitando a investigação destas glicomoléculas como alvo modulador da progressão tumoral ou biomarcador (DINGS et al., 2018). A Galectina-12 (Gal-12) apresenta uma expressão especialmente nos adipócitos e a presença dos adipócitos no microambiente tumoral nos provocou a estudar os níveis séricos da Gal-12 em neoplasias HPB e avaliar seu potencial como biomarcador (YANG et al., 2012).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Local e População do Estudo- O estudo foi realizado a partir da aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco- HC/UFPE (parecer favorável nº 3.691.129) e Hospital do Câncer de Pernambuco (parecer favorável nº 3.969.256) para coleta de sangue periférico de pacientes com neoplasias HPB. Foram incluídos no estudo 70 pacientes maiores de 18 anos com diagnóstico de neoplasia maligna primária no fígado, vias biliares extra-hepáticas, pancreáticas, vias biliares intra-hepáticas ou vesícula biliar. Os critérios de exclusão foram pacientes submetidos a terapia neoadjuvante pré-operatória ou cirurgia curativa para que não houvesse interferência nos resultados da pesquisa. Pacientes com histórico de outros tumores bem como, pacientes que se recusaram à participação e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido também foram excluídos.

2.2 ELISA- A Galectina-12 foi quantificada no soro de pacientes pela técnica do ELISA sanduíche (Enzyme-linked immunosorbent assay). O ELISA foi executado com o Kit Human Gal-12 (FineTest, China, código EH3103), de acordo com as recomendações do fabricante e a leitura da absorbância foi realizada no espectrofotômetro de microplaca (Biotek®, Vermont, USA, EL808) a 450nm imediatamente. O limite de detecção inferior do kit foi de 0,3125.



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os níveis séricos das Galectinas estão alterados em diversas condições patológicas, mas nada é conhecido sobre os níveis da Gal-12 em neoplasias HPB. A coorte do presente estudo foi composta por 70 pacientes os quais foram agrupados de acordo com o sítio primário do tumor em câncer hepático e vias biliares intra-hepáticas (CH- 19 pacientes), câncer de pâncreas (CP- 43 pacientes) e câncer de vesícula biliar e vias biliares extra-hepáticas (CVB- 8 pacientes). A mediana de idade foi de 63 anos (20-86) no grupo CP, 56 anos (20-84) no grupo CH e 68 anos (54-77) para CVB. As demais características demográficas são apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 – Características clínicas de pacientes diagnosticados com neoplasias HPB. Variáveis distribuídas de acordo com a localização primária nos grupos câncer hepático e vias biliares intra-hepáticas (HC), câncer de pâncreas (CP) e câncer de vesícula biliar e vias biliares extra-hepáticas (CVB).

Variável	Categoria	HPB			Valor-p
		CH n=19	CP n=43	CVB n=08	
Gênero	Masculino	13 (68,4%)	23 (53,5%)	1 (12,5%)	0,0290
	Feminino	6 (31,6%)	20 (46,5%)	7 (87,5%)	
Idade	≥60	7 (43,7%)	22 (62,9%)	6 (85,7%)	0,1484
	<60	9 (56,3%)	13 (37,1%)	1 (14,3%)	
Tabagismo	Sim	8 (61,5%)	13 (39,4%)	3 (60%)	0,3315
	Não	5 (38,5%)	20 (60,6%)	2 (40%)	
Etilismo	Sim	9 (75%)	10 (32,3%)	3 (60%)	0,0331
	Não	3 (25%)	21 (67,7%)	2 (40%)	
IMC	Magro	1 (11,1%)	2 (12,5%)	0 (0%)	0,1639
	Adequado	5 (55,6%)	8 (50%)	1 (20%)	
	Sobrepeso	1(11,1%)	5 (31,2%)	4 (80%)	
	Obesidade	0 (0%)	1 (6,3%)	0 (0%)	
	Obesidade Grave	2(22,2%)	0 (0%)	0 (0%)	
Diabetes	Sim	4 (33,3%)	17 (54,8%)	1 (14,3%)	0,1033
	Não	8 (66,7%)	14 (45,2%)	6 (85,7%)	
Hipertensão	Sim	10 (83,3%)	18 (62,1%)	5 (71,4%)	0,3205
	Não	2 (16,7%)	11 (37,9%)	2 (28,6%)	

O valor de p foi considerado significativo quando $p < 0,05$

A avaliação dos níveis séricos da Gal-12 revelou a detecção em 21,43% (15) dos pacientes HPB (tabela 2A). A análise por neoplasia indicou a produção da Gal-12 em 5,3% dos pacientes diagnosticados em CH (1), 25,6% (11) dos pacientes CP e em 37,5% (3) dos pacientes CVB com mediana, máximo e mínimo representados na tabela 2B. Até o momento não tivemos acesso aos



dados sobre infecção prévia por hepatite B ou hepatite C de todos os pacientes com neoplasia primária hepática, no entanto em sete pacientes com os dados presentes, dois apresentam a infecção positiva, e destes um foi produtor de Gal-12.

Tabela 2 - Níveis séricos de Gal-12 em pacientes diagnosticados com neoplasias HPB (N=70) pela técnica do ELISA. A) Mediana, mínimo e máximo da concentração de Gal-12 sérica em neoplasias HPB. B) Mediana, mínimo e máximo de pacientes produtores de Gal-12 por neoplasia primária em câncer de pâncreas (CP) e câncer de vesícula biliar e vias biliares extra-hepáticas (CVB) ($p=0.0854$).

2A)

Tipo de Neoplasia	Mediana	Mínimo	Máximo
CP	0,3125	0,3125	14,9282
CH	0,3125	0,3125	1,6585
CVB	0,3125	0,3125	11,1005

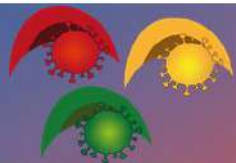
2B)

Tipo de Neoplasia	Mediana	Mínimo	Máximo
CP	2,7887	1,3312	14,9282
CVB	5,8373	1,3390	11,1005

Até o momento nenhum estudo foi feito com a Gal-12 em HPB, contudo a avaliação dos níveis séricos das demais galectinas no câncer de pâncreas indicam o potencial como biomarcador de diagnóstico independente ou combinado ao CA19-9 e CEA, melhor acurácia quando comparadas ao CA19-9, promissor biomarcador de recorrência e possibilidade de distinção entre diabetes tipo 2 e neoplasia maligna (HU et al., 2019; LIAO et al., 2019; MARTINEZ-BOSCH et al., 2018; SHIMURA et al., 2017).

No câncer hepático e de vias biliares intra-hepáticas o gênero masculino predominou, coincidindo com o perfil de acometimento global para estes tipos de câncer (BRAY et al., 2018). As informações disponíveis na literatura a cerca das galectinas no CH indicam que os níveis séricos geralmente apresentam uma associação significativa com pacientes infectados pelo vírus da hepatite B, progressão da doença e previsão quanto ao desfecho da progressão entre cirrose ou CHC, ainda refletem o prognóstico da doença e indicam a eficácia do sorafenibe e sobrevida em pacientes em estádios tumorais avançados (CAI et al., 2014; EISA et al., 2014; SIDERAS et al., 2019; ULU et al., 2015).

No câncer de vesícula biliar e de vias biliares extra-hepáticas a incidência mundial atinge cerca de três a seis vezes mais mulheres do que homens com predomínio de idade a partir dos 65 anos, coincidindo com o nosso grupo de estudo. Os estudos das demais galectinas no câncer de vesícula biliar é incomum e não avaliam os níveis séricos (SCHMIDT et al., 2019).



4. CONCLUSÃO

A Gal-12 foi detectada em pacientes do grupo CH, PC e CVB, cuja presença sérica parece frequente no câncer de vesícula biliar e de vias biliares extra-hepáticas. Contudo, ainda não é possível avaliar o real envolvimento da Gal-12, pois é necessário avaliar a Gal-12 em indivíduos saudáveis (grupo controle) e aumentar o n amostral por tipo de neoplasia para análises futuras da possível correlação com dos resultados no grupo de interesse e assim, caracterizar os níveis séricos de Gal-12 em pacientes HPB.

5. REFERÊNCIAS

AIER, Imlimaong et al. A systematic assessment of statistics, risk factors, and underlying features involved in pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol*, v. 58, p.104-110, fev. 2019.

BRAY, Freddie et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Ca-Cancer J Clin*, v. 68, n. 6, p.394-424, 12 set. 2018.

CAI, Zhixiong et al. Galectin-4 serves as a prognostic biomarker for the early recurrence/metastasis of hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*, v. 105, n. 11, p.1510-1517, 27 out. 2014.

DINGS, Ruud et al. Galectins as Molecular Targets for Therapeutic Intervention. *Int. J. Mol. Sci*, v. 19, n. 3, p.1-22, 19 mar. 2018.

DWIVEDI, Amit et al. Gall bladder carcinoma: Aggressive malignancy with protean loco-regional and distant spread. *World J Clin Cases*, v. 3, n. 3, p.231-244, 2015.

EISA, Nada H et al. Galectin-3 and matrix metalloproteinase-9: Perspective in management of hepatocellular carcinoma. *J Oncol Pharm Pract*, v. 21, n. 5, p.323-330, 24 abr. 2014.

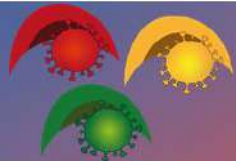
HU, Dingyuan et al. Galectin 4 is a biomarker for early recurrence and death after surgical resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Scand.J.Gastroenterology*, v. 54, n. 1, p.95-100, 2 jan. 2019.

LIAO, Wei-chih et al. Galectin-3 and S100A9: Novel Diabetogenic Factors Mediating Pancreatic Cancer-Associated Diabetes. *Diabetes Care*, v. 42, n. 9, p.1752-1759, 1 jul. 2019.

MARTINEZ-BOSCH, Neus et al. Increased plasma levels of galectin-1 in pancreatic cancer: potential use as biomarker. *Oncotarget*, v. 9, n. 68, p.32984-32996, 20 ago. 2018.

SCHMIDT, Mikayla et al. Gallbladder cancer: epidemiology and genetic risk associations. *Chin Clin Oncology*, v. 8, n. 4, p.1-14, ago. 2019.

SHIMURA, Tatsuo et al. Significance of Circulating Galectin-3 in Patients with Pancreatobiliary Cancer. *Anticancer Res*, v. 37, n. 9, p.4979-4986, 6 set. 2017.



SIDERAS, Kostandinos et al. Circulating levels of PD-L1 and Galectin-9 are associated with patient survival in surgically treated Hepatocellular Carcinoma independent of their intra-tumoral expression levels. *Sci. Rep.*, v. 9, n. 1, p.1-10, 23 jul. 2019.

ULU, Mehmet et al. Prognostic significance of serum galectin-3 levels in patients with hepatocellular cancer and chronic viral hepatitis. *Saudi J Gastroentero.*, v. 21, n. 1, p.47-50, 2015.

YANG, Ri-yao et al. Galectin-12. *Adipocyte*, v. 1, n. 2, p.96-100, abr. 2012.

6. AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT-SG) e Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).



ÁREA DE SUBMISSÃO: Pesquisa clínica e pré-clínica

COMPOSTOS A BASE DE GÁLIO NO DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DE INFECÇÕES FÚNGICAS

L. V. de ARAÚJO¹, M. C. C. ERHARDT¹, T. R. R. TIMÓTEO¹, V. A. W. SALES¹, C. G. de MELO¹, M. L. de SOUZA¹, P. C. D. da SILVA², R. M. F. da SILVA¹, L. A. ROLIM³, P. J. ROLIM NETO¹.

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos, Recife-PE;

² Universidade Estadual da Paraíba, Departamento de Farmácia, Paraíba-PB.

³ Universidade Federal do Vale do São Francisco, Central de Análise de Fármacos Medicamentos e Alimentos, Petrolina-PE.

E-mail para contato: lorenavasconcelos_live@live.com

RESUMO – O gálio é um metal de transição atualmente utilizado na medicina nuclear com função diagnóstica, devido aos seus isótopos ⁶⁷Ga e ⁶⁸Ga serem capazes de emitir radiação. Além disso, a habilidade do gálio em ser um mimético do ferro em processos ferro-dependentes culminou em extensa pesquisa da aplicação de compostos de gálio como agente terapêutico em processos patológicos de diversas origens, incluindo as infecções fúngicas, nas quais o Ga⁺³ demonstra ter efeito fungistático. A fim de fornecer evidências da literatura sobre as atividades antifúngicas de estudos pré-clínicos dos compostos de gálio como uma nova alternativa terapêutica, elucidando os principais mecanismos envolvidos e os principais patógenos fúngicos afetados, foi realizado um levantamento de dados nos periódicos: Science Direct, Pubmed e Google Acadêmico através das buscas textuais: “gallium”, “Therapy”, “diagnosis”, “antifungal”, “antimicrobial”, “evaluation”, “efficacy”, “spect”. Os resultados encontrados apontam os efeitos fungistáticos dos compostos de gálio contra fungos e leveduras, como *A. fumigatus* e diversas espécies do gênero *Candida spp.*, o que o torna um elemento promissor para o tratamento antifúngico. Além disso, de acordo com a literatura, o gálio também apresenta interações sinérgicas com fármacos, podendo ser útil para melhoria das farmacoterapias atuais.

Palavras-chave: Radiomarcagem. Fungicida. Química Medicinal. Terapia Antifúngica.

ABSTRACT – Gallium is a transition metal currently used in nuclear medicine as diagnostic agent as its isotopes, ⁶⁷Ga and ⁶⁸Ga, are capable of emitting radiation. Moreover, the ability of Gallium to act as an iron mimetic in iron-dependent processes culminates in extensive research regarding the application of gallium compounds as a therapeutic agent in pathological processes of diverse origins, including fungal infections in which Ga⁺³ has fungistatic effects. In order to provide evidence from the literature on the antifungal activities of preclinical studies of gallium compounds as a new therapeutic alternative, elucidating the main mechanisms involved and the main fungal



pathogens affected, a data survey was carried out in following databases: Science Direct, Pubmed and Google Scholar using the terms: “gallium”, “Therapy”, “diagnosis”, “antifungal”, “antimicrobial”, “evaluation”, “efficacy”, “spect”. The results found point to the fungistatic effects of gallium compounds against fungi and yeasts such as A. fumigatus and several species of the genus Candida spp., which makes it a promising element for antifungal treatment. In addition, according to the literature, gallium also has synergistic interactions with drugs, which can be useful for improving current pharmacotherapies.

Keywords: Radiomarking. Fungicide. Medicinal Chemistry. Antifungal Therapy.

1. INTRODUÇÃO

O elemento gálio é um metal de transição de número atômico 31, presente no grupo 13 (IIIA) da tabela periódica (CHITAMBAR, 2010). No organismo humano, o gálio não possui função fisiológica conhecida. Porém, seus isótopos ^{67}Ga e ^{68}Ga são utilizados como radiofármacos na medicina nuclear, para diagnóstico por imagem de tumores como a doença de Hodgkin, linfomas, tumor dos pulmões e melanoma, uma vez que possuem a capacidade de se acumular em processos inflamatórios e em células com alta demanda de ferro (GREEN; WELCH, 1989; JAKUPEC; KEPPLER, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Além da capacidade de aplicação diagnóstica, o gálio possui características que o permite interagir em processos biológicos importantes, o que culminou em extensa pesquisa da aplicação do gálio como agente terapêutico em processos patológicos de origem óssea, processos inflamatórios, câncer e doenças infecciosas, conforme pode ser observado na Figura 1 (CHITAMBAR, 2010; SALES *et al.*, 2020).

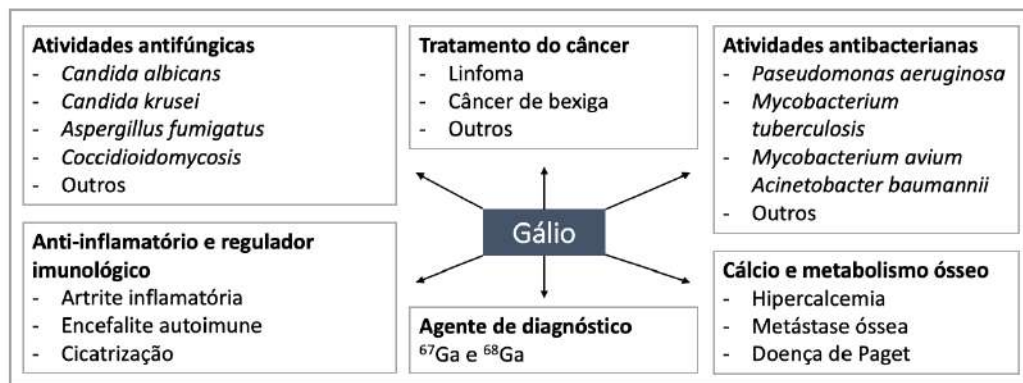


Figura 1 – Aplicações terapêuticas dos compostos de gálio.

Embora não seja utilizado fisiologicamente pelo organismo humano, o gálio no estado mais oxidado (Ga^{+3}) possui a semelhança carga/raio com o íon férrico (Fe^{+3}), o qual devido à sua capacidade de doar e receber elétrons, é importante em diversos processos bioquímicos, entre eles, a eritropoiese, metabolismo energético e a síntese de DNA (NEGRI, 2013). Tal semelhança com o Fe^{+3} permite que o Ga^{+3} mimetize a ação do íon férrico, interferindo no metabolismo de microrganismos dependentes de ferro (LESSA, 2012; TIMÓTEO, *et al.*, 2020). Dada esta última aplicação, pesquisadores demonstraram a atividade de compostos de gálio, como o Nitrato de Gálio ($\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$) contra a ação de bactérias de diferentes espécies.



Na terapia antifúngica, a utilização de compostos a base de gálio não se restringe apenas às substâncias ativas, mas também no auxílio de diagnóstico de algumas infecções e tumores que são agravados por fungos, através de marcadores PET SCAN e SPECT a base de ^{67}Ga . Dessa forma, também foram abordados neste trabalho substâncias ligadas aos átomos de gálio que possuem propriedades antifúngicas, assim como, nos relatos de caso do uso de SPECT ^{67}Ga no diagnóstico de infecções generalizadas por fungos (PETRIKKOS *et al.*, 2001).

Diante da abundância de estudos que demonstram o mecanismo de ação do gálio na interferência do metabolismo do ferro, a *Food and Drug Administration* – FDA aprovou o metal como mimético de ferro, o que permitiu a aplicação do gálio na elaboração de medicamentos antimicrobianos (HIJAZI *et al.*, 2018). Estudos relataram a ação do gálio contra células fúngicas *in vitro*, inibindo seu crescimento ou aumentando a potência de medicamentos já existentes, contra diferentes espécies do gênero *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, bem como a espécie bacteriana *Pseudomonas aeruginosa* as quais são responsáveis por causar relevantes infecções em humanos, com alta taxa de mortalidade (BASTOS *et al.*, 2010; PERFECT, 2017; BASTOS *et al.*, 2019).

As infecções fúngicas representam um grave problema de saúde pública pois são a causa de 1,6 milhões de mortes ao ano e, associado a isso, há uma emergência em desenvolver novos medicamentos antifúngicos em virtude da acelerada resistência que as espécies desenvolvem às poucas classes de medicamentos atualmente disponíveis no mercado (azol, análogos da piridina, equinocandinas e polienos). Aliados aos estudos que evidenciam a eficácia do cátion trivalente de gálio como agente fungistático e menos favorável a desenvolver resistência, já que atua em diferentes grupos de biomoléculas, os compostos de gálio surgem como uma alternativa que merece destaque na pesquisa e desenvolvimento de medicamentos antifúngicos (PERFECT, 2017; BASTOS *et al.*, 2019; TIMÓTEO *et al.*, 2020). Nesse sentido, esta revisão teve como objetivo fornecer evidências da literatura sobre as atividades antifúngicas de estudos pré-clínicos dos compostos de gálio como uma nova alternativa terapêutica, elucidando os principais mecanismos envolvidos e os principais patógenos fúngicos afetados.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A construção do trabalho foi embasada através de um levantamento de dados no período de 2001 a 2020, realizado em sites periódicos, incluindo como base o Science Direct, PubMed e Google Acadêmico. A pesquisa por palavras foi realizada em títulos e resumos, utilizando as seguintes entradas associadas ou separadamente: *gallium*, *medicine*, *cryptococcus*, *antifungal*, *antimicrobial*, *evaluation*, *efficacy*, *spect*. Posteriormente, o conteúdo foi analisado criteriosamente, considerando o enquadramento dos artigos explorados no assunto escolhido e objetivos propostos para a realização da pesquisa. Foram selecionados 10 artigos para discussão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A ação do gálio ligado a acetilpiridina sobre as cepas de *Candida albicans* foi analisada *in vitro* por Mantareva *et al.* (2011). Os resultados obtidos mostraram-se satisfatórios na inibição celular desses fungos, comprovando a capacidade deletéria do gálio mediante às células dependentes de íons férricos. Além da propriedade fungistática do complexo de gálio-acetilpiridina, é relatado o potencial uso do gálio como agente antitumoral e de radiomarcagem, devido a sua propriedade diamagnética. Entretanto, quando comparado ao uso da mesma tiosemicarbazona com índio no estado III para uso terapêutico, o gálio não se mostra tão estável, devendo-se proceder com estudos de fundamentação estrutural e estereoquímica (CHAN *et al.*,



2010). Em relação aos compostos de coordenação ligados ao gálio que combatem o desenvolvimento de cepas de *Candida albicans*, foi possível observar *in vitro* o potencial efeito de tiosemicarbonas derivadas de chalconas, ligadas a Ga^{3+} , de forma animadora (DA SILVA *et al.*, 2013).

Além dos estudos realizados para verificar a eficácia do gálio frente a espécies de *Candida*, pesquisadores também demonstraram *in vitro* que o gálio apresenta um efeito fungistático contra cepas de *Aspergillus fumigatus* sensíveis ao azol e resistentes, adquirindo essa característica por não reduzir 99% da carga de fungos em comparação com o inóculo inicial para todas as cepas. Quando combinado com Caspofungina, foi notado um efeito sinérgico, sendo consideravelmente importante para a utilização dessa associação como um tratamento potente alternativo frente a terapia contra a infecção por fungos, inclusive aos resistentes (PERFECT, 2017; BASTOS *et al.*, 2019).

A cintilografia tomográfica de perfusão cerebral (SPECT) é um exame realizado para detectar alterações na circulação do sangue e função cerebral, sendo atualmente incorporada na rotina diária de muitos departamentos de medicina nuclear (COSTA *et al.*, 2001). De acordo com a literatura, o SPECT ^{67}Ga é utilizado como marcador celular e auxilia médicos no diagnóstico e tratamento de infecções fúngicas, como relatado por Petrikkos *et al.* (2001), onde duas pacientes, com idades entre 75 e 59 anos, com osteomielite esternal por *Candida* foram tratadas com sucesso pela administração de triazóis e monitoradas com SPECT ^{67}Ga , que apresentou grande precisão nas imagens, auxiliando e confirmando a cura do paciente.

Para estudar o efeito da combinação de gálio com antifúngicos utilizados no tratamento da aspergilose (voriconazol, posaconazol, anfotericina B e caspofungina), foi determinado o FICI (índice de concentração inibitória fracionária). O gálio apresentou interações independentes com voriconazol, posaconazol e anfotericina B ($0,5 < FICI \leq 4,0$), porém, com a caspofungina (32,0mg/L de gálio e 8mg/L de caspofungina), apresentou uma interação sinérgica ($FICI \leq 0,5$), diminuindo o crescimento da hifa em comparação ao tratamento único com medicamento (BASTOS *et al.*, 2010). Contudo, os resultados mostraram que o gálio não foi capaz de inibir *Aspergillus fumigatus* no GMM (meio mínimo de glicose), sugerindo que alguns componentes do meio possam interferir com o efeito diferencial de fungos (CHITAMBAR, 2010; GOSS *et al.*, 2018). Assim, foi investigado se a ausência de inibição no GMM estaria relacionada à presença de ferro no meio. Para verificar a hipótese de que o gálio pode interferir na homeostase do ferro celular em *A. fumigatus*, conídios foram testados em diferentes concentrações de gálio em níveis crescentes de $FeSO_3$ e observou-se que a presença de ferro afetou negativamente a atividade antifúngica (BASTOS *et al.*, 2010).

Além disso, notou-se um forte sinergismo entre um quelante de ferro (BPS) e gálio, quando estes foram combinados, provando que a presença de ferro interfere na atividade antifúngica do gálio. Também foram realizados testes no meio mínimo de glicose sem ferro, corroborando todos os resultados que o aumento das concentrações de ferro interfere negativamente a atividade do gálio contra *A. fumigatus*. Por fim, o gálio também inibiu as cepas multirresistentes de *C. haemulonii*, *C. duobushaemulonii*, *C. glabrata* e *C. auris*, demonstrando um fator potencial para infecções causadas por patógenos emergentes. Mais estudos precisam ser realizados para determinar se os efeitos relatados também se manifestam *in vivo* (BASTOS *et al.*, 2019).



4. CONCLUSÃO

Os estudos pré-clínicos revelam que o gálio tem apresentado efeitos fungistáticos contra fungos e leveduras, como *A. fumigatus* e diversas espécies do gênero *Candida* spp, bem como propiciado interações sinérgicas com outros fármacos, o que pode culminar em melhor eficácia e redução de resistência. Seu efeito parece estar relacionado ao seu mecanismo de ação no interior da célula, que leva à interrupção das atividades do ferro relacionadas ao metabolismo celular. Assim, os compostos de gálio podem ser considerados como promissoras moléculas para tratamento antifúngico, principalmente no combate às micoses mais graves, comuns e difíceis de tratar como as causadas por *A. fumigatus*, *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp. No futuro, os estudos devem se concentrar em testar quais compostos à base de gálio são mais eficazes e específicos contra células fúngicas e a segurança desses medicamentos para o hospedeiro.

5. REFERÊNCIAS

- BASTOS, T. O.; SOARES, B. M.; CISALPINO, P. S.; MENDES, I. C. SANTOS, R.G.; BERARDO, H. Coordination to gallium(III) Strongly Enhances the Potency of 2-pyridineformamide Thiosemicarbazones Against Cryptococcus Opportunistic Fungi. *Microbiol Res.*, v. 165, n. 7, p. 573-577, 2010.
- BASTOS, R. W.; ROSSATO, L.; VALERO, C.; LAGROU, K.; COLOMBO, A. L.; GOLDMAN, G. H. Potential of Gallium as an Antifungal Agent. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9:414, 2019.
- BROWN, G. D.; DENNING, D. W.; LEVITZ, S. M. Tackling human fungal infections. *Science*, 36:647, 2012.
- CHAN, J; THOMPSON, A.L; JONES, M. W; PEACH, J.M. Synthesis and Structural Studies of Gallium (III) and Indium (III) Complexes of 2-acetylpyridine Thiosemicarbazones. *Inorganica Chimica Acta*, v. 363, n. 6, p. 1140-1149, 2010.
- CHITAMBAR, C.R. Medical Applications and Toxicities of Gallium Compounds. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, v. 7, n. 5, p. 2337-2361, 2010.
- COSTA, D. C.; OLIVEIRA, J. M. A. P.; BRESSAN, R. A. PET e SPECT em neurologia e psiquiatria: do básico às aplicações clínicas. *Rev. Bras. Psiquiatr. vol. 23, suppl.1*, 2001.
- DA SILVA, J. G.; PERDIGÃO, C.C.H.; SPEZIALI, N.L.; BERARDO, H. Chalcone-Derived Thiosemicarbazones and Their Zinc(II) and Gallium(III) Complexes: Spectral Studies and Antimicrobial Activity. *Journal of Coordination Chemistry*, v. 66, n. 3, p. 385-401, 2013.
- FREIRE, F.; BARROS, P.P.; ÁVILA, D.S.; BRITO, G.N. B.; JUNQUEIRA, J.C.; JORGE, A.O.C. Evaluation of Gene Expression SAP5, LIP9, and PLB2 of *Candida albicans* Biofilms After Photodynamic Inactivation. *Lasers Med Sci*, v. 30, n. 5, p. 1511-1518, 2015.



GREEN, M. A.; WELCH, M. J. Gallium radiopharmaceutical chemistry. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part B. Nuclear Medicine and Biology*, v. 16, n. 5, p. 435-448, 1989.

LESSA, J.A; PARRILHA.G.L; BERALDO.H. Gallium Complexes as New Promising Metallo-drug Candidates. *Inorganica Chimica Acta*, v. 393, n. 1, p. 53–63, 2012.

MANTAREVA, V.; KUSSOVSKI, V.; ANGELOV, I.; WOHRLE, D.; DIMITROV, R. POPOVA, E.; DIMITROV, S. Non-aggregated Ga(III)-phthalocyanines in the photodynamic inactivation of planktonic and biofilm cultures of pathogenic microorganisms. *Photochem Photobiol Sci*, v. 10, n. 1, p. 91-102, 2011.

NEGRI, J. L. Metabolismo do ferro e eritropoiese. *Ac&T Científica*, v. 1, n. 10, p.1-10, 2013.

OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; FERREIRA, D.; COELHO, P.; VEIGA, F. Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 2, p. 151-165, 2006.

ONAY, E. O; ALIKAYA, C; SEKER, E. Evaluation of Antifungal Efficacy of Erbium, Chromium:Yttrium-Scandium-Gallium-Garnet Laser Against *Candida albicans*. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 28, n. 1, p. S73–S78, 2010.

PERFECT, J.R. The Antifungal Pipeline: A Reality Check. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, p. 603–616, 2017.

PETRIKKOS, G.; SKIADA, A.; SABATAKOU, H.; ANTONIADOU, A.; DOSIOS, T.; GIAMARELLOU, H. Case report. Successful Treatment of Two Cases of Post-Surgical Sternal Osteomyelitis, Due to *Candida krusei* and *Candida albicans*, Respectively, with High Doses of Triazoles (fluconazole, itraconazole). *Mycoses*, v. 44, n. 9-10, p.422-5, 2001.

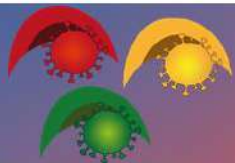
PRZYBYSZ, C.H.; SCOLIM, E.; FORCATO, A.; ARAÚJO, K.; COST, L. Avaliação do Possível Crescimento e Resistência de Espécies Fúngicas ao Formol. *Revista Saúde e Pesquisa*, v. 2, n. 3, p. 325-331, 2009.

SALES, V. A. W.; TIMÓTEO, T. R. R.; SILVA, N. M.; MELO, C. G.; FERREIRA, A. S.; OLIVEIRA, M. V. G. et al. A systematic review of the anti-inflammatory effects of gallium compounds. *Current Medicinal Chemistry*, v. 27, p. 1-16, 2020.

TZEN, K.Y.; YEN, T.C.; LIN, K. J. Value of Ga-67 SPECT in Monitoring the Effects of Therapy in Invasive Aspergillosis of the Sphenoid Sinus. *Clinical Nuclear Medicine*, v. 24, n. 12, p. 928-941, 1999.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsas aos pesquisadores envolvidos neste trabalho.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Pesquisa clínica e Pré-clínica

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DE NOVAS MOLÉCULAS ATIVADAS POR HIPÓXIA COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA PARA O CÂNCER PANCREÁTICO.

L. G. S. SANTOS¹, A. F. SILVA FILHO¹, R. B. OLIVEIRA.², I. R. PITTA¹, M. G. R. PITTA¹
e M. J. B. M. RÊGO¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Núcleo de Pesquisa em Inovação terapêutica, Laboratório de imunomodulação e novas abordagens terapêuticas;

² Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Produtos Farmacêuticos;

E-mail para contato: lucasbiomedico@live.com

RESUMO – O adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) é o tipo de neoplasia mais frequente do pâncreas e está relacionado com alta taxa de mortalidade, devido ao seu diagnóstico tardio e a resistência aos quimioterápicos. Devido a desmoplasia tecidual, característica da massa tumoral pancreática, e a um microambiente hipóxico, a maioria dos quimioterápicos são ineficazes em combater o PDAC. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito citotóxico de novas moléculas nitroaromáticas ativadas por hipóxia como estratégia alternativa para o tratamento quimioterápico do PDAC. Através de citometria de fluxo com marcação com iodeto de propídeo, foi possível realizar o screening inicial de 26 compostos nitroaromáticos nas linhagens PANC-1 e MIA-PaCa-2. As moléculas foram cedidas gentilmente pelo Laboratório de Química Farmacêutica e Medicinal da UFMG. O composto EAN₃ apresentou um IC₅₀ de 35 μM em MIA-PaCa-2 em hipóxia contra 50 μM em normóxia, e o composto EANB apresentou um IC₅₀ de 25 μM em PANC em hipóxia contra 30 μM em normóxia, mostrando serem moléculas promissoras para estudos posteriores.

Palavras Chave: Moléculas nitroaromáticas, citometria de fluxo, neoplasia.

ABSTRACT - Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is a tumor of the gastrointestinal system, which is related to a high mortality rate, due to its late diagnosis and resistance to chemotherapy. Due to tissue desmoplasia, characteristic of the pancreatic tumor mass, and to a hypoxic microenvironment, most chemotherapeutic agents are ineffective in kill transformed cells. The present study aims to evaluate the cytotoxic effect of new nitroaromatic molecules hypoxia activated as a strategy to combat PDAC. Through flow cytometry with propidium iodide, it was possible to observe the cytotoxic effect of two EANB and EAN₃ molecules in PDAC lineages of PANC-1 and MIA-PaCa-2. The compound EAN₃ showed an IC₅₀ of 35 μM in MIA-PaCa at hypoxia against 50 μM at normoxia, and the EANB molecule showed an IC₅₀ of 25 μM in PANC



at hypoxia against 30 μ M at normoxia, showing to be promising molecules for further studies.

Keywords: Nitroaromatic molecules, flow cytometry, neoplasia.

1. INTRODUÇÃO

O câncer de pâncreas é um tipo neoplásico maligno, letal e resistente à maioria das terapias sistêmicas disponíveis até momento, sendo a 4^a causa de morte por tumores sólidos, enquanto ocupa a 10^a posição em incidência geral (MCGUIGAN *et al.*, 2018). O PDAC possui uma característica morfológica que o distingue dos demais tumores sólidos existentes. A massa tumoral pancreática é composta apenas por cerca de 10% do total de células, onde os 90% restantes são constituídos de estroma associado ao tumor. O excesso de produção de matriz extracelular é denominado desmoplasia. Esta desmoplasia vai contribuir diretamente para: formação de zonas de hipóxia intratumoral, agressividade, progressão, metástase e resistência a quimioterápicos (ADAMSKA; DOMENICHINI; DOUGAN, 2017; MCGUIGAN *et al.*, 2018)

Na tentativa de encontrar alternativas terapêuticas para o PDAC, o desenvolvimento de drogas seletivas ao microambiente hipóxico vem sendo realizado (HONG *et al.*, 2018). Um exemplo de classe de compostos que vem sendo estudada para essa finalidade, são os compostos nitroaromáticos. Nestes compostos, o agrupamento nitro pode ser biorreduzido liberando espécies reativas de nitrogênio capazes de causar dano a estruturas celulares através do estresse oxidativo. Em condições de hipóxia, biorreduções adicionais são favorecidas liberando agentes alquilantes como espécies ainda mais citotóxicas (LOPES *et al.*, 2015).

O presente estudo visou contribuir com o tratamento do adenocarcinoma pancreático, trazendo novas moléculas nitroaromáticas ativadas por hipóxia como estratégia terapêutica alternativa.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 CULTIVO DE CÉLULAS, EXPOSIÇÃO A HIPÓXIA E AVALIAÇÃO DE MORTE

As células de PANC-1 e MIA-PaCa-2 foram cultivadas em meio DMEN suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina 200 U/mL. Para a linhagem MIA PaCa-2 houve a suplementação adicional de 2,5% de soro equino. As células foram mantidas em incubadora de atmosfera úmida a 37°C com 5% de CO₂. A troca de meio foi realizada sempre que o necessário para manutenção da viabilidade celular.

2.2 ENSAIO DE EXPOSIÇÃO A HIPÓXIA E AVALIAÇÃO DE MORTE

Para o ensaio de exposição a hipóxia, as células foram semeadas numa densidade de 2×10^5 células por poço, em 2 ml de meio completo, em placas de 12 poços de fundo chato, e em duplicata para cada condição.

Um *screening* inicial feito a partir de 26 compostos nitroaromáticos, foi realizado em linhagem de PANC-1 e MIA-PaCa-2 para triar os de maior atividade citotóxica. Todos os compostos foram sintetizados e cedidos gentilmente pelo laboratório de química farmacêutica e medicinal da Universidade Federal de Minas Gerais. Todas as moléculas foram dissolvidas em DMSO 0,1%.

As condições experimentais foram: controle não tratado (CNT); veículo de dissolução dos compostos (DMSO 0,1%); e o tratamento com os compostos nas concentrações 12,5 μ M, 25 μ M

e 50 μM . Após 24 horas (PANC-1), ou 48 horas (MIA-PaCa-2) de incubação, o meio dos poços foi renovado e as moléculas nitroaromáticas adicionadas nas condições citadas anteriormente. Em sequência, as placas foram direcionadas para submissão à normóxia ou hipóxia. As células em normóxia foram incubadas a 37°C e 5% CO_2 por 48 horas. As células hipóxia foram mantidas em câmara de hipóxia com 95% de N_2 , 5% de CO_2 e $\text{PO}_2 < 1\%$, e armazenadas em estufa DBO a 37°C por 48 horas. A confirmação do estabelecimento da atmosfera hipóxia dentro da câmara foi realizada através de utilização de sensor de oxigênio (cap 3000, Dräger, GER).

A avaliação de morte foi realizada através de citometria de fluxo (Accuri C6 PLUS, BD Biosciences) com marcação de iodeto de propídeo (PI) (Sigma-Aldrich).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 26 compostos testados, dois deles, EANB e EAN₃, apresentaram alta atividade citotóxica. A estratégia de *gate* da figura 1, exemplifica como foi organizado o ensaio de citotoxicidade por iodeto de propídeo através da citometria de fluxo. O composto EANB apresentou IC₅₀ de 25 μM em hipóxia e 30 μM em normóxia na linhagem de PANC-1 (Quadro 1). O composto EAN₃ apresentou um IC₅₀ de 35 μM em hipóxia e 50 μM em normóxia na linhagem de MIA-PaCa-2 (Quadro 1).

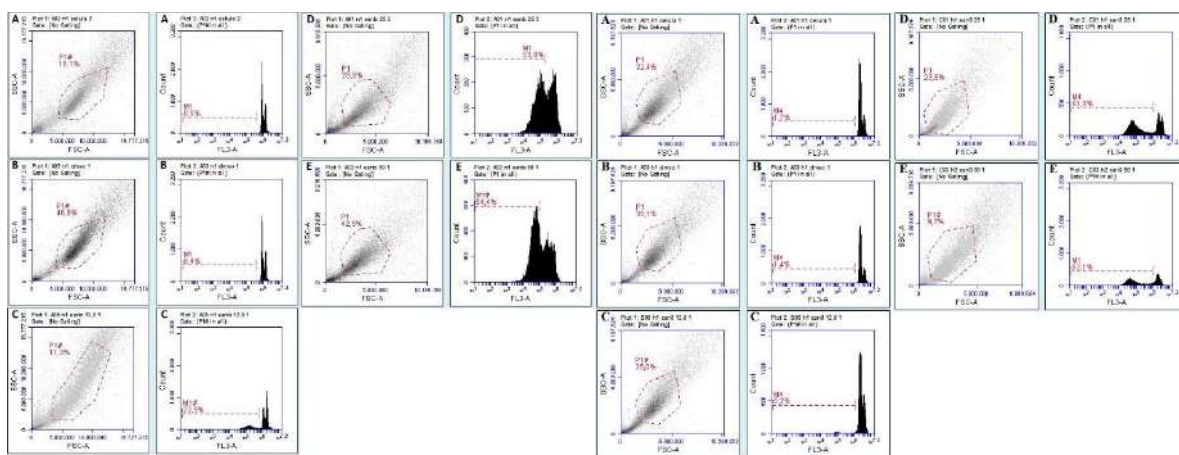


Figura 1 – Estratégia de gate utilizada no ensaio de citometria de fluxo com iodeto de propídeo em hipóxia para os compostos nitroaromáticos EANB (esquerda) e EAN₃ (direita) em PANC-1 e MIA-PaCa-2 respectivamente. A) Controle não tratado. B) Condição DMSO 0,1%, veículo dos compostos. C) Composto na concentração de 12,5 μM . D) Composto na concentração de 25 μM . E) Composto na concentração de 50 μM .

Quadro 1 – IC 50 dos compostos nitroaromáticos em hipóxia e normóxia.

	IC 50 Hipóxia	IC 50 Normóxia
EANB (PANC-1)	25 μM	30 μM
EAN ₃ (MIA-PaCa-2)	35 μM	50 μM

Os compostos nitrogenados possuem atividade anticâncer comprovada, e são alvo para o desenvolvimento de novas estratégias para o combate ao câncer. Nossos resultados corroboram com a literatura trazendo compostos que foram capazes de matar as células tumorais pancreáticas em concentrações de até 50 μM (LOPES *et al.*, 2015). O composto EAN₃ foi citotóxico contra a linhagem de MIA-PaCa-2 e possui agrupamento azida em sua composição, estudo *in vitro* mostra



que compostos com azida na sua composição são capazes de diminuir a proliferação de câncer de mama (BANSODE *et al.*, 2019). O composto EANB além possuir os agrupamentos nitro, possui bromo em sua estrutura podendo justificar sua boa atividade *in vitro*, seguindo o exemplo do TH-302, droga ativada por hipóxia bastante utilizada nos ensaios clínicos (HONG *et al.*, 2018).

Outra característica importante a ser observada nos compostos nitroaromáticos do estudo, foi a capacidade de serem mais citotóxicos na condição de hipóxia testada. Essa característica traz mais seletividade as moléculas, conseqüentemente trazendo menos efeitos colaterais ao paciente, sendo este um aspecto importante no desenvolvimento de novas moléculas com propriedades anticâncer (I *et al.*, 2016; LARUE *et al.*, 2016; SCHMALZ; DUNST, 2015).

4. CONCLUSÃO

Os compostos nitroaromáticos EANB e EAN₃ ativados por hipóxia, causaram a morte das células de PANC-1 e MIA-PaCa-2 *in vitro*, onde ambas mostraram IC₅₀ menor em hipóxia, apresentando potencial para seguirem para outros ensaios para comprovar sua eficácia.

5. REFERÊNCIAS

- ADAMSKA, Aleksandra; DOMENICHINI. *Pancreatic ductal adenocarcinoma: Current and evolving therapies. International Journal of Molecular Sciences*. 2017.
- BANSODE, Prakash *et al.* Evaluation of drug candidature: In silico ADMET, binding interactions with CDK7 and normal cell line studies of potentially anti-breast cancer enamidines. *Computational Biology and Chemistry*, v. 83, n. September, p. 107124, 2019.
- DOUGAN, Stephanie K. 00130404-201711000-00004.Pdf. v. 23, n. 6, p. 5–9, 2017.
- HONG, Cho Rong *et al.* Cellular pharmacology of evofosfamida (TH-302): A critical re-evaluation of its bystander effects. *Biochemical Pharmacology*, v. 156, p. 265–280, 2018.
- HWANG, Rosa F. *et al.* Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer Research*, v. 68, n. 3, p. 918–926, 2008.
- I, Lohse *et al.* Targeting hypoxic microenvironment of pancreatic xenografts with the hypoxia-activated prodrug TH-302. *Oncotarget*, v. 7, n. 23, p. 33571–33580, 2016.
- MCGUIGAN, Andrew *et al.* Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World Journal of Gastroenterology*, v. 24, n. 43, p. 4846–4861, 2018.
- LARUE, Ruben T.H.M. *et al.* A phase 1 “window-of-opportunity” trial testing evofosfamida (TH-302), a tumour-selective hypoxia-activated cytotoxic prodrug, with preoperative chemoradiotherapy in oesophageal adenocarcinoma patients. *BMC Cancer*, v. 16, n. 1, p. 1–8, 2016.
- SCHMALZ, Claudia; DUNST, Jürgen. TH-302 – ein neues unter Hypoxie aktiviertes Zytostatikum beim Pankreaskarzinom TH-302: a new hypoxia-activated cytostatic agent in pancreatic cancer treatment. *Strahlentherapie und Onkologie*, v. 191, n. 10, p. 819–820, 2015.
- SIEGEL, Rebecca L.; MILLER, Kimberly D.; JEMAL, Ahmedin. Cancer statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 66, n. 1, p. 7–30, 2016.

6. AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).



ÁREA DE SUBMISSÃO: Pesquisa clínica e Pré-clínica

AValiação DA ATIVIDADE GASTROPROTEORA DO EXTRATO HEXÂNICO DE *Croton heliotropiifolius* Kunth

J. A. G. SILVA¹, R. S. de SOUSA², E. F. O. BORBA³, K. R. L. P. RAMOS², M. G. O. de SOUSA⁴, S. J. L. da SILVA⁵, M. G. F. SILVA¹, T. G. da SILVA⁵

¹Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Antibióticos;

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Antibióticos;

³Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Antibióticos;

⁴Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia;

⁵Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Antibióticos.

E-mail para contato: jessica.andrade.gs@gmail.com

RESUMO – *As úlceras gástricas afetam milhares de pessoas no mundo e uma das alternativas na descoberta de novos medicamentos está na utilização de produtos naturais. A espécie Croton heliotropiifolius Kunth vem sendo referida pela população como útil contra dor de estômago. Deste modo, este estudo teve o objetivo de avaliar o potencial gastroprotetor in vivo do C. heliotropiifolius em modelos de lesão gástrica. O extrato hexânico (EHCh) foi obtido por maceração, com troca de solvente a cada 72 horas. Para a avaliação da atividade gastroprotetora, os animais (ratos, Wistar) foram divididos em grupos que receberam o EHCh nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, os grupos controles positivo e negativo receberam lansoprazol (30 mg) e veículo, respectivamente. Após o tratamento, foi induzida a lesão gástrica por etanol absoluto (4 mL/kg). Posteriormente, os animais foram eutanasiados, os estômagos abertos pela curvatura maior, a fim de calcular o índice de lesão ulcerativa (ILU). Para a determinação da concentração de óxido nítrico (NO), foi preparado um homogenato da região glandular dos estômagos e submetidos a reação de Griess. O EHCh, nas concentrações de 50, 100 e 200 mg/Kg, foi capaz de reduzir as lesões gástricas em 85,16; 86,75 e 87,68 %, respectivamente. As dosagens de óxido nítrico demonstraram aumento significativo. Assim, o efeito gastroprotetor do extrato de C. heliotropiifolius pode estar relacionado a capacidade citoprotetora do óxido nítrico na mucosa gástrica.*

Palavras chave: Úlceras gástricas, produtos naturais, óxido nítrico.

ABSTRACT - *The gastric ulcers affect millions of people around the world and one of the alternatives in the discovery of new drugs is the use of natural products. The species Croton*



heliotropiifolius Kunth has been referred by the population as useful against stomach pain. Thus, this study aimed to evaluate the *in vivo* gastroprotective potential of *C. heliotropiifolius* in models of gastric injury. Thus, this study aimed to evaluate the *in vivo* gastroprotective potential of *C. heliotropiifolius* in gastric injury models. The hexane extract (EHCh) was obtained by maceration, with a change of solvent every 72 hours. For the assessment of gastroprotective activity, the animals (rats, Wistar) were divided into groups that received EHCh at doses of 50, 100 and 200 mg/kg, the positive and negative control groups received lansoprazole (30 mg) and vehicle, respectively. After treatment, gastric lesion was induced by absolute ethanol (4 mL/kg). Subsequently, the animals were euthanized, their stomachs opened by the greater curvature, in order to calculate the ulcerative injury index (ULI). To determine the concentration of nitric oxide (NO), a homogenate from the glandular region of the stomachs was prepared and submitted to a Griess reaction. The EHCh, at concentrations of 50, 100 and 200 mg/kg, was able to reduce gastric lesions by 85.16; 86.75 and 87.68%, respectively. The nitric oxide dosages showed a significant increase. Thus, the gastroprotective effect of *C. heliotropiifolius* extract may be related to the cytoprotective capacity of nitric oxide in the gastric mucosa.

Keywords: Gastric Ulcers, Natural Products, Nitric Oxide

1. INTRODUÇÃO

A úlcera gástrica consiste em uma problemática de saúde bastante comum, caracterizada por injúria no tecido e em casos mais graves, acometimento de camadas profundas subjacentes (Hsia *et al.*, 2018). Portanto, é de suma importância o incentivo a investigações e desenvolvimento de terapias alternativas para o tratamento de problemas gástricos (Al-Snafi *et al.*, 2018).

Uma alternativa na busca de novas terapias para a prevenção e tratamento das doenças gástricas, está na utilização de produtos naturais. Visto que, é reconhecida a capacidade de muitos destes produtos de origem natural em retardar ou inibir a oxidação de moléculas, através da supressão de reações de oxidação em cadeia, conferindo efeito protetor, pois o estresse oxidativo crônico é responsável por muitas patologias, incluindo as gastrointestinais (El-Newary *et al.*, 2016). A espécie *Croton heliotropiifolius* Kunth, naturalmente encontrada na vegetação da Caatinga do Nordeste brasileiro, constitui um dos principais representantes do gênero *Croton*, sendo, assim como o gênero, largamente utilizado em infusões medicinais para o alívio da dor de estômago e como fitoterápico (Longhini *et al.*, 2016). Estudos fitoquímicos com a espécie constataram a presença de compostos fenólicos, da classe dos flavonoides (Silva *et al.*, 2017).

Assim, este estudo teve o objetivo de avaliar o potencial gastroprotetor do *C. heliotropiifolius* em modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e obtenção do extrato

A espécie *C. heliotropiifolius* (Euphorbiaceae) foi coletada no Município de Garanhuns (PE). A identificação botânica foi realizada no Herbário do Instituto Agronômico de Pesquisa (IPA), com o número de catálogo 93034. O extrato hexânico (EHCh) foi obtido por maceração, com troca de solvente a cada 72 horas.



2.2 Lesão gástrica aguda induzida por etanol absoluto

Os animais (ratos, Wistar) foram divididos em grupos (n=6) que receberam o EHCh nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, os grupos controles positivo e negativo receberam lansoprazol (30 mg) e veículo (solução aquosa de Tween 20 1%), respectivamente. Após 60 minutos dos tratamentos, os animais receberam por via oral 4,0 mL/kg de etanol absoluto. Transcorridos 60 minutos da administração do etanol, os animais foram eutanasiados e seus estômagos retirados, lavados com solução salina e abertos na sua maior curvatura para contagem das lesões ulcerativas e cálculos do índice de lesões ulcerativas (ILU) (Robert et al, 1979). O ensaio foi realizado com a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE, processo nº 135/2019.

2.3 Determinação dos níveis de óxido nítrico (NO)

Para a determinação da concentração de NO, foi preparado homogenato da região glandular dos estômagos em tampão fosfato 150 mM (pH 7,4) e a produção de óxido nítrico (NO) determinada através da reação de Griess (Green; Tannembaun; Goldman, 1981).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em nosso estudo, o EHCh, nas concentrações de 50, 100 e 200 mg/Kg, reduziu as lesões gástricas em 85,16; 86,75 e 87,68 %, respectivamente. A redução destes índices, foi capaz de promover diferença estatística quando comparadas ao controle lesionado, que apresentou um ILU de 73,84% (Figura 1).

A literatura correlaciona a capacidade gastroprotetora de espécies vegetais com a presença de compostos como taninos e flavonoides em sua composição (Vidal *et al.*, 2017), tais compostos foram constatados na espécie *C. heliotropiifolius* (Silva *et al.*, 2017).

O efeito gastroprotetor também tem sido observado no óleo essencial do *C. heliotropiifolius* (Vidal *et al.*, 2017).

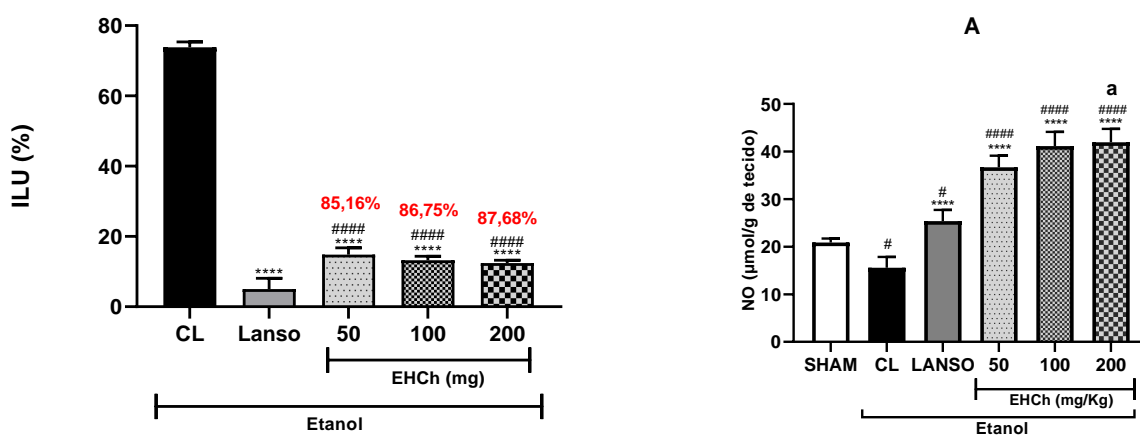
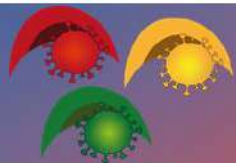


Figura 1 - Efeito da administração oral de EHCh sobre as lesões gástricas. Legenda: CL - controle lesionado; Lanso- Lansoprazol; EHCh. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão. Análise de variância *one way* ANOVA, seguido do teste de Tukey, onde **** $p < 0,0001$ vs CL e ##### $p < 0,0001$ vs Lansoprazol. Figura 1.A - Efeito da administração oral do EHCh nas concentrações de NO na mucosa gástrica. Legenda: A: pré-tratamento com EHCh; Onde: SHAM - grupo saudável; CL; Lanso; EHCh. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão. Análise de variância *one way* ANOVA, seguido do teste de Tukey, onde **** $p < 0,0001$ vs CL, # $p < 0,5$ ##### $p < 0,0001$ vs SHAM, a $p < 0,5$ vs 50.



O óxido nítrico possui relação direta na conservação da integridade da mucosa gástrica, estando envolvido na regulação da secreção de muco, de bicarbonato e de ácido gástrico, além de influenciar na manutenção do fluxo sanguíneo. Deste modo, atuando como agente antioxidante, citoprotetor e antiinflamatório (Shore *et al.*, 2017).

As dosagens de óxido nítrico no tecido gástrico demonstraram aumento significativo, em todas as concentrações do extrato quando comparadas ao controle lesionado, apresentando valores médios de 20,87 ($\pm 0,86$) $\mu\text{mol/g}$ de tecido para o grupo Sham, 15,58 ($\pm 2,25$) $\mu\text{mol/g}$ de tecido para o grupo controle lesionado, 25,38 ($\pm 2,36$) $\mu\text{mol/g}$ de tecido para o grupo tratado com lansoprazol (30 mg/Kg) e para o EHCh, nas concentrações de 50, 100 e 200 mg/Kg, os valores médios foram de 36,69 ($\pm 2,43$), 41,16 ($\pm 2,96$) e 41,94 ($\pm 2,81$) $\mu\text{mol/g}$ de tecido, respectivamente (Figura 1.A).

4. CONCLUSÃO

Com estes resultados, foi possível constatar o efeito gastroprotetor do extrato de *C. heliotropiifolius* em modelo de lesão gástrica induzida por etanol, tendo como possível mecanismo envolvido a capacidade antioxidante e citoprotetora do óxido nítrico na mucosa gástrica.

5. REFERÊNCIAS

GREEN, L. C.; TANNENBAUM, S. R. Goldman P. Nitrate synthesis in the germ-free and conventional rat. *Science*, 212, 56-8, 1981.

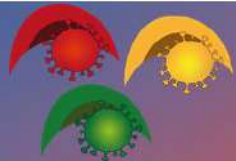
LONGHINI, R.; LONNI, A. A.; SEREIA, A. L.; KRZYZANIAK, L. M.; LOPES, G. C.; DE MELLO, J. C. P. *Trichilia catigua*: therapeutic and cosmetic values. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2016.

ROBERTS, E. A. H.; CARTWRIGHT, R. A.; OLDSCHOOL, M. The phenolic substances of manufactured tea. I.—Fractionation and paper chromatography of water-soluble substances. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 8(2), 72-80, 1957.

SILVA, J. A. G.; DA SILVA, G. C.; DE FARIAS SILVA, M. G.; DA SILVA, V. F.; DOS SANTOS AGUIAR, J.; DA SILVA, T. G.; LEITE, S. P. Physicochemical characteristics and cytotoxic effect of the methanolic extract of *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphorbiaceae). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 11(28), 321-326, 2017.

EL-NEWARY, S. A.; SULIEMAN, A. M.; EL-ATTAR, S. R.; SITOHY, M. Z. Hypolipidemic and antioxidant activity of the aqueous extract from the uneaten pulp of the fruit from *Cordia dichotoma* in healthy and hyperlipidemic Wistar albino rats. *Journal of natural medicines*, 70(3), 539-553, 2016.

AL-SNAFI, A. E. Arabian medicinal plants possessed gastroprotective effects-plant based review (part 1). *IOSR Journal of Pharmacy*, 8(7), 77-95, 2018.



HSIA, N. Y.; TSAI, Y. Y.; LIN, C. L.; CHIANG, C. C. Increased risk of peptic ulcer in patients with early-onset cataracts: A nationwide population-based study. *PloS one*, 13(11), 2018.

VIDAL, C. S.; MARTINS, A. O. B. P. B.; SILVA, A. A.; OLIVEIRA, M. R. C.; RIBEIRO-FILHO, J.; ALBUQUERQUE, T. R.; MENEZES, I. R. A. Gastroprotective effect and mechanism of action of *Croton rhamnifolioides* essential oil in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 89, 47-55, 2017.

SHORE, R.; BJÖRNE, H.; OMOTO, Y.; SIEMIATKOWSKA, A.; GUSTAFSSON, J.A.; LINDBLAD, M.; HOLM, L. Sex differences and effects of oestrogen in rat gastric mucosal defence. *World J. Gastroenterol.* 23, 426–436, 2017.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) e ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Pesquisa Clínica e Pré-clínica

PROTAGONISMO DAS GALECTINAS NO PROCESSO DE PROMOÇÃO DE NEOPLASIAS: REVISÃO INTEGRATIVA

I. M. G. ALMEIDA¹, D. T. V. SANTOS¹ e A. A. SILVA Jr²

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico do Agreste, Núcleo de Ciências da Vida;

² Doutorando em Cancerologia pelo Programa de pós-graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências.

E-mail para contato: auvaniantunes@gmail.com

RESUMO – *O câncer consiste em um crescimento desordenado das células, sendo considerado uma das principais doenças que acomete o Brasil. Essa proliferação anormal das células tumorais ocorre devido algumas características delas, como a resistência à apoptose e ao sistema imune. Essas características sofrem influência das galectinas, as quais exercem funções no processo de escape imune, angiogênese e metástase das células tumorais. Objetivou-se discutir sobre a atuação das galectinas em relação ao câncer, e como elas podem ser usadas no diagnóstico precoce e no tratamento dos tumores. O estudo foi conduzido através de uma revisão da literatura, com busca nas bases de dados SCIELO, MEDLINE e PUBMED, utilizando os descritores Galectina, Câncer e Biomarcador; com publicações no período de 2016 a 2020, dos quais se obteve uma amostra final de 11 artigos. As galectinas são uma família de proteínas que se ligam aos glicanos e conseguem regular o crescimento, a apoptose e a adesão das células, além de exercer influência sobre os receptores celulares, interferindo assim em inúmeras funções biológicas. A galectina-1 e a galectina-3 contribuem para a imunossupressão do sistema imune e para a angiogênese, já a galectina-9 ainda apresenta estudos divergentes quanto ao seu papel nas metástases tumorais. Assim, as galectinas exercem funções que corroboram com o desenvolvimento de tumores, sendo então um promissor alvo terapêutico no combate ao câncer e um interessante biomarcador tumoral.*

Palavras-chave: Galectina, Câncer, Biomarcador.

ABSTRACT – *Cancer consists in a disordered cell growth, being considered one of the main diseases that affects Brazil. This abnormal proliferation of tumor cells occurs due to some characteristics of them, such as resistance to apoptosis and the immune system. These characteristics are influenced by galectins, which play a role in the immune escape process, angiogenesis and metastasis of tumor cells. The objective was to discuss the role of galectins in relation to cancer, and how they can be used in early diagnosis and treatment of tumors. The study was conducted through a literature review, searching the databases SCIELO, MEDLINE and*



PUBMED, using the descriptors Galectin, Cancer and Biomarker; with publications from 2016 to 2020, from which a final sample of 11 articles was obtained. Galectins are a family of proteins that bind to glycans and are able to regulate cell growth, apoptosis and adhesion, in addition to influencing cellular receptors, thus interfering with numerous biological functions. Galectin-1 and galectin-3 contribute to the immunosuppression of the immune system and to angiogenesis, whereas galectin-9 still presents divergent studies regarding its role in tumor metastases. Thus, galectins exert functions that corroborate the development of tumors, thus being a promising therapeutic target in the fight against cancer and an interesting tumor biomarker.

Keywords: Galectin, Cancer, Biomarker.

1. INTRODUÇÃO

O câncer é considerado um dos principais agravos não transmissíveis que impactam na morbidade e mortalidade de pessoas em todo o mundo, em especial de brasileiros, sendo um importante pilar para o processo de transição epidemiológica. Nesse sentido, observa-se que a sua incidência vem crescendo com o passar do tempo, e as estimativas para o triênio de 2020-2022 pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) é o surgimento de 625 mil novos casos de câncer no Brasil, evidenciando assim sua influência na mudança do perfil de adoecimento da população brasileira (INCA, 2019; INCA, 2018).

Alguns fatores auxiliam o crescimento do número de novos casos de câncer, dentre eles, destaca-se a maior exposição da população à agentes cancerígenos devido a mudanças comportamentais da sociedade tanto em questão de trabalho, quanto em relação à alimentação. Além disso, um outro fator que contribui para o aumento da incidência dessa doença é a evolução da medicina, com a introdução de novas ferramentas diagnósticas, de antibióticos e vacinas, o que diminuiu a mortalidade por doenças agudas transmissíveis e prologou a expectativa de vida da população (INCA, 2018; SILVA et al., 2020).

Esse agravo pode contribuir para um crescimento desordenado das células com potencial de invadir órgãos vizinhos e à distância. Esse processo anormal de crescimento das células ocorre devido um acúmulo de mutações no genoma dos indivíduos (ARAÚJO et al., 2019). Quando essas mutações acometem os proto-oncogenes, os quais são os genes responsáveis por dar início ao ciclo celular normal das células, eles se transformam em oncogenes, os quais vão ativar constantemente esse ciclo de replicação celular, sendo, portanto, um gene promotor do tumor (ARAÚJO et al., 2019). No entanto, se essas mutações acometerem os genes supressores tumorais, os quais são genes responsáveis por inibir a proliferação celular, eles podem ficar inativados, favorecendo também o surgimento do tumor (ARAÚJO et al., 2019; PIRES et al., 2017).

Para que esse tumor continue a se proliferar anormalmente e se desenvolver, ele irá apresentar algumas características que o diferem das células normais do corpo. Dentre essas características destaca-se a resistência à apoptose, na qual as células cancerígenas conseguem evitar a morte celular programada regulando proteínas pró-sobrevivência, perdendo proteínas pró-apoptóticas através das mutações genéticas ou ainda inativam a proteína p53, a qual é responsável por bloquear o ciclo celular em casos onde haja alteração do DNA. Desse modo, através desses e de outros mecanismos, os tumores conseguem escapar da apoptose e continuar a sua proliferação (ARAÚJO et al., 2019; PIRES et al.; VAN ROOSBROECK et al., 2017).

Além de evitar a apoptose, as células tumorais apresentam também a característica de evitar o sistema imune do corpo. Para isso, as células cancerígenas interagem com o sistema de receptores



e ligantes que controlam a ativação das células T. Esse sistema é formado pelo receptor de morte celular programada 1 (PD-1), o qual é expresso pelas células T, e pelo ligante de morte celular programada 1 (PD-L1), o qual está presente em células do sistema imune, células-tronco mesenquimais e em algumas outras células não-hematopoiéticas (KERR et al., 2016; VAN ROOSBROECK et al., 2017). No entanto, as células tumorais também conseguem expressar o PD-L1, fazendo com que a interação desse ligante com o receptor PD-1 das células T promova um sinal inibitório que impede a sinalização da resposta pela célula T, a qual não consegue erradicar a célula tumoral (MÉNDEZ-HUERGO et al., 2017).

Outra característica marcante do câncer é a angiogênese, ou seja, a formação de novos vasos, os quais tem a função de proporcionar nutrientes e oxigênio para as células tumorais que estão em constante crescimento. As células tumorais utilizam fatores pró-angiogênicos, como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) para formar os novos vasos (FOUAD et al.; VAN ROOSBROECK et al., 2017). Esses novos vasos, por sua vez, são diferentes dos vasos normais do corpo, uma vez que não apresentam uma integridade endotelial forte, são tortuosos e dilatados. Existe ainda uma outra importante característica das células tumorais que é a sua capacidade de migrar e invadir tecidos à distância, causando a metástase (FOUAD et al.; VAN ROOSBROECK et al., 2017; KERR et al., 2016).

Nesse cenário, nota-se que as células tumorais apresentam vários mecanismos que permitem que elas sobrevivam e proliferem no corpo dos indivíduos. Para que esses mecanismos ocorram, as células cancerígenas apresentam elevados níveis de galectina, a qual consiste em uma proteína com a capacidade de influenciar no tempo de expressão, na localização e na atividade de vários receptores de superfície celular, conseguindo assim modificar as sinalizações celulares, a migração celular e a adesão das células (CHOU et al., 2018; STEGMAYR et al., 2019). Desse modo, a galectina exerce funções no processo de apoptose, escape imune, angiogênese e metástase das células tumorais, consistindo, portanto, em um importante elemento a ser estudando para fins diagnósticos e terapêuticos do câncer.

Assim, o presente estudo tem como objetivo principal reunir dados sobre como a galectina atua para proporcionar a sobrevivência das células cancerígenas, e como ela pode ser utilizada para auxiliar no diagnóstico precoce e no tratamento dos tumores.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo de revisão sistemática da literatura, no qual foram consultadas as bases de dados SCIELO, MEDLINE e PUBMED e selecionados artigos científicos publicados em língua inglesa e portuguesa, nos últimos quatro anos (2016 a 2020). Os descritores utilizados para a pesquisa de artigos nas bases de dados foram os seguintes: Galectina, Câncer, Biomarcador. A partir do cruzamento dos descritores foram identificados o número de 47 artigos, dentre os quais foram selecionados, num primeiro momento, 23 artigos de acordo com o objetivo dessa revisão, baseado na adequação do título. Posteriormente, realizou-se uma leitura minuciosa dos resumos dos artigos filtrados pelo título, obtendo uma amostra final de 8 publicações. Os trabalhos selecionados buscaram evidenciar como a galectina age para facilitar a proliferação das células tumorais e como ela pode ser utilizada como um biomarcador para permitir a detecção precoce do câncer nos indivíduos e ainda como meio terapêutico.



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para essa revisão, foram selecionados um total final de 8 artigos após a leitura dos títulos e dos resumos. Os trabalhos selecionados buscaram evidenciar a atuação das galectinas no processo de promoção das neoplasias e o potencial delas como alvo terapêutico e como biomarcadores. A Tabela 1 apresenta os principais apontamentos de cada artigo selecionado.

Tabela 1. Fenômenos neoplásicos relacionados a galectinas por autor e ano.

Ano	Autor	Galectina	Fenômeno neoplásico
2016	Elizabeth Ann L. Enninga	Galectina-9	Apresenta papel imunossupressor
2017	Monica Gordon-Alonso	Galectina-3	Suprime o sistema imune
2016	P. Storti	Galectina-1	Influencia na formação de novos vasos
2017	Matthias Van Woensel	Galectina-1	Limita a resposta imune às células tumorais
2017	Tomoko Tadokoro	Galectina-9	Suprime o crescimento de metástases tumorais
2017	Sofia Nascimento dos Santos	Galectina-3	Induz a angiogênese
2020	Neus Martínéz-Bosch	Galectina-1	Dificulta a defesa imune do hospedeiro
2020	Adrian M. Seifert	Galectina-9	Interfere na ação das células imunes do hospedeiro

Fonte: Autoria própria, 2020.

Galectinas são uma família de proteínas solúveis sintetizadas pelos ribossomos que se ligam aos carboidratos e aos glicanos que apresentam beta-galactose (MANERO-RUPÉREZ et al., 2020). Essas proteínas são expressas em vários tipos de células e conseguem interferir nas funções dessas células, tanto de forma intracelular quanto extracelular. Nesse sentido, intracelularmente as galectinas podem regular o crescimento celular, o splicing de RNA, a apoptose, a adesão das células, a motilidade, a diferenciação e a transformação das células (CHOU et al., 2018; STEGMAYR et al., 2019). Já extracelularmente, as galectinas se ligam com glicoproteínas e formam redes de galectina, essas redes por sua vez, conseguem exercer influência sobre os receptores presentes nas superfícies das células, modificando o tempo de expressão deles, a sua localização e suas funções, interferindo assim em inúmeras funções biológicas (CHOU et al., 2018; STEGMAYR et al., 2019).

Dentro da família das galectinas, onze tipos diferentes foram identificados em humanos, desses apenas três tipos são os mais estudados atualmente, são eles: galectina-1, galectina-3 e galectina-9 (CHOU et al., 2018; MANERO-RUPÉREZ et al., 2020). A galectina-1 contribui para a invasão das células cancerígenas, ajudando assim para a formação de metástases, além de auxiliar



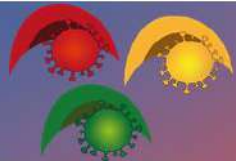
na angiogênese tumoral e proteger os tumores das respostas imunes do hospedeiro (TANG et al., 2016). A galectina-3 também favorece o desenvolvimento da angiogênese e ainda provoca disfunção nas células de defesa natural killer e células T do indivíduo (GORDON-ALONSO et al., 2017). A galectina-9, no entanto, ainda vem sendo melhor estudada em relação ao seu potencial de suprimir o sistema imune, uma vez algumas pesquisas atuais se mostram divergentes quando a esse potencial da galectina-9 (CHOU et al., 2018; ENNINGA et al., 2016; TOMOKO et al., 2017).

Nesse sentido, Gordon-Alonso et al. (2017) evidenciou em seu estudo que a galectina-3 secretada pelas células tumorais apresenta o potencial de sequestrar interferon (INF) γ , diminuindo assim a liberação de citocinas, o que por sua vez, diminui o recrutamento de células T para o local onde estão as células tumorais. Para chegar a essas conclusões Gordon-Alonso et al. (2017) utilizou camundongos para poder obter as amostras de tumores e realizou procedimentos como citometria de fluxo e imuno-histoquímica nessas amostras. Além disso, esses pesquisadores aplicaram ainda antagonistas de galectina-3 nas amostras de tumores e observaram que houve uma liberação de INF γ e posteriormente um aumento no número de células T no local onde as células cancerígenas estavam. Desse modo, nota-se que terapias voltadas a diminuir a expressão das galectinas-3 nos sítios tumorais pode proporcionar um atraso no crescimento do tumor (GORDON-ALONSO et al., 2017).

De acordo com Martínez-Bosch et al. (2020), não só a galectina-3 como também a galectina-1 apresenta ação importante sobre o sistema imune do paciente com câncer, ao realizar um papel imunossupressor nos diferentes tipos de células imune. Corroborando com isso, Van Woensel et al. (2017), ao realizar estudos com camundongos que apresentavam células tumorais e que foram submetidos a tratamentos que diminuía a ação da galectina-1, evidenciou que ao suprimir a expressão da galectina-1 no local onde estavam as células tumorais houve uma ativação do sistema imune do hospedeiro. Além disso, a pesquisa de Van Woensel et al. (2017) destaca ainda que a galectina-1 é um fator chave que provoca resistência aos tratamentos de quimioterapia convencional e imunoterapia. Assim, observa-se que drogas com o potencial de suprimir a expressão da galectina-1 no local do tumor podem auxiliar as terapias atuais para os pacientes com câncer (VAN WOENSEL et al., 2017).

Enninga et al. (2016) demonstrou ainda que a galectina-9 também apresenta um papel imunossupressor nos pacientes com câncer. Em seus estudos, Enninga et al. (2016) avaliou a concentração de galectina-9 tanto nos tumores quanto no plasma de pacientes que apresentam melanoma metastático, e observou a função da galectina-9 sobre o sistema imune ao expor células mononucleares à essa proteína de modo *in vitro*. Nesse sentido, Enninga et al. (2016) evidenciou que os níveis de galectina-9 estavam mais elevados em pacientes com melanoma avançado em comparação com pacientes saudáveis. Além disso, foi mostrado também que a galectina-9 reduziu a proliferação de células mononucleares e alterou as respostas do sistema imune contra o tumor, favorecendo a progressão das células cancerígenas (ENNINGA et al., 2016).

Seifert et al. (2020) também evidenciou que a galectina-9 pode estar expressa em altas concentrações em outros tipos de tumores, como no adenocarcinoma ductal pancreático (ADP). Em sua pesquisa, Seifert et al. (2020) comparou a concentração de galectina-9 presente no sangue de três diferentes grupos de pacientes, o primeiro grupo apresentava indivíduos com ADP, o segundo grupo continha pessoas apenas com doenças pancreáticas benignas e o terceiro apresentava indivíduos saudáveis, ou seja, sem nenhuma patologia no pâncreas. Assim, foi evidenciado que a galectina-9 estava altamente expressa no ADP em relação com o pâncreas normal, e que a concentração sérica de galectina-9 foi capaz de diferenciar pacientes com ADP de pacientes com doenças pancreáticas benignas e daqueles indivíduos saudáveis (SEIFERT et al.,



2020). Desse modo, Seifert et al. (2020) destaca que a galectina-9 apresenta um grande potencial como biomarcador para a detecção do ADP.

No entanto, os estudos de Tadokoro et al. (2017) divergem daqueles apresentados por Enninga et al. (2016) ao evidenciar que a galectina-9 consegue suprimir o crescimento de metástases hepáticas. Nesse sentido, Tadokoro et al. (2017) realizou sua pesquisa com linhagem de células de metástases hepáticas derivadas de um tumor de pâncreas, e evidenciou que a galectina-9 provocava um efeito antitumoral através de diversas vias, como por exemplo pela indução de apoptose das células cancerígenas, através de moléculas pró-apoptóticas. Sendo assim, foi destacado que a galectina-9 suprimiu a proliferação celular e o crescimento tumoral de metástases hepáticas humanas *in vitro*. Tadokoro et al. (2017) salientou ainda que a galectina-9 pode então ser utilizada como agente terapêutico adjuvante da quimioterapia convencional para o tratamento de metástase hepáticas.

Já a galectina-3, por sua vez, além de auxiliar na imunossupressão do hospedeiro, ela também ajuda na produção de novos vasos sanguíneos que tem a função de proporcionar nutrientes e oxigênio para as células cancerígenas. Nesse sentido, Santos et al. (2017) destacou em seu estudo que a galectina -3 pode induzir a angiogênese através de diversos mecanismos, como por exemplo através da ativação fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). Essa pesquisa evidenciou ainda que em situações de hipóxia as células tumorais liberam galectina-3, a qual se liga às células endoteliais e ativam uma cascata de sinalização que induz a formação dos novos vasos, sem necessariamente ativar a VEGF. Nesse contexto, como a maioria dos tratamentos anti-angiogênicos são voltados para impedir a ativação VEGF e a galectina-3 pode ativar outras vias para formar os novos vasos, essa proteína acaba se tornando um alvo terapêutico importante para diminuir a angiogênese tumoral (SANTOS et al., 2017).

Storti et al. (2016) assim como Santos et al. (2017), também destacou em seus estudos a importância de novas terapias voltadas para as galectinas, uma vez que elas têm o potencial de induzir a angiogênese. No entanto, os estudos de Storti et al. (2016) foram voltados para a galectina-1 ou invés da galectina-3, no qual ele obteve amostras de biópsia a partir de pacientes que apresentam mieloma múltiplo e realizou técnicas de imuno-histoquímica, imuno-precipitação, e ELISA nessas amostras para verificar a correlação entre a expressão de galectina-1 com a angiogênese tumoral. Assim, foi demonstrado que as células cancerígenas expostas à hipóxia produziam altos níveis de galectina-1, a qual agia estimulando o crescimento das células endoteliais e fornece ainda suporte físico para os capilares recém-formados (STORTI et al., 2016).

4. CONCLUSÃO

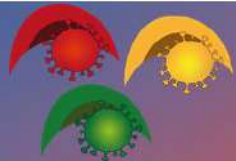
Desse modo, fica evidente que as galectinas apresentam diversas funções importantes que corroboram com a proliferação e o desenvolvimento de tumores, como ao induzir a angiogênese e ao suprimir a resposta imune do hospedeiro. Nesse sentido, dada a complexidade das funções das galectinas, torna-se necessário a realização de mais estudos, os quais devem abordar não só sobre os três principais tipos de galectina, como também deverão buscar compreender sobre os outros oito tipos presentes no corpo humano. Além disso, torna-se interessante também o desenvolvimento de mais pesquisas relacionada a galectina-9 para identificar se esta apresenta uma função mais positiva ou mais negativa no desenvolvimento de metástases tumorais. Essas pesquisas podem, então, abrir caminhos para a implementação clínica de terapias desenvolvidas com base nas galectinas, as quais em combinação com o tratamento quimioterápico convencional proporcionam uma melhor eficácia no combate ao câncer. Não só isso, como também podem



propiciar o desenvolvimento de novos biomarcadores tumorais através das galectinas, favorecendo assim o diagnóstico precoce de alguns tipos de câncer.

5. REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, GABRIEL LUCAS SOUZA et al. APOPTOSE COMO PERSPECTIVA DE CURA DO CÂNCER. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research - BJSCR**, v.28, n.2, pp.32-35, 2019.
- CHOU, Feng-Cheng et al. Role of galectins in tumors and in clinical immunotherapy. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 2, p. 430, 2018.
- ENNINGA, Elizabeth Ann L. et al. Galectin-9 modulates immunity by promoting Th2/M2 differentiation and impacts survival in patients with metastatic melanoma. **Melanoma research**, v. 26, n. 5, p. 429, 2016.
- FOUAD, Yousef Ahmed; AANEI, Carmen. Revisiting the hallmarks of cancer. **American journal of cancer research**, v. 7, n. 5, p. 1016, 2017.
- GORDON-ALONSO, Monica et al. Galectin-3 captures interferon-gamma in the tumor matrix reducing chemokine gradient production and T-cell tumor infiltration. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 1-15, 2017.
- INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. 4. ed. rev. atual. Rio de Janeiro: Inca, 2018.
- INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2019.
- KERR, Keith M.; NICOLSON, Marianne C. Non-small cell lung cancer, PD-L1, and the pathologist. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 140, n. 3, p. 249-254, 2016.
- MANERO-RUPÉREZ, Noemí et al. The Galectin Family as Molecular Targets: Hopes for Defeating Pancreatic Cancer. **Cells**, v. 9, n. 3, p. 689, 2020.
- MARTÍNEZ-BOSCH, Neus; NAVARRO, Pilar. Galectins in the Tumor Microenvironment: Focus on Galectin-1. In: **Tumor Microenvironment**. Springer, Cham, p. 17-38, 2020..
- MÉNDEZ-HUERGO, Santiago P.; BLIDNER, Ada G.; RABINOVICH, Gabriel A. Galectins: emerging regulatory checkpoints linking tumor immunity and angiogenesis. **Current opinion in immunology**, v. 45, p. 8-15, 2017.
- PIRES, Verônica dos Santos; STROPARO, Elenice. O HPV E A INIBIÇÃO DOS GENES DE SUPRESSÃO TUMORAL: UMA REVISÃO. **REVISTA ELETRÔNICA BIOCÊNCIAS, BIOTECNOLOGIA E SAÚDE**, v. 9, n. 18, p. 7-17, 2017.
- SANTOS, Sofia Nascimento dos et al. Galectin-3 acts as an angiogenic switch to induce tumor angiogenesis via Jagged-1/Notch activation. **Oncotarget**, v. 8, n. 30, p. 49484, 2017.
- SEIFERT, Adrian M. et al. Detection of pancreatic ductal adenocarcinoma with galectin-9 serum levels. **Oncogene**, v. 39, n. 15, p. 3102-3113, 2020.
- SILVA, Hyan Ribeiro et al. Associação prevalência e fatores de risco entre obesidade e cancer de mama. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 3, p. 42, 2020.
- STEGMAYR, John et al. Extracellular and intracellular small-molecule galectin-3 inhibitors. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2019.
- STORTI, Paola et al. Galectin-1 suppression delineates a new strategy to inhibit myeloma-induced angiogenesis and tumoral growth in vivo. **Leukemia**, v. 30, n. 12, p. 2351-2363, 2016.
- TADOKORO, Tomoko et al. Induction of apoptosis by Galectin-9 in liver metastatic cancer cells: In vitro study. **International Journal of Oncology**, v. 51, n. 2, p. 607-614, 2017.



TANG, Dong et al. Cancer-associated fibroblasts promote angiogenesis in gastric cancer through galectin-1 expression. **Tumor Biology**, v. 37, n. 2, p. 1889-1899, 2016.

VAN ROOSBROECK, Katrien; CALIN, George A. Cancer hallmarks and MicroRNAs: the therapeutic connection. In: **Advances in cancer research**. Academic Press, 2017. p. 119-149.

VAN WOENSEL, Matthias et al. Sensitization of glioblastoma tumor micro-environment to chemo-and immunotherapy by Galectin-1 intranasal knock-down strategy. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2017.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Pesquisa Clínica e Pré-Clínica

TRANSMISSÃO VERTICAL DE SARS-CoV-2: DETECÇÃO VIRAL E RESPOSTA IMUNE FETAL

J. A. da SILVA GOMES¹, J. M. de CARVALHO¹, G. H. F. GUEDES¹, M. A. S. da COSTA¹,
M. E. da SILVA¹, M. L. F. de OLIVEIRA¹ e F. C. A. M. TENÓRIO¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Histologia e Embriologia.

E-mail para contato: andy_silvacarte@outlook.com

RESUMO – Introdução: Sabe-se que a gravidez aumenta o risco de doenças graves em resposta a infecções virais, o impacto da infecção por SARS-CoV-2 durante a idade gestacional pode ser prejudicial e a transmissão vertical potencial deve ser completamente estudada. Nos trabalhos relatados foi investigado se a transmissão vertical por SARS-CoV-2 é possível e, no caso, se isso resulta em uma envolvimento fetal. **Metodologia:** Uma revisão narrativa foi realizada utilizando as plataformas de buscas SCIELO, PUBMED, MEDLINE e GOOGLE SCHOLAR. A pesquisa foi restrita a artigos em inglês e italiano publicados de 2000 a maio de 2020. **Resultados e discussão:** O SARS-CoV-2 é encontrado nas placentas a termo e no sangue do cordão umbilical, na mucosa vaginal de mulheres grávidas e no leite. Além disso, é relatado a presença de anticorpos anti-SARS-CoV-2 IgM e IgG específicos na região umbilical. **Conclusão:** o SARS-CoV-2 foi detectado no plasma do cordão umbilical, sugerindo fortemente que no útero a transmissão de mãe para filho é possível e aparentemente relacionada a um alto estado inflamatório materno.

Palavras-chave: coronavírus, gestantes, transmissão vertical, inflamação.

ABSTRACT - Introduction: It's known that pregnancy increases the risk of serious illnesses in response to viral infections, the impact of SARS-CoV-2 infection during gestational age can be harmful and the potential vertical transmission must be thoroughly studied. In the studies reported, it was investigated whether vertical transmission by SARS-CoV-2 is possible and, if so, whether this results in fetal involvement. **Methodology:** A narrative review was carried out using the search platforms SCIELO, PUBMED, MEDLINE and GOOGLE SCHOLAR. The search was restricted to articles in English and Italian published from 2000 to May 2020. **Results and discussion:** SARS-CoV-2 is found in term placentas and umbilical cord blood, in the vaginal mucosa of pregnant women and in milk. In addition, the presence of specific anti-SARS-CoV-2 IgM and IgG antibodies



in the umbilical region is reported. Conclusion: SARS-CoV-2 was detected in umbilical cord plasma, strongly suggesting that in utero mother-to-child transmission is possible and apparently related to a high maternal inflammatory state.

Keywords: *coronavirus, pregnant women, vertical transmission, inflammation.*

1. INTRODUÇÃO

A pandemia de COVID-19 está se espalhando pelo mundo e os número de casos confirmados atualmente está ultrapassando a marca de 12,5 milhões de pessoas, cerca de 590.000 mortes (HUANG, C. et al. 2020). Os casos graves de COVID-19 exibem uma resposta imune disfuncional caracterizada por níveis desregulares do complexo de quimiocinas, especialmente das IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-10, fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), MIP1 α (CCL3) e fator de necrose tumoral (TNF), que medeia a inflamação pulmonar generalizada e falha em erradicar com sucesso o patógeno (FU, Y. et al. 2020).

Como é bem descrito na literatura gestantes passam por adaptações fisiológicas que levam a um aumentam do risco de desenvolver doenças graves principalmente no que tange a resposta a infecções virais, como influenza; com essa informação e dados preliminares é sugestivo que a infecção por SARS-CoV-2 pode ser mais grave nessas gestantes (SAVASI, V. et al. 2020). Até o presente estudo nenhum vestígio do vírus foi detectado, para indicar uma possível transferência vertical (CHEN, H. et al. 2020); no entanto, dois trabalhos publicados de forma independente descreveram anticorpos IgG e IgM específicos para SARS-CoV-2 no sangue de três recém-nascidos de mães infectadas com SARS-CoV-2. Como se sabe IgG, são normalmente transferido através da placenta, porém o mesmo não se pode dizer de IgM que devido ao seu alto peso molecular e afinidade não atravessa a placenta sugerindo desta forma que houve uma possível infecção intra-uterina (DONG, L. et al 2020).

Recentemente foi relatado na literatura que os os dois receptores o qual o SARS-CoV-2 atua são: a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) e A protease transmembranar serina 2 (TMPRSS2) sendo esta amplamente disseminada em tipos celulares específicos da placenta (LI, M. et al. 2020) Portanto, o impacto do vírus e o seu potencial de transmissão vertical precisam ser mais abordados de forma criteriosa.

O objetivo dos trabalhos abordados eram de investigar: 1) Se é possível a transmissão vertical de SARS-CoV-2; 2) Qual o perfil inflamatório de gestantes positivas para Covid-19 e seus fetos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Uma revisão narrativa foi realizada utilizando as plataformas de buscas SCIELO, PUBMED, MEDLINE e GOOGLE SCHOLAR. A pesquisa foi restrita a artigos em inglês e italiano publicados de 2000 a maio de 2020. Priorizou-se artigos que relatavam pesquisas originais, embora também tenham sido considerados artigos de revisão. Estudos adicionais foram usados por meio da revisão de bibliografia com os descritores já mencionados, não foram considerados para inclusão resumos de pesquisas apresentados em simpósios e conferências científicas.



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os artigos trabalhados relataram pela primeira vez que o SARS-CoV-2 pode ser encontrado na mucosa vaginal de gestantes, em placentas a termo e também no sangue do cordão umbilical. Além disso, também foi relatado a presença de anticorpos específicos anti-SARS-CoV-2 IgM e IgG no sangue do cordão umbilical dessas gestantes, bem como em amostras de leite. Os dados encontrados nos artigos sustentam a hipótese de que é possível uma transmissão vertical em mulheres grávidas positivas para SARS-CoV-2.

Os resultados também sugerem que o risco de transmissão viral de mãe para filho não depende diretamente da gravidade da progressão da doença, uma vez visto que mulheres com piores prognósticos tiveram crianças que deram negativos para o vírus, enquanto outras que tiveram melhor prognóstico, a criança testou positiva para o SARS-CoV-2. Essa observação foi apoiada pela história clínica e os resultados do exame virológico e imunológico das pacientes.

Um outro dado importante que vale a pena ressaltar é que a prematuridade foi relatada como sendo mais frequente em pacientes infectados com SARS-CoV-2. A hipótese levantada pelos artigos é que isso possa estar relacionado à estado inflamatório, como consequência da infecção viral; alternativamente, isso poderia ter sido o resultado de um pré-condição existente que desencadeou o parto prematuro e facilitou a entrada viral através da placenta. E o SARS-CoV-2 positivo no plasma do cordão umbilical de recém-nascidos, prova que há uma transmissão uterina. Também foram analisados o leite coletado das pacientes e detectaram a presença de RNA SARS-CoV-2 em apenas um caso grave. No entanto, mais estudos são necessários para avaliar se isso representa um vírus infeccioso ou não.

Várias linhas de evidência indicam que a infecção materna sistêmica e consequente inflamação contribuem para interrupção da função da placenta e isto possivelmente favorece a transmissão vertical viral (CLAUDIO, F. et al 2020).

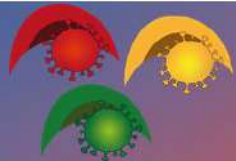
4. CONCLUSÃO

Em conclusão, pela primeira vez, o SARS-CoV-2 foi detectado no plasma do cordão umbilical, sugerindo fortemente que no útero a transmissão de mãe para filho é possível e aparentemente relacionada a um alto estado inflamatório materno.

5. REFERÊNCIAS

Chen H, Guo J, Wang C, et al. Clinical characteristics and intrauterine vertical transmission potential of COVID-19 infection in nine pregnant women: a retrospective review of medical records. *The Lancet* 2020; 395: 809–15.

Dong L, Tian J, He S, et al. Possible Vertical Transmission of SARS-CoV-2 from an Infected Mother to Her Newborn. *JAMA* 2020; published online March 26.
DOI:10.1001/jama.2020.4621.



FENIZIA, Claudio et al. IN- UTERO MOTHER- TO- CHILD SARS- CoV- 2 TRANSMISSION: viral detection and fetal immune response. medRxiv, 2020.

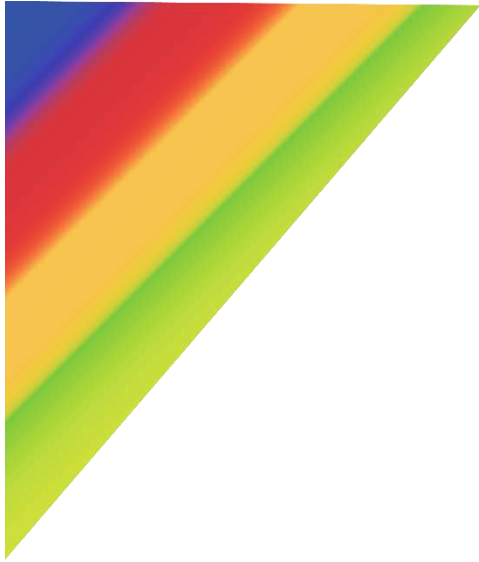
Fu Y, Cheng Y, Wu Y. Understanding SARS-CoV-2-Mediated Inflammatory Responses: From Mechanisms to Potential Therapeutic Tools. *Virology* 2020; : 1–6.

Grasselli G, Zangrillo A, Zanella A, et al. Baseline Characteristics and Outcomes of 1591 Patients Infected With SARS-CoV-2 Admitted to ICUs of the Lombardy Region, Italy. *JAMA* 2020; 323: 1574–81.

Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet* 2020; 395: 497–506.

Li M, Chen L, Zhang J, Xiong C, Li X. The SARS-CoV-2 receptor ACE2 expression of maternal-fetal interface and fetal organs by single-cell transcriptome study. *PLOS ONE* 2020; 15: e0230295.

Zhou Y, Fu B, Zheng X, et al. Pathogenic T cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storm in severe COVID-19 patients. *Natl Sci Rev* DOI:10.1093/nsr/nwaa041.



POLÍTICAS PÚBLICAS EM SAÚDE



ÁREA DE SUBMISSÃO: Políticas Públicas em Saúde

SUBNOTIFICAÇÃO DE CASOS DE DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA NA PANDEMIA DA COVID-19: UMA REVISÃO

J. M. de CARVALHO¹, J. A. da SILVA GOMES¹, G. H. F. GUEDES¹, M. A. S. da COSTA¹, M. E. da SILVA¹, M. L. F. de OLIVEIRA¹ e F. C. A. M. TENÓRIO¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Histologia e Embriologia.

E-mail para contato: jennah_martins@hotmail.com.

RESUMO – Introdução: As arboviroses são doenças epidêmicas em todo o mundo. No Brasil, as condições climáticas favorecem ao surgimento dessas patologias. Em 2020, a pandemia do novo coronavírus pode ter camuflado os números de dengue, zika e chikungunya. Desta maneira, é imprescindível compreender a dinâmica da dengue, zika e chikungunya nos anos anteriores para prever ou não uma subnotificação dos casos por conta do isolamento social e da pandemia do novo coronavírus. **Metodologia:** O presente artigo foi elaborado a partir do levantamento de dados das plataformas Pubmed, Scielo, Lilacs e Google Scholar, foram considerados artigos que tratem de arboviroses, dengue, zika, chikungunya, *Aedes aegypti*. **Resultados e Discussão:** No ano de 2015, pela primeira vez as três arboviroses foram notificadas no Brasil. Entre 2017 e 2018 ocorreu uma elevação de 15 mil casos de dengue, já de chikungunya e zika ocorreu uma redução de 50% nos números de casos prováveis. Em 2019 o número de casos de dengue foi 5,8 vezes já em agosto em relação a todo o ano anterior. No ano de 2020, o número de casos de dengue teve uma crescente até meados de março onde os esforços para o novo coronavírus desviaram mais demanda das equipes de saúde. **Conclusão:** a pandemia da covid-19 pode ter sido responsável por uma subnotificação dos casos de arboviroses no país e isto se deve, ao desvio dos esforços sanitários bem como a redução da ida aos hospitais e emergências por parte da população.

Palavras chaves: Dengue, Zika, Chikungunya, Covid-19, Subnotificação

ABSTRACT - Introduction: Arboviruses are epidemic diseases worldwide. In Brazil, how climatic conditions favor the appearance of these pathologies. In 2020, a new coronavirus pandemic may have camouflaged the numbers of dengue, zika and chikungunya. Thus, it is essential to understand the types of dengue, zika and chikungunya in previous years to predict whether or not to under-report cases due to social isolation and a new coronavirus pandemic. **Methodology:** This article was based on data collection from the platforms Pubmed, Scielo, Lilacs and Google Scholar, articles from articles dealing with arboviruses, dengue, zika, chikungunya and *Aedes aegypti*. **Results and Discussion:** In 2015, for the first time as three arboviruses were notified in Brazil. Between 2017 and 2018, there was an increase of 15 million dengue cases, as chikungunya and zika saw a 50% reduction in the numbers of probable cases. In 2019, the number of dengue cases



was already 5.8 times in August compared to the previous year. In the year 2020, the number of dengue cases increased until mid-March, where attacks for the new coronavirus diverted the demand from health teams more. **Conclusion:** a covid-19 pandemic may have been responsible for an underreporting of cases of arboviruses in a country and this must be done, the diversion of health rights as well as a reduction in the population's going to hospitals and emergencies.

Keywords: Dengue, Zika, Chikungunya, Covid-19, Underreporting

1. INTRODUÇÃO

Os Arbovírus (ARthropod BORne VIRUS) são vírus que estão relacionados a ciclos complexos com artrópodes como vetores, compõem as famílias virais Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae, Reoviridae e Rhabdoviridae. Esses parasitas intracelulares obrigatórios constituem um problema endêmico e epidêmico a depender da região ao qual estejam relacionadas (WEIVER; REISEN, 2010). Dengue, zika e chikungunya são doenças causadas por arbovírus e são transmitidos no Brasil pelo mosquito *Aedes aegypt* (GUSMÃO *et al.*, 2019).

Nos últimos anos, o aumento da presença de arboviroses pode ser dito como um fenômeno multicausal. As mudanças climáticas, o crescimento populacional e a facilidade de locomoção entre as diversas partes do globo podem estar relacionadas. (LIMA-CAMARA, 2016). No Brasil, as arboviroses constituem doenças de grande importância na saúde pública. A dengue já é considerada uma doença considerada de alerta em todo mundo (BARRETO; TEIXEIRA, 2008). Além dos fatores que favorecem a migrações virais, o Brasil possui condições climáticas ideais para o desenvolvimento do *Aedes aegypt* (GREGIANINI *et al.*, 2017).

Em 2020, uma nova pandemia acometeu quase todos os países do mundo e pode ter camuflado ou reduzido a incidência de casos confirmados ou suspeitos das arboviroses no país. Deste modo, é importante compreender a dinâmica da dengue, zika e chikungunya nos anos anteriores para prever ou não uma subnotificação dos casos por conta do isolamento social e da pandemia do novo coronavírus.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente artigo foi elaborado a partir do levantamento de dados das plataformas Pubmed, Scielo, Lilacs e Google Scholar. O presente artigo foi elaborado a partir do levantamento de dados das plataformas Pubmed, Scielo, Lilacs e Google Scholar. Uma revisão narrativa da literatura foi elaborada a partir de estudos já concluídos, foram considerados artigos que tratem de arboviroses, dengue, zika, chikungunya, *Aedes aegypt* e foram excluídos periódicos que tratem exclusivamente da situação epidemiológica de outros países. Neste projeto foram selecionados 18 artigos dos quais 7 foram excluídos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ano de 2013, 1.452.489 de dengue foram notificados. A zika e a febre chikungunya ainda não estavam presentes em solo nacional. Em 2014, ocorreu uma redução de 59,3% no número de casos deste flavivírus em relação ao mesmo período de 2013, no ano de 2014 a chikungunya passou a ser notificada registrando um total de 2.196 casos confirmados. (VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2014).

As três arboviroses estiveram pela primeira vez notificadas no mesmo boletim epidemiológico no ano de 2015, quando ocorreram os primeiros quadros de zika no Brasil. A



dengue neste ano teve 1.677.013 casos, aumento superior a 1 milhão de casos em relação à 2014, já os números dos quadros suspeitos de chikungunya foi quase 5 vezes maior que no ano antecessor e a zika foi confirmada em solo nacional, mas sem dados registrados, pois sua notificação compulsória teve início em fevereiro de 2016. Em todo o ano de 2016, 214.193 casos prováveis de zika foram registrados no país. Já a dengue teve uma redução de 11% em relação ao precedente, e a chikungunya teve 7 vezes mais casos que 2015 (VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2017).

Entre janeiro e dezembro de 2018 foram notificados 247.393 casos prováveis de dengue no Brasil. Aproximadamente 118 casos para cada 100 mil habitantes, em comparação a 2017 resultam em 15 mil casos a mais. Com relação à zika e a chikungunya foi observado o fenômeno oposto com redução do número de casos em 2018 comparado a 2017, sendo a primeira de 17.593 para 8.024 casos e a segunda de 184.694 para 85.221, o que significa uma queda de mais de 50% nos casos suspeitos em ambas às doenças (VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2018).

No período de janeiro a agosto de 2019 foram notificados 1.439.471 casos de dengue, número 5,8 vezes maior que em todo o ano anterior (VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2019b). Ocorreu também uma elevação dos números de zika neste mesmo período (9.813 casos). No ano de 2020, até 12ª semana epidemiológica ocorreu uma crescente nos casos de dengue em comparação ao mesmo período de 2019, mas logo após o pico houve um achatamento da curva, o Ministério da Saúde atribui esse quadro a uma possível subnotificação e desvio do foco da atenção básica para o combate da covid-19 (VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2019a).

Segundo Lorenz *et al.*(2020), os casos de dengue são mais recorrentes nos meses de março e abril devido aos períodos chuvosos. No ano de 2020 até fevereiro foram contabilizados mais de 20 mil casos em comparação ao mesmo período de 2019, mas o declínio na após o final de março deste ano coincide com a crescente nos casos de covid-19 (VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2020). Estudos ainda não tem dados comparativos sobre co-infecção de arbovírus e Sars-CoV-2, bem como há relatos de casos em que o paciente fora primeiro diagnosticado com arbovirose e após investigação recebeu o diagnóstico de covid-19.

4. CONCLUSÃO

A pandemia da covid-19 pode ter sido responsável por uma subnotificação dos casos de arboviroses no país e isto se deve, ao desvio dos esforços sanitários bem como a redução da ida aos hospitais e emergências por parte da população.

5. REFERÊNCIAS

BARRETO M.L., TEIXEIRA M.G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. *Estud Av.* 2008 dez;22(64):53-72.

EPIDEMIOLÓGICA, Vigilância. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika) até a Semana Epidemiológica 12 de 2019 e Levantamento Rápido de Índices para Aedes aegypti (LIRAA). *Boletim Epidemiológico/ Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde*, v. 50, n. 13, 2019a.

EPIDEMIOLÓGICA, Vigilância. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika) até a Semana Epidemiológica 49 de 2018. *Boletim Epidemiológico/ Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde*, v. 49, n. 59, 2018.



EPIDEMIOLOGICA, Vigilância. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes Aegypt* (dengue, chikungunya e zika), até a Semana Epidemiológica 23, 2020. *Boletim Epidemiológico/ Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde*, v. 51, n. 24, 2020.

EPIDEMIOLOGICA, Vigilância. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes Aegypt* (dengue, chikungunya e zika), até a Semana Epidemiológica 34, 2019. *Boletim Epidemiológico/ Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde*, v. 50, n. 22, 2019b.

EPIDEMIOLOGICA, Vigilância. Monitoramento dos casos de dengue e febre de chikungunya até a Semana Epidemiológica (SE) 53 de 2014. *Boletim Epidemiológico/ Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde*, v. 46, n. 3, 2015.

EPIDEMIOLOGICA, Vigilância. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 51, 2016. *Boletim Epidemiológico/ Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde*, v. 48, n. 2, 2017.

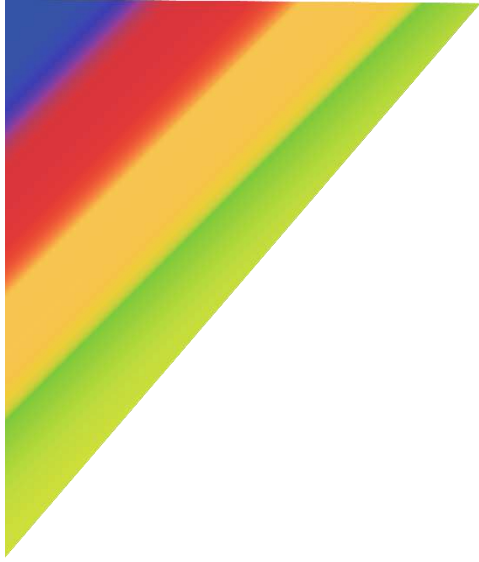
GREGIANINI, T.S. *et al.* Emerging arboviruses in Rio Grande do Sul, Brazil: chikungunya and zika outbreaks, 2014-2016. *Reviews In Medical Virology*, v. 27, n. 6, 2017.

GUSMÃO, C. M. G., PATRIOTA, A. C. D. L. S.; CARVALHO, I.L. *Aedes aegypti* e arboviroses no Brasil. *RBits*: 2236-1103, p. 23-23, 2019.

LIMA-CAMARA, T. N. Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 50, p. 36, 2016.

MASCARENHAS, M D.M. *et al.* Ocorrência simultânea de COVID-19 e dengue: o que os dados revelam?. *Cad de Saúde Pública*, v. 36, p. e00126520, 2020.

WEAVER, S.C.; REISEN, W.K. Present and future arboviral threats. *ANTIVIR RES*, v. 85, n. 2, p. 328-345, 2010.



**PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA
MEDICINAL**



ÁREA DE SUBMISSÃO: Produtos Naturais e Química Medicinal

IMIDAZOLIDINAS COM POTENCIAL ANTICÂNCER: UMA ABORDAGEM SOBRE OS POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO.

A. A. SILVA Jr¹, M. GALDINO-PITTA², M. B. O. CHAGAS³, I.R. PITTA⁴, M. J. B. M. RÊGO⁴, M. G. PITTA⁴

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências.

² Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências.

³ Universidade Federal de Pernambuco, Campus Acadêmico do Agreste, Núcleo de Ciências da Vida, Departamento de Medicina.

⁴ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica e Fisiologia.

E-mail para contato: auvaniantunes@gmail.com

RESUMO – O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, o que torna necessário a busca constante no desenvolvimento de agentes químicos medicinais com maior eficácia terapêutica. Nesse contexto os derivados imidazolidínicos são compostos terapêuticos importantes, caracterizados por um núcleo heterocíclico, agentes imidazolidínicos são agentes importante para capacidade de regular a progressão do ciclo celular. Este trabalho objetivou discutir o potencial efeito anticâncer de moléculas de imidazolidinas frente a diferentes linhagens de células neoplásicas. Realizou-se uma revisão integrativa da literatura com busca nas bases de dados LILACS, MEDLINE e PUBMED e selecionados artigos publicados em língua inglesa e portuguesa, sem restrição de ano de publicação. Foram identificados na literatura que as moléculas de imidazolidinas possuem a capacidade de interagir com moléculas de DNA, induzindo danos, inibição da replicação, ativação de caspases e indução de mecanismos apoptóticos. Pode-se concluir que as imidazolidinas são potenciais candidatos na terapia do câncer com capacidade de interação com o DNA.

Palavras-chaves: apoptose, ciclo celular, química medicinal.

ABSTRACT - Cancer is the second leading cause of death in the world, which makes it necessary to constantly search for the development of medicinal chemical agents with greater therapeutic effectiveness, in this context imidazolidine derivatives are important therapeutic compounds, which are characterized by a heterocyclic nucleus considered an important agent able to regulate the progression of the cell cycle. This study aimed to discuss the potential anticancer effect of imidazolidine molecules against different neoplastic cell lines. An integrative literature review was



carried out by searching the LILACS, MEDLINE and PUBMED databases and selecting articles published in English and Portuguese, with no restriction on the year of publication. It has been identified in the literature that imidazolidine molecules have the ability to interact with DNA molecules, inducing damage, inhibiting replication, activating caspases and inducing apoptotic mechanisms. It can be concluded that imidazolinides are potential candidates in cancer therapy capable of interacting with DNA.

Keywords: apoptosis, cell cycle, medicinal chemistry.

1. INTRODUÇÃO

A quimioterapia é a principal forma de tratamento do câncer, correspondendo de 60 a 70 % das condutas de escolha clínica, tanto para diagnósticos tardios ou precoces (MATOS-ROCHA et al., 2017). O tratamento quimioterápico pode deter alguns tipos de câncer e ter atuação em doenças disseminadas com ótimos resultados, inclusive com a remissão total de tumores (INCA, 2018).

As drogas antineoplásicas, de modo geral, possuem seu mecanismo de ação baseado na interferência de algum estágio de divisão celular, isto é, possui a capacidade de interferir desde a síntese das bases nitrogenadas até a síntese de proteínas. Entretanto, a maioria das drogas quimioterápicas, atuam em células de crescimento acelerado, tanto malignas como também células saudáveis, particularmente, as células da mucosa gastrointestinal, folículos pilosos e as do sistema imunológico, o que faz necessário o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos que apresentem menos efeitos adversos ao paciente (DOS SANTOS et al., 2018).

Desta forma podemos incluir as imidazolidinas, conhecidas também como hidantoínas, estas foram descobertas em 1861 por Bayer, quando o mesmo realizava estudos com ácido úrico e identificou a molécula de imidazolidi-2,4-diona. Estas moléculas constituem um importante grupo de compostos heterocíclicos de conformação pentagonal, os quais também podem ser identificados em produtos naturais, e com ótimas possibilidades de aplicações, o que permite sua utilização em uma infinidade de produtos farmacêuticos (LIU; YANG; PAN, 2014; ŠMIT; PAVLOVIĆ, 2015).

De acordo com a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) as hidantoínas apresentam em sua estrutura, como núcleo principal, um anel imidazolidínico composto de dois átomos de nitrogênio nas posições 1 e 3, por este ser o núcleo mais importante qualquer alteração em sua estrutura pode gerar mudanças em suas propriedades químicas e físicas, o anel possui ainda duas carbonilas nas posições 2 e 4 (CASTRO & MARÇAL, 2018).

Moléculas de imidazolidinas são potenciais agentes químicos de interesse farmacológico devido a características de bioatividade, natureza hidrofóbica, capacidade de aumentar biodisponibilidade de precursores biológicos ativos, o que permite ainda que possam ser empregadas como agentes auxiliares na síntese de novas moléculas (CATERINA et al., 2008).

Conseqüentemente tais características permitem atribuir às imidazolidinas ação farmacológica com várias aplicações, como: anticonvulsivante (ROGAWSKI & LÖSCHER, 2004), antitumoral (MOGUILLEWSKY; BERTAGNA; HUCHER, 1954), anticâncer (BAKALOVA et al., 2014), antiparasitário (MATOS-ROCHA, 2017), antiarrítmico (LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2018) dentre outras (CASTRO & MARÇAL, 2018). Desse modo, o presente estudo tem como objetivo principal reunir informações sobre o potencial efeito anticâncer de moléculas de imidazolidinas frente a diferentes linhagens de células neoplásicas.



2. MATERIAIS E MÉTODOS

Realizou-se uma revisão integrativa, na qual foram consultadas as bases de dados LILACS, MEDLINE e PUBMED e selecionados artigos publicados em língua inglesa e portuguesa, sem restrição de ano de publicação. Foram utilizados como descritores de busca: imidazolidina, hidantoína e anticâncer, a partir desta busca foram localizados 56 artigos, sendo aplicado como critério de exclusão publicações com moléculas que não fossem imidazolidinas, logo após se chegou total de 29 artigos, os quais foram lidos todos os títulos e resumos, e observado se estes respondiam a pergunta norteadora sobre quais os efeitos biológicos e mecanismos de ação por linhagem celular neoplásica relatado na literatura, e por fim se chegou ao número final de 11 artigos os quais compõem este trabalho.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

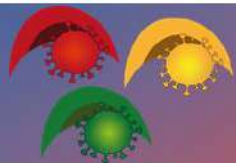
Os trabalhos selecionados buscaram evidenciar os efeitos biológicos descritos nos trabalhos frente a diferentes linhagens de células neoplásicas conforme é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Relação de mecanismos de ação de derivados imidazolidínicos descritos frente a linhagens celulares neoplásicas por autor e ano.

Autores	Ano	Objetivo	Linhagem celular	Mecanismo de ação (Efeito biológico)
Sharma et al.	1996	Síntese de complexos fenólicos N ₄ O ₂ -Schiff de Al (III), Fe (III), Ga (III) e In (III) e a caracterização de sua potência citotóxica	Carcinoma epidérmico humano (KB-3-1); Células de Carcinoma epidérmico resistente a múltiplas drogas (KB-8-5).	Alterar a expressão da glicoproteína-P RMF e de complexos R-ENBPI metálicos.
Ghosh et al.	1997	Avaliar a utilização de imidazolidina como veículo da funcionalidade N-mostarda e capacidade de lipofiliação.	Sarcoma-180 (TIB-66) e linfoma Hodgkin (CRL 7362).	Não descrito.
Kavitha et al.	2009	Determinar como as propriedades ésteres e eletrônicas da cadeia lateral podem influenciar seu efeito sobre a viabilidade celular	Células de leucemia (CRL-9589).	Indução de apoptose por ativação e clivagem da caspase 9, ativação da pró-caspase 3 e clivagem do receptor poli(adenosina difosforil) polimerase
Mukherjee et al.	2009	Síntese e a avaliação antitumoral e toxicológica de molécula com grupo hidantoína	Neuroblastoma humano (SK-N-SH); neuroblastoma (IMR-32), pulmão (A549) próstata (DU-145),	Inibir a síntese de DNA e RNA.



			leucemia (HL-60), e linfoma (U-937)	
El-Sawy et al.	2010	Sintetizar compostos heterocíclicos a partir de 1-benzil- (2a) e 1-benzoil-3- bromoacetil-indoles (2b) e avaliar quanto ao seu efeito antimicrobiano e anticancerígeno.	Células de câncer de ovário humano (OVCAR3 e BG-1)	Não descrito
Shah et al.	2013	Caracterizar compostos de imidazolidinas e fornece informações sobre os mecanismos moleculares de sua ação.	Estudo <i>in vitro</i> com fragmentos de DNA	Formação de adutos de ligação com o DNA.
Sakthive I KM , Gu ruvayoor appan C .	2013	Avaliar o efeito do extrato de ferruginea contendo compostos imidazolidinas em tumores	Linfoma de Dalton (LDA)	Imunomodulação e supressão tumoral.
Kavitha et al.	2013	Investigar a atividade anticâncer e o mecanismo de ação de derivados de azaspirohidantoína (ASHD).	Células Leucêmicas (K562)	Inibir a replicação do DNA, levando a inibição do ciclo celular com aumento da expressão proteínas pró-apoptóticas BAD e redução de proteínas antiapoptóticas BCL2 e ativação de caspase 9.
Cižeková et al.	2014	Estudar a fotocitotoxicidade de AcrDIMs e a produção de ROS por AcrDIM após irradiação.	Câncer de ovário humano (A2780) e de leucemia linfocítica de camundongos (L1210).	Apoptose por fotossensibilização.
Ivanenk ov et al.	2015	Síntese de regiões seletivas, avaliação biológica e modelação 3D-molecular de uma série de novas 2-tioxo-5H- dispiro [imidazolidina-4,3-pirrolidina-2,3-indole]	Carcinoma hepatocelular (HepG2), Câncer embrionário renal (Hek-293), Adenocarcinoma mamário (MCF-7), câncer de colo de	Inibição do complexo MDM2/p53.



		-2,5 (1H) -diona diastereomérica	útero (SiHa) e carcinoma colorretal (HCT-116).	
Dar AM, Sha msuzza man, Kh an S.	2016	Síntese de novas imidazolidinas esteroidais	Adenocarcinoma mamário (MCF-7), adenocarcinoma de colo do útero (HeLa), leucemia promielocítica aguda (HL-60), adenocarcinoma colorretal tipo B (SW480) e carcinoma hepatocelular (HepG2).	Indução de apoptose.

Nos estudos de Sharma, Crankshaw e Worms (1996), foi avaliado o potencial citotóxico de moléculas de imidazolidinas em células KB-3-1 do carcinoma epidérmico humano e células KB-8-5 derivadas resistentes a múltiplos fármacos (RMF). As moléculas e seus complexos tiveram a capacidade de alterar a expressão da glicoproteína-P RMF e que complexos R-ENBPI metálicos, o que permitiu afirmar que as moléculas possuem atividade anticâncer e que deveriam ser mais exploradas (SHARMA, CRANKSHAW, WORMS, 1996).

Segundo Ghosh et al. (1997), a molécula de imidazolidina avaliada através de experimentos realizados com ratos, nos quais foram inoculadas células de carcinoma de Erlich ascético, sarcoma-180 e linfoma Hodgkin. O composto testado apresentou resultados de cura para ambos os tumores estudados, porém, os autores não elucidaram qual o mecanismo de ação do composto avaliado.

Kavitha e colaboradores (2009), demonstraram que os derivados de imidazolidinas estudados, possuem efeitos citotóxicos em muitas linhagens celulares leucêmicas, incluindo células de leucemia mieloide crônica. Os compostos testados afetam a replicação do DNA, levando a inibição do ciclo celular com alteração dos níveis de proteínas pró-apoptóticas com ativação e clivagem da caspase 9, ativação da pró-caspase 3 e ainda a clivagem do receptor poli (Adenosina Difosfato-ribosil) polimerase

Em 2009, Mukherjee e colaboradores, realizaram estudos com moléculas de imidazolidinas, denominada pelos autores de fluoren-NU, para as quais foi identificado a capacidade alquilante, se ligando a regiões de grupos piridinas, nos testes *in vitro* realizados nas linhagens de neuroblastoma humano SK-N-SH, neuroblastoma IMR-32, pulmão A549, próstata DU-145, leucemia HL-60 e linfoma U-937. Nos testes *in vivo*, foi observado aumento do tempo de vida dos animais e regressão de todos os tumores das linhagens mencionadas acima.

El-Sawy e colaboradores (2010) realizaram ensaios de avaliação da atividade anticâncer de molécula de imidazolidina, frente a linhagens de câncer de ovário humano (OVCAR3 e BG-1), onde foi identificado que a molécula apresentou citotoxicidade para ambos os tipos de linhagens celulares. Também foram realizados testes *in vivo*, com enxertia subcutânea nos animais de linhagem de células OVCAR3, após 30 dias, foi possível observar que a molécula inibiu em 96,9 % do crescimento da massa tumoral, indicando que a molécula testada mostrou potente eficácia, capaz de apresentar supressão tumoral.



Shah e colaboradores (2013) realizaram estudos de caracterização de quatro moléculas de imidazolidinas e sua interação com estruturas de DNA, através de ensaios de variação de pH, técnicas de UV-Vis e ensaios eletroquímicos. Nos estudos eletroquímicos observou-se o surgimento de novos picos voltamétricos em altas concentrações de DNA, que ocorreram devido a formação de 8-oxoguanina a partir de danos a base da guanina, houve ainda redução dos picos eletroquímicos proporcional a adição de moléculas de DNA, o que indica interação entre a molécula e a dupla hélice de DNA, possivelmente devido a formação de adutos de ligação com o DNA.

Sakthivel e Guruvayoorappan (2013), avaliaram a atividade anticâncer de moléculas de imidazolidinas obtidas de extratos naturais de *Acacia ferruginea*, através de testes *in vivo* com camundongos, os mesmos foram submetidos a injeção de intraperitoneal de células de Linfoma de Dalton (LDA), e submetidos a tratamento por 14 dias com aplicação intraperitoneal do extrato de ferrugínea.

Foi observada diminuição da massa tumoral, o que pode ter ocorrido devido ao aumento na estimulação da produção de interleucina-2 (IL-2) e interferon-gama (IFN- γ) em animais com tumores sólidos induzidos por LDA, também o aumento da população de células T CD4+, permitindo afirmar que a molécula possui atividades imunomoduladoras e inibidoras de tumor (SAKTHIVEL; GURUVAYOORAPPAN, 2013).

Kavitha e colaboradores (2013) avaliaram a atividade anticâncer do derivado de imidazolidina, utilizando ensaios colorimétricos, análise de ciclo celular, coloração com anexina V e JC1 e Western Blot. A molécula testada demonstrou potente citotoxicidade contra as células leucêmicas de linhagem K562, a molecular foi capaz de inibir a replicação do DNA, levando a inibição do ciclo celular e indução de apoptose. Foi verificado ainda aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas BAD, redução de proteínas antiapoptóticas BCL2, ativação de caspase 9, que por sua vez ativa a caspase 3 e clivagem de PARP, induzindo a apoptose.

Čížeková e colaboradores (2014), utilizaram moléculas de imidazolidinas para avaliar seu potencial fotossensibilizante e antitumoral em linhagens celulares de câncer de ovário humano A2780 e de leucemia linfocítica de camundongos L1210. Não se observou dano significativo ao DNA de ambas as células, logo não sendo observada genotoxicidade da molécula. Porém na avaliação do mecanismo de morte celular, identificou-se que o composto estava presente nas mitocôndrias e que após a irradiação, as células apresentavam aspectos compatíveis com processo de apoptose e arrasto do ciclo celular nas fases G0-G1 e S.

Ivanenkov e colaboradores (2015) avaliaram a atividade anticâncer de compostos derivados de imidazolidina, utilizando linhagens celulares de carcinoma hepatocelular (HepG2), células de câncer embrionário renal (Hek-293), adenocarcinoma mamário (MCF-7), câncer de colo de útero (SiHa) e carcinoma colorretal (HCT-116). Não foi observado seletividade dos compostos por grupos celulares, porém a linhagem celular de SiHa apresentou respostas que podem estar associadas com a proteína MDM2/P53, induzindo a degradação celular.

Dar, Shamsuzzaman e Khan (2016) relataram a síntese de novas imidazolidinas esteroidais, como agentes de ligação ao DNA. Ensaios de citotoxicidade foram realizados utilizando as linhagens celulares de adenocarcinoma mamário (MCF-7), adenocarcinoma de colo do útero (HeLa), leucemia promielocítica aguda (HL-60), adenocarcinoma colorretal tipo B (SW480) e carcinoma hepatocelular (HepG2), os compostos apresentaram potencial citotóxico nas linhagens celulares testadas, sendo este potencial mais expressivo para as linhagens MFC-7 e HeLa, foi visualizado ainda alterações morfológicas das linhagens celulares testadas, as quais apresentaram alterações compatíveis com apoptose.



4. CONCLUSÃO

As imidazolidinas são moléculas com interessante versatilidade estrutural e de combinação com outras moléculas, possibilitando o desenvolvimento de agentes anticâncer promissores. Os seus mecanismos de ação são baseados, principalmente, na interação com enzimas de clivagem do DNA, ativação de capazes e indução de mecanismos apoptóticos. Contudo, conforme os estudos analisados ainda são necessários mais ensaios para uma melhor elucidação destes mecanismos.

5. REFERÊNCIAS

- BAKALOVA, A.G. *et al.* Synthesis, Characterization and Cytotoxic Activity of New Palladium Complexes with 3-Thiolanespiro-5'-Hydantoin and 4-Thio-1h-Tetrahydropyranespiro-5'-Hydantoin. *American Journal of Pharmtech Research*, 4, 2014.
- Castro, N. R., & Marçal, L. L. (2018). Estudo da síntese de derivados de imidazolidinas-2, 4-dionas e obtenção de novos derivados. *Revista Eletrônica Perspectivas da Ciência e Tecnologia-ISSN: 1984-5693*, 10, 150.
- Caterina, M. C., Perillo, I. A., Boiani, L., Pezaroglo, H., Cerecetto, H., González, M., & Salerno, A. (2008). Imidazolidines as new anti-Trypanosoma cruzi agents: Biological evaluation and structure-activity relationships. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 16(5), 2226-2234.
- ČIŽEKOVÁ, L. *et al.* Novel 3, 6-bis (imidazolidine) acridines as effective photosensitizers for photodynamic therapy. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 22, n. 17, p. 4684-4693, 2014.
- DAR, Ayaz Mahmood *et al.* Spectroscopic, viscositic, DNA binding and cytotoxic studies of newly synthesized steroidal imidazolidines. *Journal of fluorescence*, v. 26, n. 2, p. 639-649, 2016.
- DOS SANTOS, Sandna Larissa Freitas *et al.* Evidências do cuidado farmacêutico na prática clínica da oncologia. *Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba*, v. 20, n. 2, p. 77-81, 2018.
- EL-SAWY, Eslam *et al.* Synthesis and biological activity of some new 1-benzyl and 1-benzoyl-3-heterocyclic indole derivatives. *Acta Pharmaceutica*, v. 60, n. 1, p. 55-71, 2010.
- GHOSH, Manju *et al.* Evaluation of β -tethymustine, a new anticancer compound, in murine tumour models. *Cancer letters*, v. 119, n. 1, p. 7-12, 1997.
- INCA, Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2017.
- IVANENKOV, Yan A. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of novel potent MDM2/p53 small-molecule inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, v. 25, n. 2, p. 404-409, 2015.
- KAVITHA, C. V. *et al.* Novel derivatives of spirohydantoin induce growth inhibition followed by apoptosis in leukemia cells. *Biochemical pharmacology*, v. 77, n. 3, p. 348-363, 2009.
- KAVITHA, Chandagirikoppal V. *et al.* Propyl-2-(8-(3, 4-difluorobenzyl)-2', 5'-dioxo-8-azaspiro [bicyclo [3.2. 1] octane-3, 4'-imidazolidine]-1'-yl) acetate induces apoptosis in human leukemia cells through mitochondrial pathway following cell cycle arrest. *PLoS One*, v. 8, n. 7, p. e69103, 2013.



LIU, H.; YANG, Z.; PAN, Z. Synthesis of highly substituted imidazolidine-2,4-dione (Hydantoin) through Tf₂O-mediated dual activation of Boc-protected dipeptidyl compounds. *Organic Letters*, 16(22), 5902–5905, 2014.

López-López, L. I., de Loera-Carrera, D. A., de Jesús Rivera-Ávalos, E., & Saénz-Galindo, A. (2018). Hidantoína y derivados como estructuras de importancia en la Química medicinal: Avances recientes. *Afinidad*, 75(584).

Matos-Rocha, T.J., Lima, M.D., Silva, A.L., Oliveira, J.F., Gouveia, A.L., Silva, V.B., Almeida Júnior, A.S., Brayner, F.A., Cardoso, P.R., Pitta-Galdino, M.D., Pitta, I.D., Rêgo, M.J., Alves, L.C., Pitta, M.G. Synthesis and biological evaluation of novel imidazolidine derivatives as candidates to schistosomicidal agents. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 59, 2017.

MOGUILLEWSKY, M.; BERTAGNA, C.; HUCHER, M. Pharmacological and Clinical Studies of the Antiandrogen Anandron. *Journal of Steroid Biochemistry*, 27(1910), 871–875, 1954.

MUKHERJEE, Asama et al. Evaluation of fluoren-NU as a novel antitumor agent. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, v. 17, n. 9, p. 387-396, 2009.

Rogawski, M. A., & Löscher, W. (2004). The neurobiology of antiepileptic drugs for the treatment of nonepileptic conditions. *Nature medicine*, 10(7), 685.

SAKTHIVEL, Kunnathur Murugesan; GURUVAYOORAPPAN, Chandrasekaran. Acacia ferruginea inhibits tumor progression by regulating inflammatory mediators-(TNF- α , iNOS, COX-2, IL-1 β , IL-6, IFN- γ , IL-2, GM-CSF) and pro-angiogenic growth factor-VEGF. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v. 14, n. 6, p. 3909-3919, 2013.

SHAH, Afzal et al. Characterization and DNA binding studies of unexplored imidazolidines by electronic absorption spectroscopy and cyclic voltammetry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 120, p. 90-97, 2013.

SHARMA, Vijay; CRANKSHAW, Carolyn L.; PIWNICA-WORMS, David. Effects of multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein expression levels and coordination metal on the cytotoxic potency of multidentate (N₄O₂)(ethylenediamine) bis [propyl (R-benzylimino)] metal (III) cations. *Journal of medicinal chemistry*, v. 39, n. 18, p. 3483-3490, 1996.

ŠMIT, B.M.; PAVLOVIĆ, R.Z. Three-step synthetic pathway to fused bicyclic hydantoins involving a selenocyclization step. *Tetrahedron*, 71(7), 1101–1108, 2015.

6. AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Universidade Federal de Pernambuco e ao Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica por oportunizar o desenvolvimento da pesquisa e a ciência.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Produtos Naturais e Química Medicinal

AVALIAÇÃO *IN SILICO* DA FARMACOCINÉTICA E TOXICOLOGIA DO NOVO AGONISTA PPAR- γ LPSF/JB-12

J.S.S. BRITO¹, J.A.S. MOURA¹, J.F. BRANCO JÚNIOR¹, I.R. PITTA¹, M.R. GALDINO-PITTA¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino, Laboratório de Síntese e Planejamento de Fármacos

E-mail para contato: jullyennebrito@gmail.com

RESUMO – *A busca por moléculas anti-inflamatórias mais seletivas e seguras é algo constante, uma vez que a inflamação está associada à origem de diversas doenças. Diante disso, desenvolveu-se o composto LPSF/JB-12, um derivado tiazolidínico 3,5-dissubstituído com promissora atividade imunomoduladora. A realização dos ensaios in silico é pertinente para o desenvolvimento de qualquer novo fármaco, uma vez que proporciona maior direcionamento e reduz tempo e recursos gastos com a pesquisa. Com isso, o presente estudo fez a análise das predições farmacocinéticas e toxicológicas do LPSF/JB-12, através de métodos in silico em plataformas on-line. Assim, observou-se que o LPSF/JB-12, apresenta propriedades de absorção e distribuição favoráveis, mas se deve atenção a metabolização por inibir importantes CYPs. Nas predições toxicológicas, o derivado apresentou resultados favoráveis, porém para a hepatotoxicidade, é necessário a confirmação por outros métodos, uma vez que apresentou resultados divergentes. Com isso, foi possível prever parâmetros para estudos posteriores, bem como para a triagem e produção de novos derivados.*

Palavras chave: Química medicinal, Anti-inflamatório, Tiazolidina-2,4-diona.

ABSTRACT - *The search for more selective and safe anti-inflammatory molecules is something constant, since inflammation is associated with the origin of several diseases. Therefore, the compound LPSF/JB-12 was developed, a 3,5-disubstituted thiazolidine derivative with promising immunomodulatory activity. The performance of in silico assay is relevant for the development of any new drug, since it provides greater direction reduces time and resources spent on research. Thereby, the present study analyzed the pharmacokinetic and toxicological predictions of the LPSF/JB-12, using in silico methods on online platforms. Thus, it was observed that the LPSF/JB-12 has favorable absorption and distribution properties, but attention should be paid to metabolization because it inhibits important CYPs. In the toxicological predictions, the derivative showed favorable results, however for hepatotoxicity, confirmation by other methods is necessary, since it presented divergent results. Thereby, it was possible to predict parameters for further studies, in the screening and production of new derivatives.*

Key-words: Medicinal chemistry, Anti-inflammatory, Thiazolidine-2,4-dione.

1. INTRODUÇÃO

São muitas as doenças que estão associadas ao processo inflamatório, como o câncer, artrite e infecções (Liaras *et al.*, 2018), por conseguinte, a busca de novas linhas terapêuticas anti-inflamatórias com menor toxicidade e maior seletividade é algo contínuo, e os métodos de análise *in silico* são bastantes relevantes nessa procura, visto que o mesmo possibilita a realização de uma triagem, fornecendo uma seleção de moléculas mais viáveis, além de uma orientação mais específica nas pesquisas, economizando assim, recursos e tempo em testes desnecessários (Pires *et al.*, 2015).

Um dos alvos de grande interesse para a terapêutica anti-inflamatória são os receptores ativados por proliferadores de peroxissomos γ (PPAR γ), que além de sua conhecida função moduladora do metabolismo de lipídeos e carboidratos, também estão envolvidos nas funções regulatórias da inflamação, inibindo e estimulando, respectivamente, a secreção de citocinas pró e anti-inflamatórias (Korbecki *et al.*, 2019). As tiazolidinas fazem parte de uma classe de moléculas conhecida por sua ação agonistas do PPAR γ . Ademais, esse grupo farmacofórico apresenta várias atividades biológicas, como anti-inflamatória, antitumoral e antimicrobiana. Seu núcleo é composto por um anel heterocíclico pentamérico que apresenta um átomo de enxofre na posição 1 e nitrogênio na posição 3 (Figura 1.A), sendo a tiazolidina-2,4-diona (Figura 1.B) sua forma mais explorada (Liaras *et al.*, 2018) e de maior potencial anti-inflamatório, especialmente quando 3,5-dissubstituída (Rudnicki *et al.*, 2016).

O LPSF/JB-12 (Figura 1.C) é um derivado tiazolidínico 3,5-diarilsubstituída que apresentou promissora atividade imunomoduladora, levando a secreção reduzida de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6 (Branco-Júnior, 2017). Dessa forma, é importante a existência de mais estudos que auxiliem no direcionamento das etapas de avaliação da segurança e eficácia, de forma objetiva, com redução de tempo e custos da pesquisa. Com isso, esse trabalho visa analisar as propriedades farmacocinéticas de absorção, distribuição, metabolização e excreção, e avaliação da toxicidade, através de métodos *in silico* utilizando plataformas *on-line*.

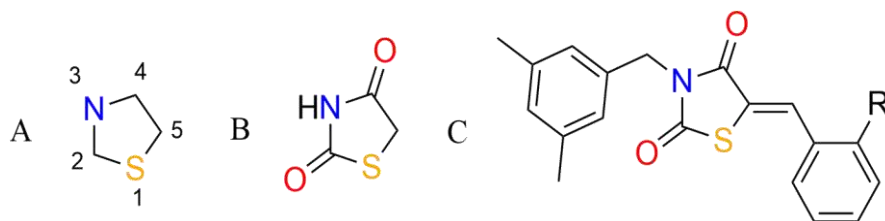


Figura 1 – Estruturas químicas da tiazolidina e seus derivados. A- Anel tiazolidínico. B- Tiazolidina-2,4-diona. C- Estrutura do LPSF/JB-12

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização das predições *in silico* da farmacocinética e toxicidade, foram utilizados três métodos validados em plataformas *on-line*, sendo elas a SwissADME (Daina *et al.*, 2017), pkCSM (Pires *et al.*, 2015) e admetSAR (Yang *et al.*, 2018). Para a obtenção das análises foi utilizado o código SMILES da molécula LPSF/JB-12. Os resultados foram comparados utilizando os seguintes parâmetros: absorção intestinal, permeabilidade a barreira hematoencefalica, interação como substrato da Glicoproteína-P (Pgp) e as interações com o complexo enzimático do Citocromo



P450 (CYP). Foi utilizado o clearance total, feito pelo pkCSM, para avaliação da excreção. Além disso, foi verificado os parâmetros de toxicidade, hepatotoxicidade, mutagênese a partir do teste de AMES, toxicidade oral aguda em ratos e máxima dose tolerada recomendada, pelo pkCM e admetSAR.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nas informações obtidas, foi verificado que o LPSF/JB-12 possui uma elevada possibilidade de absorção intestinal nas plataformas SwissADME, pkCSM (90.9%) e admetSAR (99.62%). Em relação à permeabilidade da barreira hematoencefálica, os três modelos computacionais mostraram que o derivado apresenta capacidade de alcançar o sistema nervoso central. A Pgp é uma proteína de membrana com função de bomba de efluxo relacionada a resistência farmacológica (Mukhametov *et al.*, 2017). E ao analisar o parâmetro de interação a Pgp, o composto não foi substrato da glicoproteína nas plataformas testadas.

As CYP são o principal grupo de enzimas relacionadas ao metabolismo da maioria das moléculas endógenas e exógenas no organismo (Manikandan *et al.*, 2018). Ao examinar a interação do LPSF/JB-12 foi observado que o derivado pode inibir as CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 e CYP3A4, não atuando na CYP2D6 segundo os três modelos *in silico* avaliados. O possível clearance total da molécula obtido pelo pkCSM foi de -0.097 log (ml/min/kg).

Para a avaliação das predições toxicológicas, de acordo com o admetSAR, o LPSF/JB-12 testou positivo para hepatotoxicidade, porém no pkCSM foi negativo. O derivado não apresentou carcinogenicidade no admetSAR, e nem mutagênese pelo teste AMES, também conhecido como teste de salmonela/microssoma, capaz de identificar substâncias com a capacidade de induzir algumas mutações genéticas (Zeiger, 2019). Através do admetSAR, foi positiva a presença de micronúcleo, que são corpos cromatínicos membranosos visíveis em células em estágio de divisão, associado a ocorrência de mutações cromossômicas estrutural e/ou numérica (Russo *et al.*, 2018). A possível dose letal média (LD50), encontrado para ratos em toxicidade aguda no pkCSM, foi de 2.763 mol/kg, enquanto a máxima dose tolerada recomendada foi de 0.182 log mg/kg/dia, considerada baixa.

4. CONCLUSÃO

É verificado então que o derivado tiazolidínico possui algumas propriedades farmacocinética eficazes, ao ser bem absorvido pelo trato gastrointestinal e atingir o SNC, além de não ser substrato da Pgp. Porém foram reportadas algumas limitações no composto, ao inibir importantes enzimas CYPs e ao fornecer alguns parâmetros desfavoráveis relacionados à toxicidade. Entretanto é válido ressaltar que, por utilizar uma metodologia *in silico*, os resultados obtidos são pressuposições, estudos teóricos, o que explica a possibilidade de ocorrência de resultados distintos quando utilizado diferentes plataformas.

5. REFERÊNCIAS

BRANCO-JÚNIOR, J. F. Planejamento, síntese e avaliação da atividade imunomoduladora de novos derivados tiazolidínicos em células mononucleares de pacientes gotosos. *Reposit.dig.UFPE.*, 2017.



- DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.*, v.7. 2017.
- GUPTA, S. C.; KUNNUMAKKARA, A. B.; AGGARWAL, S.; AGGARWAL, B. B. Inflammation, a Double-Edge Sword for Cancer and Other Age-Related Diseases. *Front. Immunol.*, v.9, 2018.
- KORBECKI, J.; BOBIŃSKI, R.; DUTKA, M. Self-regulation of the inflammatory response by peroxisome proliferator-activated receptors. *Inflamm. Res.*, v.68, p.443-458. 2019.
- LIARAS, K.; FESATIDOU, M.; GERONIKAKI, A. Thiazoles and Thiazolidinones as COX/LOX Inhibitors. *Molecules.*, v.23(3). 2018
- MANIKANDAN, P.; NAGINI, S. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. *Curr. Drug. Targets.*, v.19, p.38-54. 2018.
- MUKHAMETOV, A.; RAEVSKY, O. A. On the mechanism of substrate/non-substrate recognition by P-glycoprotein. *J. Mol. Graph. Model.*, v.71, p. 227-232. 2017.
- PIRES, D. E., V.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. *J. Med. Chem.*, v.58, p. 4066-4072. 2015.
- RUDNICKI, M.; TRIPODI, G. L.; FERRER, R.; BOSCA, L.; PITTA, M. G. R.; PITTA, I. R.; ABDALLA, D. S. P. New thiazolidinediones affect endothelial cell activation and angiogenesis. *Eur. J. Pharmacol.*, v.782, p.98-106. 2016.
- RUSSO, A.; DEGRASSI, F. Molecular cytogenetics of the micronucleus: Still surprising. *Mutat Res Gen Tox En.* 2018.
- YANG, H.; LOU, C.; SUN, L.; LI, J.; CAI, Y.; WANG, Z.; LI, W.; LIU, G.; Tang, Y. admetSAR 2.0: web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties. *Bioinformatics.* 2018.
- ZEIGER, E. The Test that Changed the World: The Ames Test and the Regulation of Chemicals. *Mutat Res Gen Tox En.*, v.841, p.43-48. 2019.

6. AGRADECIMENTOS

UFPE; NUPIT-SG; FACEPE; INCT-IF; CAPES; CNPq.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Produtos Naturais e Química Medicinal

SÍNTESE E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTI *T. cruzi* DE NOVAS 1,2,4-OXADIAZOLINAS DI-ARILADAS.

F. N. COUTINHO¹, D. R. Da SILVA¹, A. C. Da SILVA Jr¹, B. M. T. De MELO¹, M. F. De LIRA¹,
C. De OLIVEIRA BEZERRA¹, L. L. de OLIVEIRA¹, E. K. SOUZA¹, A. C. Da SILVA SANTOS³,
V. P. HERNANDES³, T. G. Da SILVA², A. R. De FARIA^{1*}

¹ Universidade Federal de Pernambuco, CCS, Depto. de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Síntese Orgânica Aplicada a Fármacos – LASOF.

² Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Antibióticos.

³ Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Departamento de Imunologia do Instituto Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ.

E-mail para contato: fncout90@gmail.com, *rodolfo.ufpe@gmail.com

RESUMO – *Os oxadiazóis e correlatos são compostos heterocíclicos que têm apresentado atividades biológicas e recentes estudos tem apontado atividades antiparasitárias, sendo assim, o objetivo deste trabalho consiste na síntese de novos derivados híbridos, contendo o núcleo 1,2,4-oxadiazolina 4,5-di-arilados e análise da atividade anti T. cruzi. Através de reações de cicloadição 1,3-dipolar entre as iminas ariladas e o óxido de carboetoxiformonitrila (CEFNO), os cicloadutos 1,2,4-oxadiazolinas di-ariladas foram obtidos. As formas tripomastigotas e amastigotas foram semeadas em placas de 96 poços, e os valores de IC₅₀ obtidos pelo software GraphPad Prism. Os quatro novos compostos 1,2,4-oxadiazolínicos di-arilados, com função éster, tiveram suas estruturas confirmadas por RMN ¹H e RMN ¹³C. A avaliação da atividade anti T. cruzi realizada demonstrou que o composto **6d** foi o que mais se destacou, apresentando um IC₅₀ de 17μM, em comparação ao fármaco de referência, benznidazol, que possui 6,3μM para essa forma evolutiva.*

Palavras Chaves: cicloadutos oxadiazolínicos, cicloadição 1,3-dipolar, iminas aromáticas

ABSTRACT - *Oxadiazoles and correlates are heterocyclic compounds that have shown biological activities and recent studies have pointed out antiparasitic activities, therefore, the objective of this work is the synthesis of new hybrid derivatives, containing the 1,2,4-oxadiazoline nucleus 4,5-di-arylates and analysis of their anti T. cruzi activity. Through 1,3-dipolar cycloaddition reactions between aryl imines and carboethoxyformonitrile oxide (CEFNO), the di-arylated 1,2,4-oxadiazolines were obtained. The trypomastigote and amastigote forms were seeded in 96-well plates, and the IC₅₀ values by the GraphPad Prism software. The four new 1,2,4-oxadiazolinic di-arylated compounds, with ester function, had their structures confirmed by ¹H NMR and ¹³C NMR. Anti T. cruzi activity performed, demonstrated that the compound **6d** was the one that stood out the most, presenting an IC₅₀ of 17μM, in comparison to the reference drug, benznidazole, which has 6.3μM for this evolutionary form.*

Keywords: oxadiazoline cycloadducts, 1,3-dipolar cycloaddition, aryl imines

1. INTRODUÇÃO

Os 1,2,4-oxadiazóis e correlatos, como oxadiazolinas, são compostos heterocíclicos que têm apresentado diversas atividades biológicas no estudo da química medicinal. Além de estarem presentes em medicamentos antimicrobianos, antineoplásicos e antiretrovirais (SELVARAJ et al., 2017), recentes estudos tem apontado atividades antiparasitárias, dentre elas, contra o parasita *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas. Por ser endêmica de países em desenvolvimento e ter como única alternativa terapêutica o benznidazol, eficaz apenas na fase aguda da doença e de elevada toxicidade, a doença de Chagas é reconhecida como doença negligenciada, tornando-a alvo necessário para pesquisa de novos fármacos (SANTOS et al., 2018). Em nosso grupo de pesquisa, foram obtidas hidrazonas oxadiazolínicas **2** (figura 1), à partir do inédito heterobícclo pirrolidina[1,2-*d*]1,2,4-oxadiazolina **1**, que apresentou pronunciada atividade antinociceptiva, assim como antimicrobiana (MENDES, 2010). Visando os mesmos núcleos farmacofóricos, o objetivo deste trabalho é a síntese de novos derivados híbridos, contendo o núcleo 1,2,4-oxadiazolina 4,5-di-arilado (em vermelho) com a função hidrazona (em azul) **3**, e análise da atividade anti *T. cruzi* para a 1,2,4-oxadiazolina 4,5-di-arilado **6**. (COUTINHO, 2018)

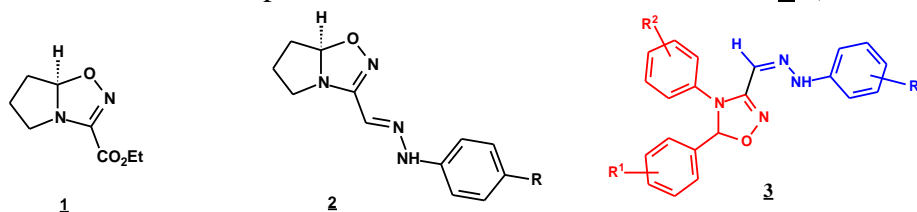
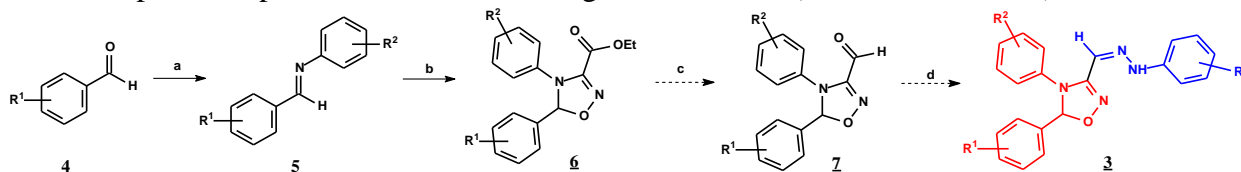


Figura 1: Estruturas contendo o núcleo oxadiazolínicos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

As iminas di-ariladas **5** foram obtidas a partir de reações dos respectivos benzaldeídos substituídos **4** com anilinas substituídas em sonicção, à temperatura ambiente, utilizando CH_2Cl_2 como solvente (etapa a). Posterior reações de cicloadição 1,3-dipolar entre as iminas **5** e o óxido de carboetoxiformonitrila (CEFNO), gerado *in situ* a partir de seu respectivo precursor (Clorooxiimidoacetato de etila – obtido a partir da glicina esterificada), os cicloadutos 1,2,4-oxadiazolinas di-ariladas **6** foram obtidos (etapa b). Após purificação em coluna de cromatografia *flash*, utilizando sílica como fase estacionária, e posterior remoção de resíduos de solvente e água, foram determinadas as características físico-químicas das moléculas e sua elucidação através de análises espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^1H e de ^{13}C) e IVFT.



Etapa a: EtOH, pH=4-5, ultrassom/ Etapa b: TEA, CEFNO, CHCl_3 , t.a., reação anidra

Esquema 1: Rota sintética das novas oxadiazolinas di-ariladas.

As novas oxadiazolinas **6** foram submetidas à avaliação da atividade antichagásica preliminar, enquanto estamos dando sequência na síntese para obtenção das hidrazonas

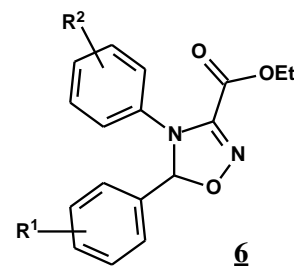
oxadiazolônicas **3**. As formas tripomastigotas e as formas amastigotas do *T. cruzi* foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24h, a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂. Os compostos foram adicionados em diferentes concentrações (0,6 a 20 µg/mL), e as placas incubadas novamente por 96h. Foi realizada a leitura da absorvância a 570 nm no espectrofotômetro THERMO SCIENTIFIC Multiskan FC. Os valores de IC₅₀ foram calculados por análise de regressão utilizando o software GraphPad Prism. Ambos os testes foram feitos em triplicatas, apresentando o controle negativo em poços sem a utilização de tratamento, e como controle positivo foi utilizado o Benznidazol.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na síntese das iminas di-aryladas foram utilizadas proporções equimolares dos benzaldeídos e anilinas comerciais substituídas, utilizando ácido acético como catalisador reacional. As iminas sintetizadas foram submetidas a reação de cicloadição 1,3 dipolar com o CEFNO, formado *in situ*. Foram obtidos 4 (quatro) novos cicloadutos oxadiazolínicos di-arylados com função éster em C3 apresentados na tabela 1.

Tabela1 - Identificação dos compostos oxadiazolínicos

Código	R ¹	R ²	Rendimentos
6a	<i>p</i> -CH ₃	<i>p</i> -H	41%
6b	<i>p</i> -NO ₂	<i>p</i> -isop.	29%
6c	<i>p</i> -NO ₂	<i>p</i> -F	28%
6d	<i>p</i> -NO ₂	<i>p</i> -Br	23%



Os espectros de RMN ¹H dos compostos é apresentado na figura 2, apresentando um singleto em 6,4 ppm, confirmando a formação do ciclo oxadiazolínico, além de outros sinais diagnósticos, que confirmam as estruturas das novas moléculas.

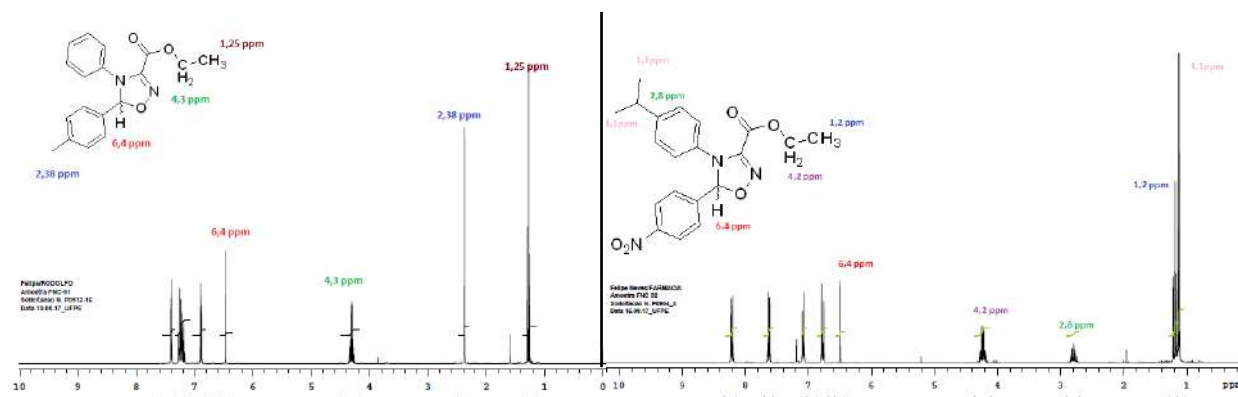


Figura 2: Sinais diagnósticos das moléculas **6a** (à esquerda) e **6b** (à direita) RMN ¹H (CDCl₃), 400MHz .

Os resultados da atividade anti *T. cruzi* dos compostos **6a-6d** para as formas evolutivas tripomastigota e amastigotas estão descritos na tabela 2. Podem ser observados valores de concentração inibitória (IC₅₀) elevados para a forma evolutiva tripomastigota, tornando essas moléculas inativas para esse tipo de forma evolutiva do protozoário. Já em relação a forma



intracelular (amastigota), o composto **6d** foi o que mais se destacou, apresentando um IC₅₀ de 17µM, em comparação ao fármaco de referência, benznidazol, que possui 6,3µM para essa forma evolutiva.

Tabela 2 - Resultados da atividade antichagásica (tripomastigota e amastigota) e de citotoxicidade em macrófagos dos compostos **6a-6d**

Compostos	macrófagos CC ₅₀ (µM)	tripomastigota IC ₅₀ (µM)	amastigota IC ₅₀ (µM)
6a	303	>260	>64
6b	128	>260	27
6c	215	>260	>55
6d	138	>260	17
Benznidazol	123	14,6	6,3

4. CONCLUSÃO

Os quatro novos compostos 1,2,4-oxadiazolínicos di-arilados **6a-d**, com função éster, tiveram suas estruturas confirmadas por RMN ¹H (representado acima), RMN ¹³C e IVTF e suas propriedades físico químicas determinadas. A avaliação da atividade antichagásica preliminar dessas oxadiazolinas foi realizada, mostrando interessante atividade frente à forma intramolecular do parasita, mostrando-se assim promissora a sequência do estudo. A sequência da síntese, visando a obtenção das hidrazonas oxadiazolínicas está sendo realizada e a avaliação da atividade antichagásica da série final, assim como de outros derivados **6** que serão obtidos será aprofundada. A atividade anti-inflamatória das hidrazonas oxadiazolínicas também será avaliada oportunamente.

5. REFERÊNCIAS

- COUTINHO, F. N., Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – UFPE, 2018
MENDES, C. C. B., Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – UFPE, 2010
SANTOS, P.P.; SANTIAGO, V.S.; LIMA M. E. F. 1,2,4- and 1,3,4-Oxadiazoles as scaffolds in the development of antiparasitic agents. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 29, 3, p. 435-456, 2018
SELVARAJ, K.; KULANTHAI, K.; SADHASIVAM, G. Synthesis, characterization and biological evaluation of novel 2,5 substituted-1,3,4 oxadiazole derivatives. *Saud. Pharm. J.*, v. 25, 3, p. 337-345, 2017.

6. AGRADECIMENTOS





ÁREA DE SUBMISSÃO: Produtos Naturais e Química Medicinal

SÍNTESE DE HÍBRIDOS ISOXAZOLINA/TIAZOL COM POTENCIAIS ATIVIDADES ANTICÂNCER E LEISHMANICIDA

M. F. De LIRA¹, F. N. COUTINHO¹, B. M. T. De MELO¹, L. N. DE BARROS¹, C. O. BEZERRA¹,
L. L. De OLIVEIRA¹, M. S. A. NETA¹, J. A. B. MESQUITA¹, T. G. Da SILVA², P. MARCHAND³,
A. R. De FARIA^{1*}

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Síntese Orgânica Aplicada a Fármacos – LASOF.

² Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Antibióticos.

³ Université de Nantes, Institut de Recherche en Santé 2, IICiMed EA1155, Département de Chimie Thérapeutique.

E-mail para contato: mylenalira.ml@gmail.com, *rodolfo.ufpe@gmail.com

RESUMO – *O núcleo isoxazolina tem apresentado uma boa atividade anticâncer e leishmanicida. Sendo assim, utilizando o método de hibridização molecular, inéditas tiossemicarbazonas-isoxazolínicas aza-bicíclicas de cinco membros foram sintetizadas. A partir de enamidas endocíclicas de 5 membros foram realizadas cicloadições 1,3-dipolar com N-óxido de nitrila - CEFNO, isoxazolininas aza-bicíclicas de 5 membros foram obtidas como cicloadutos, tendo a função éster em posição C3. Subsequente redução do éster com NaBH₄ ao respectivo álcool e posterior oxidação do álcool em C3, via Swern, os aldeídos isoxazolínicos foram obtidos. A última etapa consistiu na condensação dos aldeídos isoxazolínicos com tiossemicarbazida comercial. Os intermediários inéditos tiossemicarbazonas foram caracterizados através de espectroscopia de RMN ¹H, RMN ¹³C e bidimensionais, além de algumas de suas propriedades físico-químicas determinadas. A última etapa consistirá na obtenção da série de híbridos isoxazolina / tiazol, que serão, juntamente com os intermediários tiossemicarbazonas, submetidos à avaliação anticâncer e leishmanicida.*

Palavras Chaves: enamidas endocíclicas, tiossemicarbazonas, isoxazolininas aza-bicíclicas

ABSTRACT - *The isoxazoline nucleus has shown good anti-cancer and leishmanicidal activity. Thus, using the molecular hybridization method, unprecedented five-membered aza-bicyclic thiosemicarbazones-isoxazolines were synthesized. Starting from 5-membered endocyclic enamides, 1,3-dipolar cycloadditions were performed with nitrile N-oxide - CEFNO, 5-membered aza-bicyclic isoxazolines were obtained as cycloadducts, with the ester function in the C3 position. Subsequent reduction of the ester with NaBH₄ to the respective alcohol and subsequent oxidation of the alcohol to C3, via Swern, the isoxazoline aldehydes were obtained. The next step consisted of condensing the isoxazoline aldehydes with commercial thiosemicarbazide. The inedited*



intermediates, were characterized by ¹H NMR, ¹³C NMR and two-dimensional spectroscopy, in addition to some of their determined physical-chemical properties. The last step will consist of obtaining the series of isoxazoline / thiazole hybrids, which will be, together with the thiosemicarbazone intermediates, submitted to anti-cancer and leishmanicidal evaluation

Keywords: endocyclic enamides, thiosemicarbazones, aza-bicyclic isoxazolines

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose e o câncer são doenças que afetam milhões de pessoas em todo mundo. Atualmente, não há vacinas ou drogas disponíveis para prevenção destas enfermidades e o tratamento medicamentoso é limitado (INCA, 2020). Como um dos principais métodos de tratamento, os quimioterápicos agem causando a destruição das células cancerígenas; todavia, não possuem especificidade, de modo que também acabam causando danos às células saudáveis, que acarreta em toxicidade e reações adversas (KAMEL, 2014)

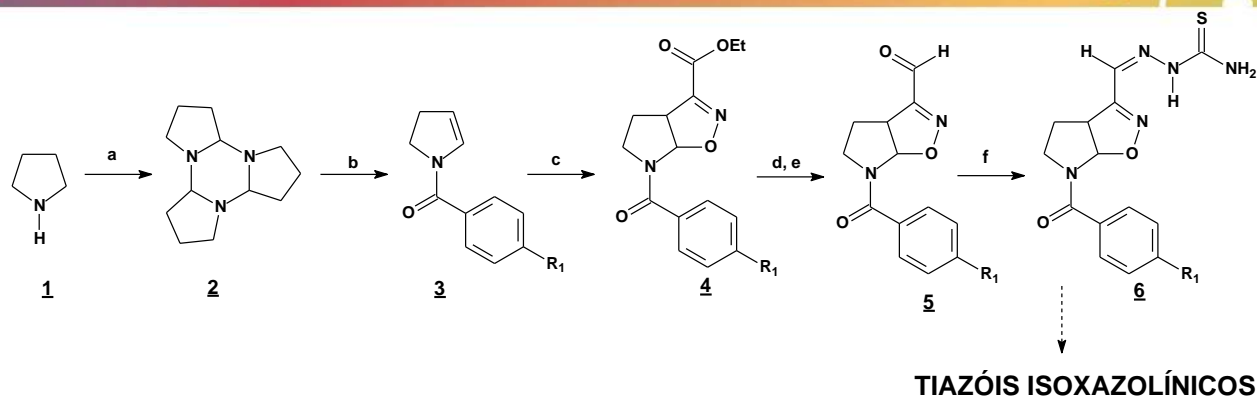
Nesse contexto, a hibridização molecular tem sido utilizada na química medicinal a fim de produzir novos compostos. O núcleo isoxazolina, farmacóforo presente em diversos ativos farmacêuticos, para o qual está descrito na literatura, dentre outras ações biológicas, a função anticâncer. Na literatura também são descritas atividades apresentadas pelo grupo tiazol. A exemplo, atividade antiproliferativa seletiva de 5-acetil-4-metil-2-(3-piridil) tiazol *in vitro* (AMIN *et al.*, 2017). De igual modo compostos a função tiossemicarbazona tem apresentado atividade leishmanicida, assim como anticancerígena (VIDHYA, 2017).

Assim, este trabalho visa sintetizar novas estruturas moleculares, fazendo uso da hibridização molecular. Para tal, pretende-se utilizar como um dos farmacóforos dessas novas moléculas o heterociclo 2-isoxazolina-aza-bicíclica, núcleo desenvolvido no nosso laboratório de pesquisa (DE ALMEIDA, 2009; REIS, 2011).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O **Esquema 1** apresenta a rota de síntese das novas tiossemicarbazonas isoxazolínicas de cinco membros **6**. O trímero da Δ^1 -pirrolina **2** foi obtido através da oxidação catalítica da pirrolidina **1**, pelo persulfato de sódio, em meio básico e nitrato de prata como catalisador. O monômero, Δ^1 -pirrolina, tem elevada reatividade, o que leva a trimerização no meio reacional. As enamidas **3** foram sintetizadas partindo do trímero da pirrolina bruto, ou seja, sem prévia purificação, utilizando aparelho de ultrassom. Foram adicionados os respectivos cloretos de benzoílas substituídos que levaram à formação das enamidas, pela reação com a Δ^1 -pirrolina.

Na reação subsequente, o cloroximidoacetato de etila, dá origem *in situ* ao óxido de carboetoxiformonitrila (CEFNO) que reage com as enamidas para formação dos cicloadutos **4**. Subsequente redução do éster com NaBH₄ levou à formação do respectivo álcool, que ao ser submetido à oxidação de Swern, formou os respectivos aldeídos isoxazolínicos **5**. Os aldeídos reagiram com a tiossemicarbazida para formação das tiossemicarbazonas **6**, reação essa catalisada por HCl.



a) *i) Na₂S₂O₈, AgNO₃, NaOH b) ultrassom, cloretos de benzoíla, Et₃N, THF, c) Et₃N, Cloroxiimidoacetato de etila, THF d) NaBH₄, MeOH, e) DMSO, TEA, C₂O₂Cl₂, CH₂Cl₂, f) Tiossemicarbazida, HCl, EtOH.*

Esquema 1: Rota sintética para obtenção das novas tiossemicarbazonas **6** isoxazolínicas aza-bicíclicas de cinco membros.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As etapas de síntese até a formação do aldeído são uma expertise em nosso grupo de pesquisa, já bem descritas em outros trabalhos e com todas as moléculas elucidadas. Como novidade sintética, temos as reações de formação de tiossemicarbazonas **6**, a partir dos respectivos aldeídos **5** isoxazolínicos aza-bicíclicos. Os resultados podem ser observados na Tabela 1. As tiossemicarbazonas isoxazolínicas **6** foram devidamente caracterizadas por meio das espectroscopias de RMN de ¹H, de RMN ¹³C e bidimensionais e determinados seus parâmetros físico-químicos. O espectro de ¹H RMN de **6a** é apresentado representativamente na figura 1, mostrando, entre outros, os sinais “diagnósticos” da formação dos heterobiciclos isoxazolínicos, que são os hidrogênios dos metinos da junção dos anéis, ligado aos átomos de oxigênio e nitrogênio, com deslocamentos químicos próximos de 6,6 ppm e 4,2 ppm respectivamente, assim como os hidrogênios HN-N em torno de 11,7 ppm e HC=N em torno de 6,1 ppm, confirmando as estruturas propostas no planejamento das novas moléculas. Os espectros de ¹³C RMN e bidimensionais (COSY, HMBC E HSQC) corroboram as análises feitas em ¹H RMN.

Tabela 1 – Identificação e dados físico-químicos das tiossemicarbazonas isoxazolínicas

Código	R ₁	Fórmula	Aspecto	Rf		
				AcOEt:Hex (4:1)	P.F.	Rendimento %
6a	NO ₂	C ₁₄ H ₁₄ N ₆ O ₄ S	pó amarelado	0,24	199°C - 202°C	79
6b	Cl	C ₁₄ H ₁₄ ClN ₅ O ₂ S	pó cinza	0,46	n.r.	37
6c	OCH ₃	C ₁₅ H ₁₇ N ₅ O ₃ S	pó branco	0,21	206°C - 209°C	35

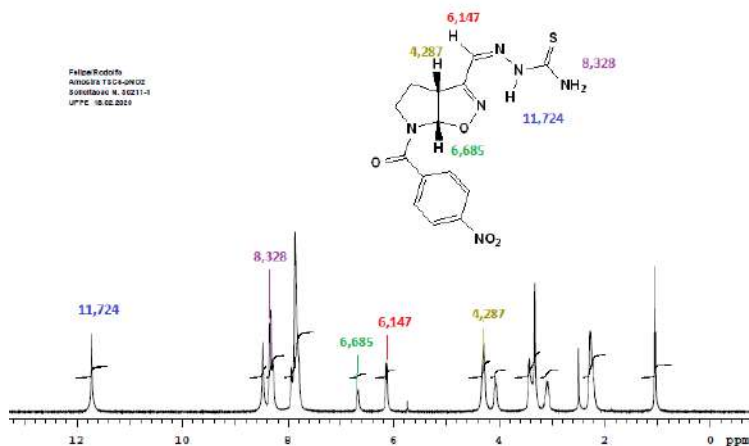


Figura 1. Espectro de RMN ^1H (400Hz, DMSO-d_6) de **6a**.

4. CONCLUSÃO

As novas tiossemicarbazonas isoxazolinicas aza-bicíclicas de cinco membros **6a-c** foram sintetizadas e elucidadas quimicamente, assim como tiveram suas características físico-químicas determinadas. Posteriormente, a série de tiossemicarbazonas será expandida, assim como a obtenção dos produtos finais híbridos isoxazolina/tiazol, para avaliação da atividade anticâncer e leishmanicida.

5. REFERÊNCIAS

- AMIN, H. K., EL-ARABY, A. M., EID S., NASR T., BONDOCK S. A thiazole analogue exhibits an anti-proliferative effect in different human carcinoma cell lines and its mechanism based on molecular modeling. *Adv. Bio. Chem.* 2017, 7, 76-87.
- DE ALMEIDA, V. M., SANTOS, R. J., GÓES, A. J. S., LIMA, J. G., CORREIA, C. R. D., DE FARIA, A. R., Synthesis and preliminary evaluation of antinociceptive activity of novel isoxazolyl-aryl-hydrazones. *Tetra. Lett.*, 2009, 50, 684-687
- INCA. Instituto Nacional do Câncer. 2017. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>> Acesso: 13.07.2020
- KAMEL, M. M. Synthesis, Characterization, Cytotoxicity and Toxicity of Pyrazole Derivates. *Acta Chimica Slovenica*, v. 62, p. 136-151, 2014.
- THOMAS, V., GILES, D., Coumarin Derivates as Anti-inflammatory and Anticancer Agents in Medicinal Chemistry. *Anti-cancer Agent. M.E.* 2017, 17, 415-423.

6. AGRADECIMENTOS





ÁREA DE SUBMISSÃO: Produtos Naturais e Química Medicinal

BIOATIVIDADES TERAPÊUTICAS DOS CAROTENOIDES DE FONTES MARINHAS: UMA BREVE REVISÃO

F. A. MATOS¹, N.F.B. SILVA², B. A. M. COSTA³, S. R. S. SILVA³, A. L. F. PORTO³ e V. M. OLIVEIRA³

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Graduando em Licenciatura em Ciências Biológicas, Departamento de Biologia.

²Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Graduando do curso de Engenharia De Pesca, Departamento de Pesca e Aquicultura, UFRPE.

³Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, DMFA, Laboratório de Tecnologia de Produtos Bioativos, LABTECBIO.

E-mail para contato: vagne_melo@hotmail.com

RESUMO – *Os carotenoides são compostos isoprenoides lipofílicos que podem ser extraídos do ambiente marinho, principalmente de algas, microalgas e/ou animais marinhos, como peixes e crustáceos. Esses pigmentos têm despertado especial interesse do segmento comercial devido suas propriedades biológicas. Nesse contexto, este trabalho objetivou elencar, através de uma mini-revisão, as principais bioatividades dos carotenóides extraídos de organismos marinhos. Para tanto, foram realizadas buscas em bancos de dados científicos, a saber: ScienceDirect, Elsevier, Springer, Tandfonline, PubMed, Wiley Online Library e o Google Scholar, tomando por base artigos científicos de pesquisa e de revisão de literatura. Embora se tenha um grande volume de informações a respeito dos carotenoides, existe a necessidade de novas abordagens investigativas quando o tema se reporta ao ambiente marinho, principalmente quanto a exploração de suas aplicações terapêuticas e farmacológicas. Dentre as principais bioatividades desses pigmentos marinhos, estão seus efeitos antioxidante, anti-obesidade, antiinflamatória, antienvelhecimento, antiproliferativo, imunoestimuladora, além de cardioprotetor, anti-diabético, entre outros. Assim, pigmentos carotenoides de organismos marinhos têm se destacado pela importância na saúde e bem-estar humano.*

Palavras-chave: aplicações, aquicultura, pigmentos, terapêutico.

ABSTRACT– *Carotenoids are lipophilic isoprenoid compounds that can be extracted from the marine environment, mainly from algae, microalgae and / or marine animals, such as fish and crustaceans. These pigments have aroused special interest in the commercial segment due to their biological properties. In this context, this work aimed to list, through a mini-review, the main bioactivities of carotenoids extracted from marine organisms. For that, searches were carried out*



in scientific databases, namely: ScienceDirect, Elsevier, Springer, TandFonline, PubMed, Wiley Online Library and Google Scholar, based on scientific research and literature review articles. Although there is a large amount of information about carotenoids, there is a need for new investigative approaches when the topic is related to the marine environment, especially regarding the exploration of its therapeutic and pharmacological applications. Among the main bioactivities of these marine pigments are their antioxidant, anti-obesity, anti-inflammatory, anti-aging, antiproliferative, immunostimulatory effects, as well as cardioprotective and anti-diabetic, among others. Thus, carotenoid pigments from marine organisms have stood out for their importance in human health and well-being.

Keywords: applications, aquaculture, pigments, therapeutic.

1. INTRODUÇÃO

O ambiente marinho é rico em compostos com inúmeras bioatividades, como efeitos antioxidante, antibacteriano, antitumoral, antitrombótico, anticoagulante, antiinflamatória, anti-proliferativo, anti-hipertensivo, anti-diabético, cardioprotetor, neuroprotetor (Bălașa; Chircov; Grumezescu, 2020), além de outros, o que tem despertado cada vez mais o interesse comercial, principalmente quando provenientes de fontes residuais.

Resíduos da indústria de aquicultura são ricos em compostos bioativos, especialmente, em carotenoides (Cheng *et al.*, 2020), uma classe importante de pigmentos terpenoides (Cahú *et al.*, 2012). Os vertebrados não podem sintetizar carotenoides endogenamente, mas os carotenoides derivados de organismos fotossintéticos em sua dieta são responsáveis por tons de vermelho, laranja e amarelo de muitas espécies, incluindo peixes teleósteos (Das; Biswas, 2016).

No tegumento, os pigmentos carotenoides são armazenados em xantóforos e eritróforos (células de pigmento amarelo e vermelho, respectivamente). Em peixes, esses tipos de cromatóforos também podem sintetizar pigmentos de pteridina amarelos a vermelhos. Os diversos carotenoides que ocorrem em peixes com suas cores são: tunaxantina (amarelo), luteína (amarelo esverdeado), β -caroteno (laranja), doradexantinas (amarelo), zeaxantina (laranja amarelo), cantaxantina (vermelho laranja), astaxantina (vermelho), equinenona (vermelha) e taraxantina (amarela) (Das; Biswas, 2016). Além de seu papel na coloração corporal, os carotenoides têm um papel importante na visão, como precursores de reguladores de transcrição, como antioxidantes e no sistema imunológico (Sefc; Brown; Clotfelter, 2014).

As propriedades biológicas dos carotenoides permitem uma ampla gama de aplicações comerciais (Vílchez *et al.*, 2011). Assim, este trabalho objetivou elencar através de uma mini-revisão as principais bioatividades dos carotenoides de organismos marinhos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para esta mini-revisão, foi realizada uma busca bibliográfica utilizando sites científicos, tais como ScienceDirect (<https://www.sciencedirect.com/>), Elsevier (<https://www.elsevier.com/>), Springer (<https://www.springer.com/>), TandFonline (<https://www.tandfonline.com/>), PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), Wiley Online Library (<https://onlinelibrary.wiley.com/>) e o Google Scholar (<https://scholar.google.com.br/>). A pesquisa foi realizada a partir das palavras-chave: carotenoides marinhos, carotenoides organismos marinhos; em português e sua tradução em inglês. Os materiais encontrados nos diferentes bancos de bases de dados científicos foram,



posteriormente, conferidos com detalhes sobre os modelos e tipos (artigos científicos; revisões bibliográficas), não havendo restrição quanto ao uso destes. Não houve qualquer restrição quanto a período de publicação. As informações gerais foram catalogadas de acordo com interesse dos autores.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As cores dos animais desempenham papéis importantes na comunicação, interações ecológicas e especiação. Os pigmentos carotenoides são compostos lipofílicos responsáveis por muitos tons de amarelo, laranja e vermelho nos organismos marinhos, o que tem despertado o interesse para aplicações biotecnológicas (Hamidiet *al.*, 2020), embora pouco se saiba sobre a expressão da coloração de carotenoides em peixes. A coloração baseada em carotenoides é influenciada pela dieta e pelas condições corporais e está positivamente relacionada ao sucesso do acasalamento e à dominância social (Sefc; Brown; Clotfelter, 2014).

As propriedades farmacêuticas e nutracêuticas dos carotenoides atraíram a atenção da indústria para a saúde humana (Miyashita; Hosokawa, 2018), especialmente para indústria de alimentos, como ingredientes alimentares, aditivos e suplementos (Rodriguez-Concepcionet *al.*, 2018); e, principalmente, em uma nova área de mercado, os cosmecêuticos. Os organismos marinhos são uma rica fonte de carotenoides, com propriedades ideais para produção industrial e manipulação biotecnológica (Sandmann, 2015; Viera; Pérez-Gálvez; Roca, 2018).

Eles representam o grupo mais comum de pigmentos em ambientes marinhos e geralmente são biossintetizados por todos os organismos marinhos autotróficos, como bactérias, algas e fungos (Galasso; Corinaldesi; Sansone, 2017), podendo estar associados a ácidos graxos, açúcares, proteínas ou outros compostos que podem alterar suas propriedades físicas e químicas e influenciar seus papéis biológicos (Rodriguez-Concepcion *et al.*, 2018).

As principais fontes de carotenoides são algas, microalgas e/ou animais marinhos, como peixes e crustáceos (Cahu *et al.*, 2012; Chuyen; Eun, 2015; Hamidi *et al.*, 2020). Sendo que, muitos dos pigmentos presentes nesses animais são metabólitos do β -caroteno, peridinina, diatoxantina, aloxantina, astaxantina e da fucoxantina, (Maoka, 2011). Este último pode ser encontrado nas algas marinhas marrons, nas macroalgas e nas diatomáceas, nas microalgas, e possui propriedades biológicas notáveis (Peng *et al.*, 2011). Alguns organismos heterotróficos contêm carotenoides provavelmente acumulados nos alimentos ou parcialmente modificados por reações metabólicas (Galasso; Corinaldesi; Sansone, 2017).

Dentre os principais efeitos desses pigmentos, estão à ação antioxidante (Miyashita 2009; Gammone; Riccioni; D'Orazio, 2015; Pérez-Gálvez; Viera; Roca, 2020), anti-obesidade (Gammone; D'Orazio, 2015; Ojulari; Lee; Nam, 2020), antiinflamatória (Jin *et al.*, 2020), antienvelhecimento, antiproliferativa, imunoestimuladora, além de cardioprotetora (Riccioni *et al.*, 2011; Galasso; Corinaldesi; Sansone, 2017) e anti-diabética (Chuyen; Eun, 2015; Sathasivam; Ki, 2018). Entre os carotenoides extraídos de organismos marinhos, o pigmento vermelho astaxantina possui forte atividade de eliminação de radicais livres e outras moléculas pró-oxidantes, protegendo a bicamada lipídica da peroxidação (Galasso; Corinaldesi; Sansone, 2017). Todavia, sua disponibilidade em humanos é reduzida e apresenta inúmeros fatores limitantes tais como: hidrofobicidade, baixa dissolução em fluidos entéricos, ser pouco instável, muito sensível à luz e ao estresse térmico. Nesse sentido, recentemente, tem sido investigada a utilização de nanoemulsões visando melhorar as características farmacológicas e físico-químicas desse pigmento no organismo humano (Fratter; Biagi; Cicero, 2019).

Existe um grande volume de dados científicos a respeito da extração de carotenoides, porém aqueles relacionados a organismos aquáticos e/ou apenas marinhos são poucos. A maioria se concentra apenas na tentativa de entender a coloração e sua potencialidade comercial. Com este trabalho, foram reagrupadas informações a respeito das explorações biológicas desses pigmentos. Assim, são descritas na Figura 1 as principais bioatividades de carotenoides extraídos de organismos marinhos de acordo com a literatura científica.

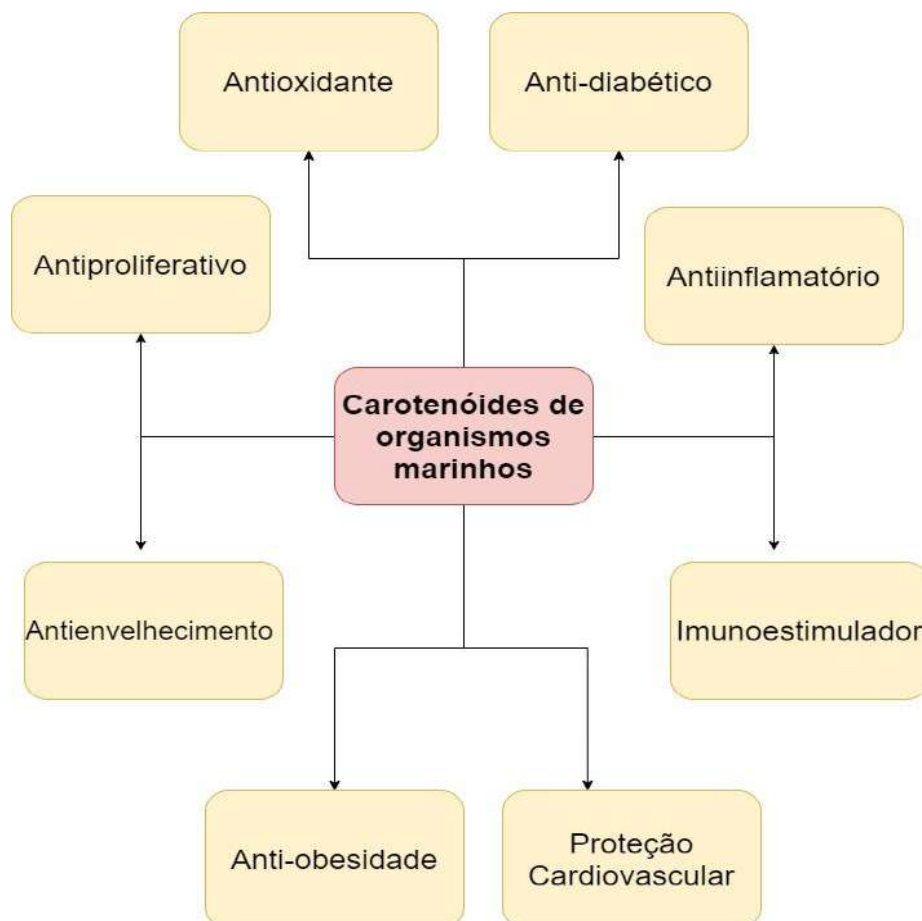
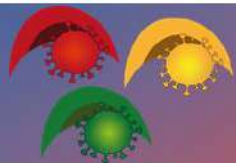


Figura 1- Bioatividades de carotenóides de organismos marinhos.

Fonte: Chuyen; Eun (2015) e Galasso; Corinaldesi; Sansone (2017).

As microalgas são atualmente as principais fontes de astaxantina (Henríquez *et al.*, 2016) e um dos organismos que apresentam maior potencial industrial e médico (Gateau *et al.*, 2017; Ambati *et al.*, 2019; Novoveská *et al.*, 2019); no entanto, esse carotenoide também se acumula em crustáceos, salmonídeos e aves. Os resíduos de processamento de produtos de animais marinhos são fontes significativas de astaxantina e podem ser empregados como alimento e para aplicações nutraceuticas, onde os resíduos de camarão são os resíduos mais explorados da indústria de frutos do mar empregados na extração de astaxantina (Routray *et al.*, 2019). Carotenoides produzidos por cianobactérias foram avaliados com sucesso em aplicações biotecnológicas para o tratamento tópico da psoríase (Lopes; Clarinha; Vasconcelos, 2020).

Gammone; D'Orazio (2015) compilaram dados científicos acerca dos efeitos anti-



obesidade da fucoxantina, um carotenoide pertencente às xantofilas; enquanto Jin *et al.* (2020) relataram sobre os efeitos anti-inflamatórios do fucoxantíol em células RAW264.7 induzidas por lipopolissacarídeos (LPS) pela via de hidrólise do mediador lipídico endógeno palmitoiletanolamida. Recentemente, tem sido explorado o papel dos carotenoides na melhora do sistema de defesa e imunidade em animais vertebrados e invertebrados (Tan *et al.*, 2020).

4. CONCLUSÃO

Pigmentos carotenoides obtidos de organismos marinhos têm demonstrado enorme potencial biotecnológico, principalmente devido à diversidade biológica de fontes e aplicações terapêuticas, sinalizando um mercado promissor para novas investigações.

5. REFERÊNCIAS

AMBATI, R.R.; GOGISETTY, D.; ASWATHANARAYANA, R.G.; RAVI, S.; BIKKINA, P. N.; BO, L.; YUEPENG, S. Industrial potential of carotenoid pigments from microalgae: Current trends and future prospects. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v.59, n.12, p.1880–1902, 2019.

BĂLAȘA, A.F.; CHIRCOV, C.; GRUMEZESCU, A.M. Marine Biocompounds for Neuroprotection-A Review. *Mar. Drugs*, v.18, n.6, p.290, 2020.

CAHÚ, T.B.; SANTOS, S.D.; MANDES, A.; CORDULA, C. R.; CHAVANTE, S.F.; JUNIOR L.B.C.; NADER, H.B. Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste. *Process Biochem.*, v.47, p.570–577, 2012.

CHENG, S.-H.; KHOO, H. E.; KONG, K. W.; PRASAD, K. N.; GALANAKIS, C. M. Extraction of carotenoids and applications. *Carotenoids: properties, processing and applications*, p. 259–288, 2020.

CHUYEN, H.V.; EUN, J.-B. Marine carotenoids: Bioactivities and potential benefits to human health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v.57, n.12, p.2600–2610, 2015.

DAS, A.P.; BISWAS, S.P. Carotenoids and pigmentation in ornamental fish. *J.Aquac. Mar. Biol.*, v.4, n.4, p.1-3, 2016.

FRATTER, A.; BIAGI, D.; CICERO, A. Sublingual Delivery of Astaxanthin through a Novel Ascorbyl Palmitate-Based Nanoemulsion: Preliminary Data. *Mar. Drugs*, v.17, n.9, p.508, 2019.

GALASSO, C.; CORINALDESI, C.; SANSONE, C. Carotenoids from Marine Organisms: Biological Functions and Industrial Applications. *Antioxidants*, v.6, n.4, p.96, 2017.



GAMMONE, M.A.; D'ORAZIO, N. Anti-obesity activity of the marine carotenoid fucoxanthin. *Mar. Drugs*, v.13, n.4, p.2, 196–2214, 2015.

GAMMONE, M.A.; RICCIONI, G.; D'ORAZIO, N. Marine Carotenoids against Oxidative Stress: Effects on Human Health. *Mar. Drugs*, v.13, p.10, 6226–6246, 2015.

GATEAU, H.; SOLYMOSI, K.; MARCHAND, J.; SCHOEFS, B. Carotenoids of Microalgae Used in Food Industry and Medicine. *Mini Rev. Med. Chem.*, v.17, n.13, p.1140–1172, 2017.

HAMIDI, M.; KOZANI, P.S.; KOZANI, P.S.; PIERRE, G.; MICHAUD, P.; DELATTRE, C. Marine Bacteria versus Microalgae: Who Is the Best for Biotechnological Production of Bioactive Compounds with Antioxidant Properties and Other Biological Applications?. *Mar. Drugs*, v.18, n.1, p.28, 2020.

HENRÍQUEZ, V.; ESCOBAR, C.; GALARZA, J.; GIMPEL, J. Carotenoids in Microalgae. *Subcell Biochem.*, v.79, p.219–237, 2016.

JIN, W.; YANG, L.; YI, Z.; FANG, H.; CHEN, W.; HONG, Z.; ZHANG, Y.; ZHANG, G.; LI, L. Anti-Inflammatory Effects of Fucoxanthinol in LPS-Induced RAW264.7 Cells through the NAAA-PEA Pathway. *Mar. Drugs*, v.18, n.4, p. 222, 2020.

LOPES, G.; CLARINHA, D.; VASCONCELOS, V. Carotenoids from Cyanobacteria: A Biotechnological Approach for the Topical Treatment of Psoriasis. *Microorganisms*, v.8,n.2, p.302, 2020.

MAOKA, T. Carotenoids in marine animals. *Mari. drugs*, v.9, n.2, p.278–293, 2011.

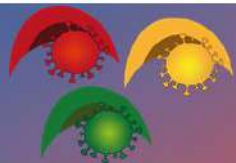
MIYASHITA, K. Function of marine carotenoids. *Forum Nutr.*, v.61, p.136–146, 2009.

MIYASHITA, K.; HOSOKAWA, M. Health impact of marine carotenoids. *J. Food Bioact.*, v.1, n.1, p.31–40, 2018.

NOVOVESKÁ, L.; ROSS, M.E.; STANLEY, M.S.; PRADELLES, R.; WASIOLEK, V.; SASSI, J.F. Microalgal Carotenoids: A Review of Production, Current Markets, Regulations, and Future Direction. *Mar. Drugs*, v.17, n.11, p.640, 2019.

OJULARI, O.V.; LEE, S.G.; NAM, J.O. Therapeutic Effect of Seaweed Derived Xanthophyll Carotenoid on Obesity Management; Overview of the Last Decade. *Int. J. Mol. Sci.*, v.21, n.7, p.2502, 2020.

PENG, J.; YUAN, J.P.; WU, C.F.; WANG, J.H. Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: metabolism and bioactivities relevant to human health. *Mar. Drugs*,



v.9, n.10, p.1806–1828, 2011.

PÉREZ-GÁLVEZ, A.; VIERA, I.; ROCA, M. Carotenoids and Chlorophylls as Antioxidants. *Antioxidants*, v.9, n.6, p.505, 2020.

RICCIONI, G.; D'ORAZIO, N.; FRANCESCHELLI, S.; SPERANZA, L. Marine carotenoids and cardiovascular risk markers. *Mar. Drugs*, v.9, n.7, 1166–1175, 2011.

RODRIGUEZ-CONCEPCION, M.; AVALOS, J.; BONET, M.L.; BORONAT, A.; GOMEZ-GOMEZ, L.; HORNERO-MENDEZ, D.; LIMON, M.C.; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A.J.; OLMEDILLA-ALONSO, B.; PALOU, A.; RIBOT, J.; RODRIGO, M.J.; ZACARIAS, L.; ZHU, C. A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. *Prog. Lipid Res.*, v.70, p.62–93, 2018.

ROUTRAY, W.; DAVE, D.; CHEEMA, S.K.; RAMAKRISHNAN, V.V.; POHLING, J. Biorefinery approach and environment-friendly extraction for sustainable production of astaxanthin from marine wastes. *Crit. Rev. Biotechnol.*, v.39, n.4, p.469–488, 2019.

SANDMANN G. Carotenoids of biotechnological importance. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, v.148, p.449–467, 2015.

SATHASIVAM, R.; KI, J.S. A Review of the Biological Activities of Microalgal Carotenoids and Their Potential Use in Healthcare and Cosmetic Industries. *Mar. Drugs*, v.16, n.1, p.26, 2018.

SEFC, K. M.; BROWN, A. C.; CLOTFELTER, E. D. Carotenoid-based coloration in cichlid fishes. *Comp. Biochem. Physiol., Part A*, v.173, p. 42-51, 2014.

TAN, K.; ZHANG, H.; LIM, L.S.; MA, H.; LI, S.; ZHENG, H. Roles of Carotenoids in Invertebrate Immunology. *Front Immunol.*, v.10, p.3041, 2020.

VIERA, I.; PÉREZ-GÁLVEZ, A.; ROCA, M. Bioaccessibility of Marine Carotenoids. *Marine drugs*, v.16, n.10, p.397, 2018.

VÍLCHEZ, C.; FORJÁN, E.; CUARESMA, M.; BÉDMAR, F.; GARBAYO, I.; VEGA, J. M. Marine carotenoids: biological functions and commercial applications. *Mar. drugs*, v.9, n.3, p.319–333, 2011.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Produtos Naturais e Química Medicinal

PERFIL DESCRICIONAL DE LECTINAS DE RELEVANTE INTERESSE BIOLÓGICO A PARTIR DA ESPÉCIE *Microgramma vacciniifolia*

R. R. V. ALVES¹, R. S. ROLDAN-FILHO², L. M. B. VILELA², T. H. NAPOLEÃO¹, A. M. BENKO-ISEPPON² e P. M. G. PAIVA¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica;

² Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Genética;

E-mail para contato: robson.raion@gmail.com

RESUMO – A *Microgramma vacciniifolia* é uma espécie bastante explorada na medicina popular. Lectinas são proteínas que apresentam domínios de reconhecimento de carboidratos com aplicações médicas e biotecnológicas. O objetivo do trabalho foi realizar um levantamento de atividades de MvRL e MvFL relevantes à saúde humana. Com isso, foram compiladas publicações com as palavras chaves “lectina”, “*Microgramma vacciniifolia*”, “fungos”, “bactérias”, “linhagens celulares de câncer”, “células imunológicas” e “dosagem de citocinas” nas bases de dados do ScienceDirect, SciELO e Google Acadêmico. A MvRL apresentou atividade inseticida contra *Nasutitermes corniger* e *Sitophilus zeamais*, antifúngica contra *Fusarium oxysporum*, moluscicida contra *Biomphalaria glabrata* e citotóxica para linhagem NCI-H292. Para MvFL, foi observado potencial imunomodulatório ao induzir em células mononucleadas do sangue periférico humano (PBMc) o aumento da produção do óxido nítrico e de citocinas. Ambas lectinas não se mostraram tóxicas contra PBMcs. A revisão bibliográfica revelou aplicações importantes dessas lectinas para a saúde humana. Sinais induzidos pela MvFL podem ser importantes em processos inflamatórios e imunorregulatórios. Para MvRL, a afinidade pelos carboidratos manose e quitina associada a outras atividades biológicas revelam seu potencial antifúngico, antitumoral e moluscicida. O potencial inseticida de MvRL pode ser promissor em testes futuros contra vetores de arboviroses e parasitas.

Palavras-chave: Atividade imunomodulatória; Antimicrobiano; Inseticida.

ABSTRACT – *Microgramma vacciniifolia* is a species widely explored in popular medicine. Lectins are proteins with carbohydrate recognition domains, which have a wide variety of medical and biotechnological applications. The objective of the work was to carry out a survey of activities of MvRL and MvFL relevant to human health. Therefore, publications with the keywords “lectin”, “*Microgramma vacciniifolia*”, “fungi”, “bacteria”, “cancer cell lines”, “immune cells” and “cytokine dosage” were compiled in the ScienceDirect, SciELO and Google Scholar databases. MvRL showed insecticidal activity against *Nasutitermes corniger* and *Sitophilus zeamais*,



antifungal against Fusarium oxysporum, molluscicide against Biomphalaria glabrata and cytotoxic against to lineage NCI-H292. For MvFL, an immunomodulatory potential was observed by inducing increased production of nitric oxide (NO) and cytokines from human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Both lectins were not toxic against PBMCs. The bibliographic review revealed important applications of these lectins for human health. MvFL-induced signals may be important in inflammatory and immunoregulatory processes. In the case of MvRL, its affinity for mannose and chitin associated with other biological activities, reveal its potential uses such as antifungal, antitumor and molluscicidal. The insecticidal potential of MvRL may be promising in future tests against vectors of arboviruses and parasites.

Keywords: Immunomodulatory activity; Antimicrobial; Insecticide.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais para a manutenção da saúde é um recurso bastante antigo, onde grande parte dos conhecimentos sobre a utilização é advindo do conhecimento popular (Araújo et al., 2011; Nóbrega et al., 2017; Gonçalves et al., 2018). Tendo em vista que as propriedades medicinais são efeitos de biomoléculas ativas que geram benefício ao ser humano, as informações a respeito da medicina tradicional alcançaram a atenção através de pesquisas voltadas na prospecção desses compostos (Benko-Iseppon e Crovella, 2010).

Microgramma é um gênero vegetal americano, pertencente à família Polypodiaceae, que inclui cerca de 13 espécies epífitas que podem ser encontradas frequentemente ao longo de rios e riachos (Bataghin et al., 2017). O gênero apresenta raízes superficiais que se espalham pelas cascas das árvores e arbustos, consumindo a matéria orgânica disponível. A espécie *M. vacciniifolia* é popularmente conhecida como erva-silveira, cipó-cabeludo ou cipó-peludo e pode ser encontrada como corticícola e/ou rupícola com rizoma longo e intensamente revestido por escamas e folhas/fronde dimorfas. Preparações com *M. vacciniifolia* são popularmente recomendadas para tratar hemorragias, expectorações, diarreias, disenterias e cólicas intestinais (Albuquerque et al., 2014a; Ferreira et al., 2020; Nunes et al., 2020; Siqueira et al., 2020).

Estudos fitoquímicos descreveram a presença de taninos hidrolisáveis, flavonoides, derivados cinâmicos, saponinas, terpenos, esteroides e açúcares redutores no extrato salino do rizoma (Ferreira et al., 2020). No rizoma também foi identificada uma lectina (MvRL) que hemaglutinam os eritrócitos humanos e de coelho (Albuquerque et al., 2012) e apresenta atividade antifúngica, inseticida e antitumoral (Albuquerque et al., 2014). Na fronde, encontramos a MvFL, uma lectina de caráter multifuncional, que desempenha atividade lectínica e inibidora de tripsina e é capaz de estimular respostas imunomoduladoras (Patriota et al., 2017). O objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica sobre as atividades antimicrobianas, antitumoral, imunomoduladora e inseticida de lectinas obtidas do rizoma e da fronde de *M. vacciniifolia*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho utilizou abordagem qualitativa, com enfoque bibliográfico e descritivo, com o objetivo de reunir os dados publicados sobre atividade antimicrobiana, antitumoral e imunomoduladora de *M. vacciniifolia*. A busca eletrônica da literatura foi realizada em bases de dados de referência: ScienceDirect, SciELO e Google Acadêmico. Os descritores usados para a pesquisa foram: *Microgramma vacciniifolia*, lectinas, fungos, bactérias, linhagens celulares de câncer, células imunológicas e dosagem de citocinas. Como critério de seleção, foram utilizados



estudos que abordaram preparações obtidas a partir de *M. vacciniifolia* como potencial agente antimicrobiano, antitumoral, imunomodulador e inseticida.

Nosso foco foi mostrar que os diferentes tecidos da *M. vacciniifolia* (rizoma e folhas) apresentam atividade contra fungos e bactérias, insetos, linhagens celulares de câncer e produção de citocinas e para isso utilizamos uma associação dos descritores mencionados. Utilizamos artigos disponíveis na internet nos últimos 10 anos. Um total de 5 referências foram analisadas e compõem os resultados. Um painel da atividade biológicas foi produzido (Tabela 1).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A lectina do rizoma de *Microgramma vacciniifolia* (MvRL) é uma glicoproteína ligante de manose e quitina que apresenta massa molecular de aproximadamente 17 KDa (Albuquerque et al., 2012). Em ensaios de toxicidade, foi visto que MvRL foi letal para o crustáceo *Artemia salina* (espécie utilizada em testes indicadores sobre potencial farmacológico), onde a concentração letal necessária para matar 50% dos crustáceos (CL₅₀) foi igual a 159,9 µg.mL⁻¹ (Albuquerque et al., 2014a). No entanto, MvRL não se mostrou citotóxica para células mononucleadas do sangue periférico (PBMCs) humano nas concentrações testadas (IC₅₀ > 100 µg.mL⁻¹). Para linhagens de células do carcinoma mucoepidermóide do pulmão (NCI-H292), a MvRL reduziu a viabilidade da metade das células na concentração de 25,23 ± 1,72 µg.mL⁻¹. A ausência de toxicidade em células normais nas concentrações testadas revela que a MvRL foi um agente citotóxico seletivo contra linhagens tumorais (Albuquerque et al., 2014a).

Tabela 1 - Atividades biológicas das lectinas do rizoma e da fronde de *Microgramma vacciniifolia*

Preparações	Atividade Biológica	Espécie/Linhagem	Autores
Lectina (MvRL)	Toxicidade	<i>Artemia salina</i>	Albuquerque et al. (2014a)
	Não tóxica	Células mononucleadas do sangue periférico	Albuquerque et al. (2014a)
	Citotoxicidade	Carcinoma mucoepidermóide do pulmão (NCI-H292)	Albuquerque et al. (2014a)
	Antifúngica	<i>Fusarium oxysporum</i>	Albuquerque et al. (2014b)
	Inseticida	<i>Nasutitermes corniger</i>	Albuquerque et al. (2012)
	Inseticida	<i>Sitophilus zeamais</i>	Albuquerque et al. (2020)
	Moluscicida	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Albuquerque et al. (2014a)
Lectina (MvFL)	Não tóxica	Células mononucleadas do sangue periférico	Patriota et al. (2017)
	Imunomodulação	Células mononucleadas do sangue periférico	Patriota et al. (2017)

MvRL também apresentou atividade fungicida contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* com inibição de crescimento de 45 a 61% (pelo método de difusão em disco) (Albuquerque et al., 2014b). Os autores relacionaram a ação antifúngica com a capacidade da lectina se ligar à β-quitina da parede celular da hifa jovem, resultando no distúrbio da polaridade celular, inibição do crescimento e baixa absorção de nutrientes (Albuquerque et al., 2014b).

Na atividade inseticida contra térmitas *Nasutitermes corniger*, as concentrações 0,13 mg.mL⁻¹ e 0,085 mg.mL⁻¹ de MvRL foi capaz de matar 50% dos operários e soldados,



respectivamente (Albuquerque et al., 2012). A propriedade de inibição, estimulação ou desregulação de enzimas de MvRL dificulta a digestão e absorção de aminoácidos essenciais e junto a ação antimicrobiana de bactérias simbióticas do trato digestivo das térmitas, são alguns dos fatores responsáveis pela ação inseticida (Albuquerque et al., 2012; Napoleão et al., 2011). MvRL, incorporada nas dietas artificiais para *S. zeamais*, em concentrações variando de 10 a 130 mg.g⁻¹, não aumentou as taxas de mortalidade, mas prejudicou o estado nutricional dos insetos. MvRL inibiu as atividades *in vitro* das enzimas digestivas β -glucosidase e da α -amilase (Albuquerque et al., 2020). A sugestão do mecanismo de ação inseticida junto a sua afinidade por quitina, tornam a MvRL promissora em trabalhos futuros no controle de vetores de arboviroses e parasitas, como *A. aegypti* (transmissor do vírus da dengue, zika e da febre Chikungunya) e *L. longipalpis* (transmissor da leishmaniose).

Em relação a atividade moluscicida contra *B. glabrata* (hospedeiro da *S. mansoni*), os embriões na presença de MvRL entre 10 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ morreram ou apresentaram malformações e atrasos no desenvolvimento (Albuquerque et al., 2014a).

A lectina de frondes de *M. vacciniifolia* (MvFL) é uma glicoproteína oligomérica de massa molecular nativa 54 KDa, constituída por três subunidades de massas moleculares 20,8, 17,1 e 14,4 KDa. Apresenta caráter aniônico (pI 4,51) e resíduos de glicose e/ou manose MvFL apresenta um caráter multifuncional e desempenha atividade lectínica e inibidora de tripsina (Patriota et al., 2017).

MvFL, em concentrações de até 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ não demonstrou ser tóxica contra PBMCs humanos (Patriota et al., 2017). Em uma concentração não tóxica de 12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em cultura de células de PBMCs, a lectina aumentou a produção das citocinas pro-inflamatórias: fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon-gama (IFN- γ) e interleucina 6 (IL-6). Essas citocinas promovem a inflamação sistêmica pela indução de febre, resposta de fase aguda e ativação de macrófagos, neutrófilos e células T CD8⁺ (ativação e diferenciação) (Patriota et al., 2017). Outras respostas imunomodulatórias foram observadas por Patriota et al. (2017), como a produção em altos níveis de óxido nítrico (NO), responsáveis pela regulação positiva do IFN- γ , e IL-10 que afeta a imunorregulação e a inflamação.

4. CONCLUSÃO

A partir do levantamento teórico descrito na literatura, as lectinas mais promissoras de *M. vacciniifolia*, de acordo com estudos realizados até o momento, foram as MvRL e MvFL, por apresentarem atividades antifúngica, inseticida, moluscicida, imunomoduladora e citotóxica para linhagem tumoral em concentrações não tóxicas para PBMCs humanos. Estudos futuros podem ser explorados para avaliação *in vivo* das ações antitumorais e imunomoduladoras, como também investigação do potencial da MvRL contra insetos vetores de arboviroses e parasitas, uma vez que apresenta domínio de reconhecimento de quitina (carboidrato presente nos insetos) e foi observado ação inseticida.

5. REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, L.P.; SANTANA, G.M.S.; PONTUAL, E.V.; NAPOLEÃO, T.H.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G. Effect of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on survival and digestive enzymes of *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae). *International biodeterioration & biodegradation*, v. 75, p. 158-166, 2012.
- ALBUQUERQUE, L.P.; PONTUAL, E.V.; SANTANA, G.M.S.; SILVA, L.R.S.; AGUIAR, J.S.; COELHO, L.C.B.B.; RÊGO, M.J.B.M.; PITTA, M.G.R.; SILVA, T.G.; MELO, A.M.M.A.;



- NAPOLEÃO, T.H.; PAIVA, P.M.G. Toxic effects of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on *Artemia salina*, human cells, and the schistosomiasis vector *Biomphalaria glabrata*. *Acta tropica*, v. 138, p. 23-27, 2014a
- ALBUQUERQUE, L.P.; SANTANA, G.M.S.; NAPOLEÃO, T.H.; COELHO, L.C.B.B.; SILVA, M.V.; PAIVA, P.M.G. Antifungal activity of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on genetically distinct *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici races. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 172, n. 2, p. 1098-1105, 2014b
- ALBUQUERQUE, L.P.; PROCÓPIO, T.F.; GUEDES, C.C.S.; PONTUAL, E.V.; PAIVA, P.M.G.; NAPOLEÃO, T.H. Antinutritional effects of the chitin-binding lectin from *Microgramma vacciniifolia* rhizome (MvRL) on *Sitophilus zeamais*. *Journal of Stored Products Research*, v. 88, 101652, 2020.
- ARAÚJO, R.M.S.; VAZ, A.F.M.; AGUIAR, J.S.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G.; MELO, N.M.M.; SILVA, T.G.; CORREIA, M.T.S. Lectin from *Crataeva tapia* bark exerts antitumor, anti-inflammatory and analgesic activities. *Natural products and bioprospecting*, v. 1, n. 2, p. 97-100, 2011.
- BENKO-ISEPPON, A. M.; CROVELLA, S. Ethnobotanical Bioprospection of Candidates for Potential Antimicrobial Drugs from Brazilian Plants: State of Art and Perspectives. *Current Protein & Peptide Science*, v. 11, n. 3, p. 189–194, 1 maio 2010.
- BATAGHIN, F.A.; PIRES, J.S.R.; BARROS, F.D.; MÜLLER, A. Epífitas vasculares da Estação Ecológica Barreiro Rico, Anhembi, SP, Brasil: diversidade, abundância e estratificação vertical. *Hoehnea*, v. 44, n. 2, 172-183, 2017.
- FERREIRA, L.R.D.; SILVA, A.F.; SIQUEIRA, J.S.; SANTOS, R.C.; LIMA, V.S.; OLIVEIRA, A.M.; SILVA, G.C. Estudo do perfil fitoquímico e avaliação dos efeitos citotóxicos do rizoma da *Microgramma Vacciniifolia*/Study of the phytochemical profile and evaluation of the cytotoxic effects of *Microgramma Vacciniifolia*'s Rhizome. *Brazilian Journal of Health Review*, v. 3, n. 1, 1185-1202, 2020.
- GONÇALVES, R.N.; GONÇALVES, J.R.D.S.N.; BUFFON, M.D.C.M.; NEGRELLE, R.R.B. Plantas medicinais: relacionando conhecimento popular e científico na atenção primária à saúde. *Visão Acadêmica*, v. 18, n. 4, 2018.
- NAPOLEÃO, T.H.; GOMES, F.S.; LIMA, T.A.; SANTOS, N.D.; SÁ, R.A.; ALBUQUERQUE, A.C.; PAIVA, P.M.G. Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 65, n. 1, 52-59, 2011.
- NÓBREGA, J.S.; SILVA, F.D.A.; BARROSO, R F.; CRISPIM, D.L.; OLIVEIRA, C.J.A. Avaliação do conhecimento etnobotânico e popular sobre o uso de plantas medicinais junto a alunos de graduação. *Revista Brasileira de Gestão Ambiental*, v. 11, n. 1, 07-13, 2017.
- NUNES, J.V.N.; CONCEIÇÃO-SANTOS, R.; MACIEL, L.H.; SILVA, R.E.; SILVA-LIMA, V.; RAMOS, M.L.H.; SILVA, G.C. Aspectos biológicos e terapêuticos do gênero *Microgramma*, família Polypodiaceae. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 7, 50403-50416, 2020.
- PATRIOTA, L.L.S.; PROCÓPIO, T.F.; BRITO, J.S.; SEBAG, V.; OLIVEIRA, A.P.S.; SOARES, A. K.A.; PAIVA, P.M.G.; NAPOLEÃO, T.H. *Microgramma vacciniifolia* (Polypodiaceae) fronds contain a multifunctional lectin with immunomodulatory properties on human cells. *International journal of biological macromolecules*, v. 103, 36-46, 2017.
- SIQUEIRA, J.S.; FERREIRA, L.R.D.; SILVA LIMA, V.; CONCEIÇÃO SANTOS, R.; OLIVEIRA, A.M.; SOARES, L.A.L.; SILVA, G.C. Prospecção fitoquímica e avaliação dos potenciais citotóxico e antioxidante do extrato das folhas de *Microgramma*



vaccinnifolia/Phytochemical prospection and evaluation of the cytotoxic potentials and antioxidants of the *Microgramma vaccinnifolia* leaves extract. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 4, 20318-20331, 2020.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq, CAPES e FACEPE.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Produtos Naturais e Química Medicinal

AÇÃO ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum vulgare*: UMA REVISÃO DE LITERATURA

D. L. ARAÚJO¹, B. A. S. MACHADO² e J. L. de OLIVEIRA³

¹ Centro Universitário de Patos, Departamento de Radiologia;

² Centro Universitário Maurício de Nassau, Departamento de Radiologia;

³ Universidade Federal de Campina Grande, Departamento de Ciências Farmacêuticas.

E-mail para contato: daniel124.dl718@gmail.com

RESUMO – A medicina alternativa vem tentando utilizar meios naturais para o tratamento de infecções causadas por bactérias, diante desse contexto, é muito perceptível o grande interesse de agentes terapêuticos vindo de produtos naturais, mais especificadamente aqueles que são derivados de plantas. O objetivo desse trabalho é analisar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano através de uma revisão de literatura integrativa que utilizou nove artigos científicos que evidenciaram que o *Origanum vulgare* (orégano) tem sido usado como um elemento de pesquisas científicas em laboratórios como estratégia para inúmeros tipos de bactéria, onde foi comprovado o seu alto teor terapêutico e antimicrobiano. O óleo essencial de *O. vulgare* expõe uma gama variável de compostos ativos, onde os fenóis, como temos o exemplo do carvacrol e timol, possuem a capacidade de alcançar entre 80,2 e 98% da composição total do óleo. Diante disso, os compostos citados possuem atividade antimicrobiana, lesionando as membranas plasmáticas lipídicas, comprometendo a homeostase do pH e o equilíbrio de íons orgânicos, impedindo a divisão celular e causando desidratação nas células bacterianas.

Palavras-chave: Óleo Essencial, Concentração Inibitória Mínima, *Origanum Vulgare*, Atividade Antimicrobiana.

ABSTRACT - Alternative medicine has been trying to use natural means for the treatment of infections caused by bacteria. In this context, the great interest of therapeutic agents coming from natural products, more specifically those derived from plants, is very noticeable. The objective of this work is to analyze the antimicrobial activity of the essential oil of oregano through a review of integrative literature that used nine scientific articles that showed that *Origanum vulgare* (Oregano) has been used as an element of scientific research in laboratories as a strategy for numerous types of bacteria, where its high therapeutic and antimicrobial content has been proven. The essential oil of *O. vulgare* exposes a variable range of active compounds, where phenols, as we have the example of carvacrol and thymol, have the capacity to reach between 80.2 and 98% of the total composition of the oil. In view of this, the compounds mentioned have antimicrobial activity, damaging the lipidic plasma membranes, compromising the pH homeostasis and the



organic ion balance, preventing cell division and causing dehydration in bacterial cells.

Keywords: Essential Oil, Minimum Inhibitory Concentration, Origanum Vulgare, Antimicrobial Activity.

1. INTRODUÇÃO

O óleo essencial (OE) possui origem do metabolismo secundário de plantas, que neste contexto, pode ser extraído de suas flores, folhas, ramos, cascas, raízes e frutos. Nesse processo apresentam composições aromáticas voláteis (carvacrol, timol, eugenol, terpineno, linalol e carvona), que são os elementos fundamentais para que ocorra a ação antimicrobiana. Estas composições são preparadas para agir em diferenciados tipos de moléculas alvo e na funcionalidade das células bacterianas, para que dessa maneira possam acabar se tornando mecanismos antibacterianos, principalmente no que se diz respeito ao bloqueio da síntese de ácido nucléico, alterações nos sítios da membrana citoplasmática e em seu metabolismo energético (BARBOSA, 2015; DE SOUZA, 2019).

Origanum vulgare (orégano) é um dos condimentos mais utilizados no Brasil para o preparo de alimentos devido a sua alta capacidade de acrescentar sabor aos mesmos. É usado também para produção de óleo essencial tendo em vista suas propriedades antimicrobianas, pois possui os compostos carvacrol e timol, que podem agir e terem efeitos positivos contra alguns tipos de bactérias e fungos. O carvacrol, substância encontrada no óleo essencial de óregano (OEO), possui a capacidade de permeabilização da membrana citoplasmática microbiana, essa ação pode acabar causando uma perda de ATP. Isso tudo se deve pelo poder de interação com a membrana, no que pode se dissolver na bicamada lipídica, fazendo um tipo de alinhamento entre as cadeias de ácidos graxos (DA SILVA, 2010).

É importante salientar que o uso desses extratos naturais adquiridos através de plantas pode fornecer uma alternativa por serem na maioria das vezes de fácil obtenção, tanto na natureza quanto no laboratório, sua utilização apresenta características favoráveis no que se diz respeito ao custo e por normalmente não apresentarem efeitos adversos, genotóxicos e mutagênicos a seres humanos (LIMA et al., 2017).

Diante de tudo isto, o objetivo dessa pesquisa foi realizar uma revisão de literatura acerca da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum vulgare* (orégano).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para alcançar o objetivo, foi realizada uma revisão integrativa (RI) da literatura nacional e internacional com abordagem retrospectiva em plataformas virtuais que disponibilizam coleções selecionadas de periódicos científicos. Desenvolveu-se em etapas recomendadas por Carvalho (2018): identificação do tema e questão de pesquisa, análise de critérios para inclusão e exclusão de artigos científicos; informações a serem extraídas dos estudos selecionados; avaliação dos estudos incluídos; interpretação dos resultados e apresentação da síntese do conhecimento.

Foram selecionados artigos científicos nas plataformas virtuais de dados bibliográficos Google Acadêmico, Scielo, PubMed e Lilacs. As pesquisas destes foram realizadas no período de abril à junho do ano de 2020, de forma bastante criteriosa, através das seguintes perguntas norteadoras: O que é o óleo essencial de orégano, quais seus aspectos e quais os parâmetros da atividade antimicrobiana desenvolvida por ele?



A consulta à esses dados também fora realizada através de busca utilizando as seguintes terminologias cadastradas no DeCS: óleo essencial, concentração inibitória mínima, *Origanum vulgare* e ação antimicrobiana. Os artigos foram selecionados de acordo com o idioma em que o mesmo está escrito, onde optou-se por artigos nos idiomas inglês e português.

A princípio foram encontrados 45 artigos que contemplavam o tema em questão e que estavam de acordo com a proposta do estudo, porém foram selecionados 9 artigos após análise e aplicação dos seguintes critérios de inclusão e exclusão: foram selecionados artigos científicos que contemplavam o tema em questão, que estavam escritos nos seus diversos tipos de pesquisa correlacionados, casos clínicos ou relato de caso, estudo de coorte, pesquisa de campo, revisões de literatura e ensaios iconográficos, indexados as plataformas no período de 2015 a 2020. Foram excluídos os artigos que não estavam relacionados com o tema, publicados anteriormente ao ano de 2015, que não estavam escritos nos idiomas escolhidos, não continham abordagem quantitativa e qualitativa, além de terem sido duplicados em bases de dados divergentes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Alguns estudos acerca da ação antimicrobiana do óleo essencial de orégano já puderam confirmar a eficácia do método. Isso acontece por causa das aplicações de suas concentrações, puras ou associadas a outro tipo de extrato a colônias de bactérias resultados de estudos de alguns pesquisadores que desenvolvem pesquisas nesse parâmetro. O efeito inibitório para com as bactérias é consideravelmente significativo, chegando a atingir ($p \leq 0,05$) (ARAÚJO, 2016).

Pombo (2018) sugere em seu experimento que as bactérias Gram-positivas são mais sensíveis que as do tipo Gram-negativas ao óleo essencial. Isso acontece justamente pelo grau de complexidade estrutural da parede celular de bactérias Gram-negativas. Os autores também geram uma discussão em relação a utilização do óleo essencial de cravo, onde, ficou comprovado no estudo que as substâncias encontradas no orégano apresentam mais acurácia no que se diz respeito a atividade antimicrobiana em relação ao cravo.

A atividade antimicrobiana não se deve somente à presença das substâncias dos óleos essenciais, mas da presença de outros componentes em menores concentrações que podem promover dinâmicas sinérgicas, por exemplo, o p-cimeno não tem efeito antibacteriano se usado sozinho, mas quando combinado com carvacrol, facilita o transporte do carvacrol por meio da membrana citoplasmática para o interior da célula bacteriana (REIS, 2020; FIGUERÉDO, 2019).

4. CONCLUSÃO

Portanto, é perceptível a eficácia do óleo essencial como agente antimicrobiano já que o mesmo possui substâncias em sua composição interna capazes de tornar seu efeito inibitório na morfogênese das bactérias cada vez maior. Mas novos estudos são necessários tendo em vista a possibilidade de resistência de novas bactérias e microrganismos, bem como pesquisas que consigam desenvolver a correlação entre o óleo essencial e fármacos ocasionando assim no teor de potencialidade do OE com mais eficiência.

5. REFERÊNCIAS

ARAÚJO, Márcio Martins de; LONGO, Priscila Larcher. Teste da ação antibacteriana in vitro de óleo essencial comercial de *Origanum vulgare* (orégano) diante das cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 83, 2016.



BARBOSA, Lidiane Nunes et al. In vitro antibacterial and chemical properties of essential oils including native plants from Brazil against pathogenic and resistant bacteria. *J. of oleo science*, v. 64, n. 3, p. 289-298, 2015.

CARVALHO, João Francisco Sarno; PIMENTA, Carlos Alberto Máximo; DE OLIVEIRA, Silas Dorival. Entre a ciência e a complexidade dos novos objetos de pesquisa: a construção interdisciplinar de uma metodologia de pesquisa científica. *Educação, Cultura e Comunicação*, v. 9, n. 18, 2018.

DE SOUZA, Marina Andreia et al. *Métodos alternativos de controle microbiano*. 2019.

FIGUERÊDO, Juliana de Sousa. *Estudo fitoquímico e potencial biológico de Origanum vulgare (orégano)*. 2019.

LIMA, Dijaci Santos de et al. Estudo da atividade antibacteriana dos monoterpenos timol e carvacrol contra cepas de *Escherichia coli* produtoras de β -lactamases de amplo espectro. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 8, n. 1, p. 17-21, 2017.

POMBO, Joseane Cristina Pinheiro et al. Efeito antimicrobiano e sinérgico de óleos essenciais sobre bactérias contaminantes de alimentos. *Segurança Alimentar e Nutricional*, v. 25, n. 2, p. 108-117, 2018.

REIS, Juliana Borges et al. Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais contra patógenos alimentares/Evaluation of antimicrobial activity of essential oils against food pathogens. *Brazilian Journal of Health Review*, v. 3, n. 1, p. 342-363, 2020.

SILVA, Janine Passos Lima et al. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella Enteritidis*. *Food Science and Technology*, v. 30, p. 136-141, 2010.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Produtos Naturais e Química Medicinal

SÍNTESE E AVALIAÇÃO *IN SILICO* DE HÍBRIDO ACRIDÍNICO-TIAZOL FRENTE À PROTEASE TIPO 3C DO SARS-COV-2

L. L. LOCIO¹, A.P.S. NASCIMENTO², S.L. ALBINO³, R.O. MOURA⁴

¹ Universidade Estadual da Paraíba, Programa de pós graduação em Ciências Farmacêuticas.

² Universidade Estadual da Paraíba, Programa de pós graduação em Química.

³ Universidade Federal do Pernambuco, Programa de pós graduação em Inovação Terapêutica

⁴ Universidade Estadual da Paraíba, Departamento de Farmácia.

E-mail para contato: lucas_linhares10@hotmail.com

RESUMO – O SARS-COV-2 é um vírus que surgiu em Wuhan na China onde infectou 70.000 pessoas e matou mais de 1800 pessoas nos primeiros 50 dias do surto e levando ao óbito mais 608.420 humanos e infectou mais de 14.608.517 de indivíduos em todos continentes até a data de submissão desse artigo. Devido a essa alta incidência de infecção e o grande número de vítimas torna-se necessário a descoberta de um medicamento o mais rápido possível que seja eficaz contra esse vírus e que tenha pouca ou nenhuma toxicidade. Nesse sentido esse estudo tem o intuito de sintetizar e avaliar a capacidade de inibição o do SARS-COV-2 através de docking molecular de um híbrido tiazol-acridínica (LLAC02). Inicialmente o LLAC02 foi sintetizado pelo método convencional e elucidado através de técnicas espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono. Em seguida foi realizado o docking molecular com três alvos para protease tipo 3C (PDB ID: 6LU7, 5N5O e 6LO0). O composto proposto obteve energia de ligação mais negativa, maior capacidade inibição, que vários compostos como Cloroquina, Remdesvir.

Palavras Chaves: Acridina; Tiazol; Docking Molecular; Covid-19; SwissAdme.

ABSTRACT - SARS-COV-2 is a virus that emerged in Wuhan, China, infected 70,000 people and killed more than 1,800 people in the first 50 days of the outbreak and killed more than 608,420 humans and infected more than 14,608,517 individuals. on all continents until submission data for this article. Considering this high incidence of infection and the large number of threats it becomes necessary to discover a drug or as soon as possible that is effective against this virus and that has little or no toxicity. In this sense, this study aims to synthesize and evaluate the inhibition capacity of SARS-COV-2, through the molecular coupling of a hybrid acrylic thiazole (LLAC02). Initially, LLAC02 was synthesized by the conventional method and elucidated through infrared spectroscopy and hydrogen and carbon nuclear magnetic resonance techniques. Then, molecular

coupling was performed with three targets for the 3C protease (PDB ID: 6LU7, 5N5O and 6LO0). The proposed compound uses more negative binding energy, greater inhibitory capacity, than several compounds such as Chloroquine, Remdesvir.

Keywords: Acridine; Thiazole; Docking Molecular; Covid-19; SwissAdme.

1. INTRODUÇÃO

O SARS-CoV-2 é um vírus pertencente à família Coronaviridae e subfamília Coronavirinae, sendo causador da COVID-19, este apresenta uma fita de RNA no seu interior e picos glicoproteicos que se projetam a partir de envelopes virais e assim exibindo uma aparência de coroa. Atualmente sabe-se que esse vírus surgiu em dezembro de 2019 no centro comercial de Wuhan na China onde infectou 70.000 pessoas e matou mais de 1800 pessoas nos primeiros 50 dias do surto e levando ao óbito mais 608.420 humanos e infectou mais de 14.608.517 de indivíduos em todos continentes até a data de submissão desse artigo. (Mothay; Ramesh, 2020; Vall *et al.*, 2020; WHO, 2020).

A COVID-19 começa a apresentar sintomas como febre, tosse, fadiga, cefaleia logo após 5 dias de infecção e tende a evoluir rapidamente para pneumonia, síndrome do desconforto respiratório agudo, lesão cardíaca aguda que pode gerar a morte, a depender da idade do paciente e do seu status imunológico, entre 6 a 41 dias após a infecção (ROTHANA, BYRAREDDY 2020).

Devido a essa alta incidência de infecção e o grande número de vítimas torna-se necessário a descoberta de um medicamento o mais rápido possível que seja eficaz contra a COVID-19 e que tenha pouca ou nenhuma toxicidade. Nessa perspectiva o uso de ferramentas *in silico* como o docking molecular surge como triagem para obter compostos promissores para serem testados *in vitro* e posteriormente *in vivo*.

Nesse sentido esse estudo tem o intuito de planejar, sintetizar, elucidar estruturalmente e avaliar a capacidade de inibição do SARS-COV-2 através de docking molecular de um híbrido tiazol-acridínica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente foi realizado a síntese do LLAC02 por meio de uma reação de substituição nucleofílica no aromático do núcleo 2-amino-tiazol com a 9-cloro-acridina em dimetilformamida (DMF) e ácido clorídrico (HCl), a 100°C. Composto final foi elucidado utilizando espectrofotometria de infravermelho e ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C.

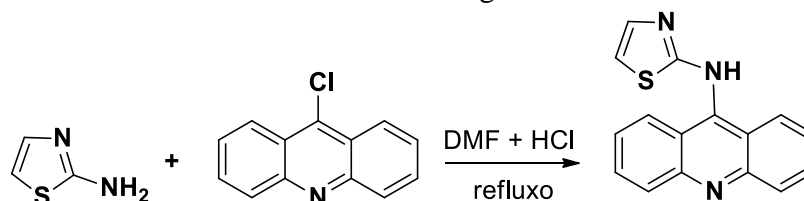


Figura 1 – Esquema reacional para a obtenção do LLAC02

A capacidade inibitória *in silico* do composto sintetizado pode ser realizada através do *docking molecular*, para três diferentes alvos de COVID-19 protease do tipo 3C, a primeira com



PDB ID de 6LU7, sendo testado nas coordenadas x,y,z de -9,732; 11,403; 68,925. A segunda de PDB ID 5N50 foi testada em x,y,z de -23,005; 1,142; 1,896. Por fim, o terceiro de PDB ID 6LO0 foi testado nas coordenadas -22,697; -15,254; 3,457, todos os alvos possuíam Gridbox de dimensão 40x40x40Å. As macromoléculas foram retiradas da plataforma Protein Data Bank, tratadas pelo software EduPymol onde foi retirado a água e os ligantes e preservados. A moléculas testada foi desenhada usando o ChemDraw 12.0 e a análise conformacional através do cálculo de mecânica molecular mínima e dinâmica para se obter a conformação com menor energia empregando o Chem3D 12.0. O *docking* molecular dos compostos foi realizado através do *software* AutoDock Tools 1.5.6 combinado com as ferramentas Autodock 4.2 e Autogrid 4.2. As predições farmacocinéticas foram realizadas pela plataforma Swissadme.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A síntese do *N*-(acridin-9-il)tiazol-2-amina (LLAC02) mostrou-se satisfatória tendo rendimento de 57,78%, a cromatografia em camada analítica delgada mostrou que o composto apresentava um bom grau de pureza com apenas resquícios de acridona (impureza comum nas acridinas) e fator de retenção de 0,60 na fase móvel 7:3 (hexano : acetato de etila).

A Tabela 1 mostra os valores de absorvância do espectro de infravermelho do LLAC02. Primeiramente, observa-se uma banda de intensidade baixa na região de 3200 cm⁻¹ o qual é sugestiva de amina secundária, em seguida se observou deformações axiais de C-H de aromático de média intensidades entre 3092 e 3000 cm⁻¹, assim como a presença deformações axiais de C=C de aromático nas regiões de 1590 a 1462 cm⁻¹, sendo essas bandas de aromáticos já esperadas na estrutura proposta. A banda de absorvância 1626 cm⁻¹ de grupo funcional imina (C=N), além disso a presença de uma banda na região de 1348 cm⁻¹ de ligação do tipo C-N e deformação axial de baixa intensidade de ligação C-S na região 700 cm⁻¹ que pode estar associada a porção tiazol da estrutura.

Tabela 1– Tabela com valores de absorvância encontrados no espectro de infravermelho do LLAC02

Absorvância de Referência	Absorvância Visualizada	Grupamento Funcional
3.450 a 3100 cm ⁻¹	3200 cm ⁻¹	Amina secundária
3100cm ⁻¹ a 3000 cm ⁻¹	3092 cm ⁻¹	C-H de aromático
1690 – 1630 cm ⁻¹	1626 cm ⁻¹	Ligação C=N
1600 – 1450 cm ⁻¹	1590 a 1462 cm ⁻¹	Ligação C=C de aromático
1500 – 1000 cm ⁻¹	1348 cm ⁻¹	Ligação C-N
700-600 cm ⁻¹	700 cm ⁻¹	Ligação C-S

Fonte: Elaborado pelo autor.

A Tabela 2 indica os deslocamentos químico do RMN ¹H e RMN ¹³C mostrando que a estrutura proposta foi alcançada visto que apresentou picos sugestivos da presença de amina secundária, a porção acridínica, a porção tiazol assim como se observa que ocorreu duplicidade dos picos, provavelmente associado à presença de dois rotâmetros do composto LLAC02 que estão em equilíbrio, representadas na Figura 2. A presença de rotâmetros deve-se ao fato dessa molécula não conseguir completar o giro sobre o próprio eixo. Acredita-se que isso ocorra devido a impedimento estérico, ou seja, ao choque entre o orbital do nitrogênio imínico da porção tiazol

com o orbital do hidrogênio, mais próximo, da porção acridínica, e assim o tendo uma rotação de 180°. Sendo necessária uma análise de RMN bidimensional para uma conclusão mais concreta.

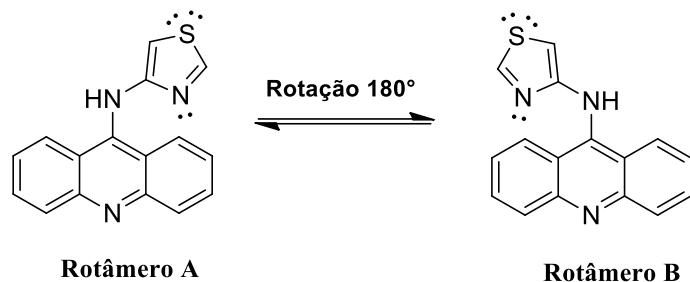


Figura 2– Representação de rotâmetria do LLAC02

Tabela 2 – Tabela com valores de deslocamento químico encontrados no espectro de ressonância magnética de hidrogênio e carbono do LLAC02

RMN ¹ H			RMN ¹³ C
N-H (δ , ppm)	Acridínico (δ , ppm)	Tiazol (δ , ppm)	Aromáticos (δ , ppm)
11,74 (s, 1H).	8,24 (m, 2H); 7,72 (m, 2H); 8,02 (m, 4H).	7,63 (m, 2H).	163,81; 156,11; 141,35; 141,35; 141,20; 140,27; 137,99; 133,92; 133,21; 129,12; 127,12; 126,47; 121,60; 121,47; 120,95; 117,97; 117,79; 117,30

Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a síntese e elucidação estrutural foi realizado o estudo de ancoragem molecular com as três macromoléculas que representam a protease tipo 3C (PDB ID: 6LU7, 5N5O e 6LO0). Essa enzima é capaz de clivar cataliticamente uma ligação peptídica entre uma glutamina na posição P1 e um pequeno aminoácido (serina, alanina ou glicina) e assim inibir A protease é importante no processo de replicação desse coronavírusO SARS-COV-2. A Figura 3 mostra que as interações do tipo hidrofóbica (pi-sigma, pi-pi em T, pi-alkil) principalmente nos resíduos de aminoácidos MET 165 e MET 45 assim como pontes sulfeto associado aos resíduos CYS 44 e HIS 44 são as que mais presente nas três macromoléculas.

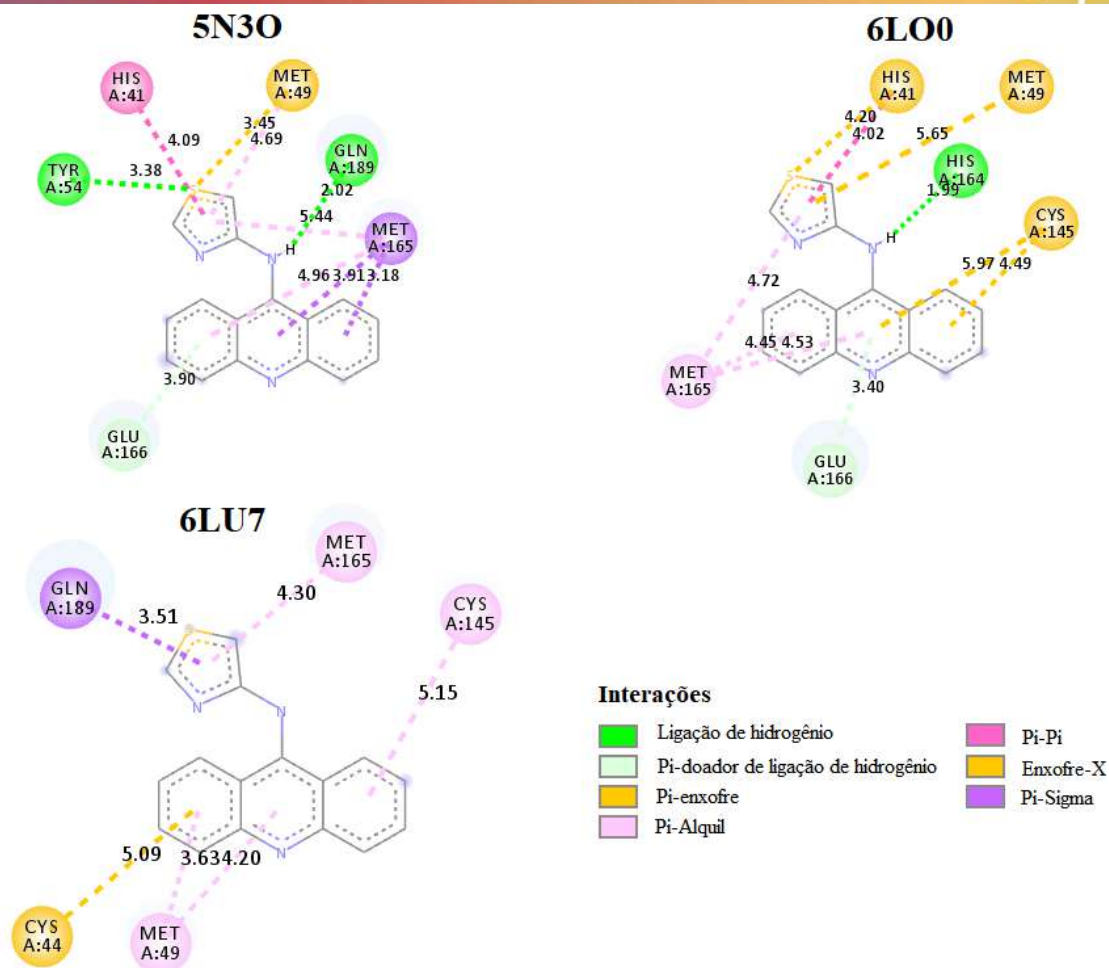
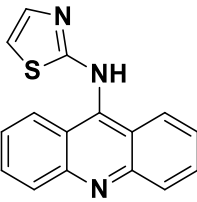


Figura 3 – Interação do composto proposto com os resíduos dos respectivos aminoácidos.

Tabela 3 – Resultados de *Docking* molecular

Estrutura	LLAC02			Ligante co-cristalizado			
	Código do Alvo	ΔG (Kcal. mol ⁻¹)	Ki (nM)	Composto	ΔG (Kcal. mol ⁻¹)	Ki (nM)	RMSD (Å)
	6LU7	-8,38	718,08	PRD_00221 4	-10,88	10,64	1,77
	5N50	-8,37	738,16	8O5	-10,39	24,16	3,03
	6LO0	-8,67	444,38	70N	-9,10	214,03	1,30

Fonte: Elaborado pelo autor.



Os resultados de ancoragem molecular ilustrados na Tabela 2 demonstraram que o composto proposto teve energia de ligação variando de -8,38 a -8,67 Kcal. mol⁻¹ para as três diferentes Protease tipo 3C tendo esse resultado melhor que a Cloroquina ($\Delta G = -3,90$ Kcal. mol⁻¹), Luteolina ($\Delta G = -5,40$ Kcal. mol⁻¹), Remdesvir ($\Delta G = 3,60$ Kcal. mol⁻¹) aos quais foram avaliados pelos pesquisadores YU et al. (2020) utilizando metodologia parecida e usando o alvo PDB ID 6LU7. A molécula proposta também teve maior atividade de inibição do que a Berberine ($\Delta G = -7,91$), Cafeína ($\Delta G = -4,52$), Capsaicin ($\Delta G = -5,51$ Kcal. mol⁻¹), Embelina ($\Delta G = -4,94$ Kcal. mol⁻¹), Emodin ($\Delta G = -6,49$ Kcal. mol⁻¹), Gossipol ($\Delta G = -6,29$ Kcal. mol⁻¹), Luteolina ($\Delta G = -6,89$ Kcal. mol⁻¹) e Sanguinarina ($\Delta G = -7,72$ Kcal. mol⁻¹) que Jain et al., 2020 testou para o alvo PDB ID 6LU7. Porém tiveram energia de ligação menor do que os compostos co-cristalizados e teve constante de inibição relativamente alta e indica que o composto pode ficar num estado dissociado mais tempo que associado com a enzima (PAN et al., 2013).

A análise do composto por meio da plataforma on-line SwissADME mostrou que o LLAC02 pode apresentar alta absorção intestinal, sugerindo a possibilidade de ser administrado por via oral e não violou nenhuma regra dos 5 Linspi, que é um parâmetro que sugere que o composto pode ter absorção, distribuição, metabolismo e excreção desejável. Assim como a análise sugeriu que a molécula de interesse pode ter ação no sistema nervoso central pois é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e assim inibir o SARS-COV-2 nessa região.

4. CONCLUSÃO

O composto proposto foi sintetizado com rendimento satisfatório e sua estrutura pode ser comprovada por meio dos RMN de ¹H e ¹³C além do espectro de infravermelho. De acordo com a avaliação *in silico* no presente estudo e a comparação com trabalhos previamente publicados pode-se observar que o LLAC02, se destacou em termos energéticos em relação aos fármacos comerciais, dentre eles a bastante discutida Cloroquina, entretanto não apresentou melhor energia que o ligante co-cristalizado em nenhum dos alvos aqui avaliado. As predições farmacocinéticas indicam a possibilidade de administração do composto por via oral facilitando o uso.

5. REFERÊNCIAS

- MOTHAY, D; RAMESH, K. V. Binding site analysis of potential protease inhibitors of COVID-19 using AutoDock. *Virus Disease*, v.1, n. 2, p.194–199, 2020.
- PAN, A. C., BORHANI, D. W., DROR, R. O., SHAW, D. E. Molecular determinants of drug–receptor binding kinetics. *Drug discovery today*, v. 18, n. 13-14, p. 667-673, 2013.
- ROTHAN, H. A; BYRAREDDY, S. N. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *Journal of autoimmunity*, p.102433. 2020
- VALLS, J; TOBÍAS, A; SATORRA, P; TEBÉ, C; (2020). COVID19-Tracker: una aplicación Shiny para analizar datos de la epidemia de SARS-CoV-2 en España. *Gaceta Sanitaria*. p.3. 2020.
- World Health Organization (WHO), “Novel Coronavirus (2019-nCoV),” WHO Bull., no. JULY, p. 1–7, 2020.
- YU, R., CHEN, L., LAN, R., SHEN, R., LI, P. Computational screening of antagonist against the SARS-CoV-2 (COVID-19) coronavirus by molecular docking. *International Journal of Antimicrobial Agents*, p.106012, 2020.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Produtos Naturais e Química Medicinal

PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO CAROTENOIDES POR *Rhodotorula glutinis* URM6692 E SEU POTENCIAL NUTRACÊUTICO

S. R. S. SILVA¹, B. A. M. COSTA¹, V. M. OLIVEIRA¹ e A. L. F. PORTO¹

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Laboratório de Tecnologia de Produtos Bioativos, LABTECBIO.

E-mail para contato: analuporto@yahoo.com.br

RESUMO – Carotenóides são pigmentos lipídicos que apresentam propriedades biológicas muitas vezes requeridas para auxiliar no bem-estar do organismo. Esses pigmentos podem ser obtidos de inúmeras fontes (vegetais, animais, microbianas). Leveduras têm sido reportadas como uma fonte promissora para a produção e extração desses pigmentos. Assim, este trabalho objetivou produzir e extrair carotenóides de *Rhodotorula glutinis* URM6692 cultivada em soro de queijo coalho (SQC) e avaliar seu potencial nutraceutico através de ensaios antimicrobianos. A biomassa de *R. glutinis* URM6692 foi produzida a partir do cultivo em SQC, realizado a 30°C, 200 rpm e pH 5.5 durante 24 horas e dela, os pigmentos foram extraídos, concentrados, quantificados e avaliados *in vitro* quanto à eficácia de sua propriedade antimicrobiana. No ensaio antimicrobiano, o extrato concentrado de pigmentos (5,0 µg/mL) foi capaz de inibir duas espécies de bactérias patogênicas (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*). O efeito inibitório foi mais efetivo em *E. coli* ATCC 25922, com um percentual de inibição médio de 63,2%, enquanto a de *S. aureus* ATCC6538 foi de 56,5%. Esses resultados sugerem que os pigmentos carotenóides produzidos e extraídos de *R. glutinis* URM6692 podem, possivelmente, ser empregados em alimentos, cosméticos e fármacos como uma alternativa natural aos corantes e conservantes quimicamente sintetizados, bem como servir de fonte alternativa de pigmentos com funções biológicas no âmbito nutraceutico.

Palavras-chave: biomedicina, biotecnologia, leveduras, pigmentos.

ABSTRACT – Carotenoids are lipid pigments that have biological properties that are often required to assist in the well-being of the body. These pigments can be obtained from numerous sources (plant, animal, microbial). Yeasts have been reported as a promising source for the production and extraction of these pigments. Thus, this work aimed to produce and extract carotenoids from *Rhodotorula glutinis* URM6692 grown in rennet cheese whey (SQC) and to evaluate its nutraceutical potential through antimicrobial assays. The biomass of *R. glutinis* URM6692 was produced from cultivation in SQC, carried out at 30°C, 200 rpm and pH 5.5 for 24 hours and from it, the pigments were extracted, concentrated, quantified and evaluated *in vitro* for



the effectiveness of its antimicrobial property. In the antimicrobial assay, the concentrated pigment extract (5.0 µg/mL) was able to inhibit two species of pathogenic bacteria (Escherichia coli and Staphylococcus aureus). The inhibitory effect was more effective in E. coli ATCC 25922, with an average inhibition percentage of 63.2%, while that of S. aureus ATCC6538 was 56.5%. These results suggest that the carotenoid pigments produced and extracted from R. glutinis URM6692 can possibly be used in foods, cosmetics and drugs as a natural alternative to chemically synthesized dyes and preservatives, as well as serving as an alternative source of pigments with biological functions. nutraceutical scope.

Keywords: *biomedicine, biotechnology, yeasts, pigments.*

1. INTRODUÇÃO

A preocupação com o meio ambiente aliada a busca por uma melhor qualidade de vida têm sido temas importantes e amplamente considerados na produção em larga escala de alimentos saudáveis, com propriedades nutricionais e bioativas. Recentemente, as tendências de consumo consciente, ético e sustentável têm sido cada vez mais valorizadas e consideradas pela indústria na elaboração de seus produtos (Angus; Westbrook, 2019).

O comportamento derivado dessa tendência de consumo afeta diretamente na escolha dos alimentos a serem consumidos, considerando os benefícios proporcionados ao organismo. Substâncias intencionalmente adicionadas aos alimentos, com ou sem valor nutricional, que não atuam de forma isolada como um nutriente ou um alimento propriamente dito são considerados aditivos alimentares. Sob esta perspectiva, o uso de substâncias naturais capazes de agregar propriedades biológicas aos alimentos com a intenção de melhorar, ressaltar e/ou preservar suas propriedades organolépticas, em detrimento daquelas quimicamente sintetizadas, tem sido fortemente encorajado (FDA/WHO, 2016).

De fontes vegetais, animais e/ou microbianas, os aditivos alimentares podem contribuir para a melhoria dos aspectos tecnológicos dos alimentos, especialmente quando adicionados em quantidades adequadas respeitando as doses diárias recomendadas (ADIs). Por exemplo, os carotenoides que além de colorir os alimentos, podem apresentar propriedades nutricionais e farmacológicas, como atividades pró-vitamina A, antioxidante, antimicrobiana, antiproliferativo, antitumoral, antihemolítico, entre outras (Mata-Gómez *et al.*, 2014; Inetianbor *et al.*, 2015; Raddadi *et al.*, 2015; Hou; Cui, 2018). Influenciado pelas pesquisas relacionadas com a otimização da produção de carotenoides assim como às frequentes descobertas dos benefícios inerentes a eles, em 2017 o mercado global de pigmentos movimentou US\$ 1,5 bilhões de dólares, e a tendência é que este volume de recursos cresça anualmente, de modo que em 2022 espera-se que este mercado chegue a US\$ 2,0 bilhões (BCC RESEARCH, 2018).

Dentre as fontes microbianas mais utilizadas para a obtenção desses pigmentos, estão as leveduras do gênero *Rhodotorula* que são capazes de converter nutrientes de resíduos agroindustriais, como o soro de queijo, em carotenoides. A natureza líquida, rico teor nutricional e a grande disponibilidade deste subproduto da indústria de laticínios, tornam-no um meio plenamente adequado ao cultivo de microrganismos, permitindo que rendimentos consideráveis de carotenoides sejam obtidos ao ser empregado em cultivos submersos. A biomassa da levedura rica em carotenoides é então submetida a processos físico-químicos para a extração dos pigmentos, que posteriormente são purificados e veiculados para as indústrias alimentícia, farmacêutica, de beleza e de cuidados com a saúde (Cheng; Yang, 2016; Kot *et al.*, 2016). Neste contexto, ao



reconsiderar os hábitos de consumo de forma holística, é possível conhecer e explorar os benefícios vinculados aos aditivos naturais empregados em produtos alimentícios direcionados ao público final. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as propriedades antimicrobianas apresentadas pelo extrato de pigmentos carotenoides produzidos por *R. glutinis* URM6692 cultivado em soro de queijo coalho.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção do soro de queijo

Para a realização do estudo foi utilizado soro de queijo coalho (SQC), um conhecido resíduo agroindustrial obtido a partir de uma indústria de laticínios localizada no município de Garanhuns – PE. O resíduo foi mantido em freezer sob uma temperatura de -20°C até o momento do uso, quando foi descongelado e autoclavado a 121°C sob pressão contínua de 1 atm durante 15 minutos. Em seguida, foi filtrado e transferido para um novo recipiente previamente esterilizado e então armazenado até o início da fermentação.

2.2 Microrganismos

A levedura utilizada neste estudo, *Rhodotorula glutinis* URM6692 foi obtida da Micoteca URM, do Departamento de Micologia, do Centro de Biociências, da Universidade Federal de Pernambuco (CB/UFPE). Em seguida, a cultura foi mantida em meio ASD (Ágar Sabouraud Dextrose) adicionado de 20% de glicerol, e incubada a 30°C ao longo de 3 a 5 dias, sendo estocada a 4°C e repicada mensalmente. As estirpes bacterianas *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 foram cultivadas em 10mL de caldo Mueller-Hinton (MH) e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas.

2.3 Obtenção de biomassa, extração e quantificação dos carotenoides

A produção de biomassa da levedura foi realizada em frascos agitados a 30°C , 200 rpm e pH 5.5 por 24 horas. Amostras de 10 mL do caldo fermentado foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos e o pellet foi levado para a extração de carotenoides. A biomassa rica em carotenoides foi obtida a partir de amostras de 10 mL do caldo fermentado, lavada com água destilada em vórtex por 1 minuto e novamente centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos, a fim de remover quaisquer resíduos do meio de cultivo, conforme Moliné *et al.* (2012). Após a extração, cada amostra de pigmento foi analisada em espectrofotômetro a 448nm (Davies *et al.*, 1976).

2.4 Determinação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi realizada através do método de microdiluição em caldo para conforme a Norma M7-A6 do NCCLS/CLSI (ANVISA, 2005). Os resultados foram apresentados como média \pm desvio-padrão em ambos os ensaios (antimicrobiano e antioxidante). Em seguida, foram submetidos a análise de variância de um fator – ANOVA one-way ($p < 0,05$). A análise estatística foi realizada no software STATISTICA 10.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Rhodotorula glutinis URM 6692 foi capaz de produzir o pigmento carotenóide com eficiência. Esses pigmentos foram avaliados quanto a sua capacidade antimicrobiana. *E. coli* e *S. aureus* foram sensíveis na concentração avaliada do extrato de carotenoides produzido por *R.*



glutinis URM 6692 (5,00 µg de carotenoides/mL). A taxa de inibição para *E. coli* e *S. aureus* foi de 63,2% e 56,6%, respectivamente, indicando que alta concentração aumenta as chances de inibição exercida contra esses patógenos. Ao inibir o crescimento de bactérias gram-positivas (*S. aureus*) e gram-negativas (*E. coli*), o extrato de pigmentos produzidos por *R. glutinis* URM 6692 apresentou um amplo espectro de atuação antimicrobiana, demonstrando um interessante potencial antimicrobiano.

Este estudo demonstrou que os pigmentos carotenoides produzidos por *R. glutinis* URM 6692 apresentam importantes efeitos biológicos valorizados pela indústria. β-caroteno, toruleno e torularrodina formam um grupo de pigmentos frequentemente sintetizados por *Rhodotorula* spp., porém em proporções que dependem da espécie e de fatores ambientais, como por exemplo, constituintes do meio de cultivo, temperatura, luminosidade bem como o tipo de processo desenvolvido (El-Banna *et al.*, 2012; Mata-Gomez *et al.*, 2014; Zoz *et al.*, 2015). Isto sugere que a utilização do soro de queijo coalho e a otimização das condições de cultivo realizada pelo delineamento experimental afetaram a biossíntese de carotenoides por *R. glutinis* URM 6692, de modo que as proporções de β-caroteno, toruleno e torularrodina presentes no extrato, apesar de desconhecidas, assim como a combinação delas, possivelmente contribuem para os efeitos antimicrobiano evidenciados.

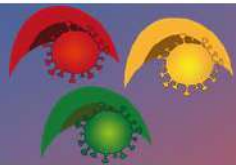
Hanachi; Naghavi (2016), Yoo *et al.* (2016), Keceli *et al.* (2013) relataram resultados semelhantes aos efeitos inibitórios frente a microrganismos patogênicos encontrados neste estudo, confirmando o potencial antimicrobiano tipicamente apresentado pelo extrato de carotenoides de *Rhodotorula* spp. como uma característica própria do gênero. A bactéria mais sensível aos carotenoides de *R. glutinis* UMR 6692 foi a *E. coli*, seguida de *S. aureus*, patógenos comumente associados à infecções alimentares no homem (Liu *et al.*, 2019) e à casos de mastite em animais de produção (Wang *et al.*, 2018), auxiliando na segurança dos alimentos.

4. CONCLUSÃO

Pigmentos carotenoides foram produzidos com sucesso por *Rhodotorula glutinis* URM 6692 cultivada em soro de queijo coalho, um resíduo da agroindústria de laticínios. Esses pigmentos apresentaram potencial farmacológico ao inibir bactérias gram+ e gram-. Assim, o uso dos pigmentos carotenoides pode assegurar a preservação das características nutricionais dos alimentos, possibilitando a sua aplicação na indústria como uma alternativa natural e sustentável aos corantes e conservantes quimicamente sintetizados.

5. REFERÊNCIAS

- ANGUS, A.; WESTBROCK, G. Top 10 Global Consumer Trends 2019. Euromonitor International. 2019.
- BCC RESEARCH. BCC Research Report Overview: The Global Market for Carotenoids. 2018.
- CHENG, Y.T.; YANG, C.F. Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes. *J. Taiwan Inst. Chem. E.*, v. 61, p. 270–275. 2016.
- DAVIES, B.H. GOODWIN T.W. Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments: Cap. 2 - Carotenoids. Academic Press, p. 39–65, Londres, 1976.



EL-BANNA, A. A., EL-RAZEK, A. M. A., EL-MAHDY, A. Some factor saffecting the production of carotenoids by *Rhodotorula glutinis*var. *glutinis*. *Food NutrSci*, v. 3, p. 64-71, 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORLD HEALTH ORGANIZATION. Codex Alimentarius. General Standard for Food Additives (Codex Stan 192-1995). 2016.

HANACHI, P.; NAGHAVI, F. S. 2016. Evaluation of antioxidant activity of *R. Slooffiae*, *R. Mucilaginoso* extracts. *Electron. Physician*, v. 8, n. 10, p. 3110–3115. Disponível em: <https://doi.org/10.19082/3110>

HOU, J.; CUI, H.-L. In vitro antioxidant, antihemolytic, and anticancer activity of the carotenoids from halophilic *Archaea*. *Curr. Microbiol.*, v. 75, n. 3, p. 266–271. 2017.

INETIANBOR, J.E., YAKUBU, J.M., EZEONU, S.C. Effects of food additives and preservatives on man - a review. *Asian J. Sci.Technol.*, v. 6, n. 02, p. 1118-1135. 2015.

KECELI, T. M.; ERGINKAYA, Z.; TURKKAN, E.; KAYA, U. Antioxidant and antibacterial effects of carotenoids extracted from *Rhodotorula glutinis* strains. *Asian J.Chem.*, v. 25, n. 1, p. 42-46, 2013.

KOT, A. M.; BŁAŻEJAK, S.; KURCZ, A.; GIENKA, I.; KIELISZEK, M. *Rhodotorula glutinis*—potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. *Appl. Microbiol. Biot.*, v. 100, p. 6103–6117. 2016.

LIU, Y.; CAO, Y.; WANG, T.; DONG, Q.; LI, J.; NIU, C. Detectionof 12 Common Food-Borne Bacterial Pathogens by TaqMan Real-Time PCR Using a Single Set of Reaction Conditions. *Front. Microbiol.*, v. 10, 9p., 2019.

MATA-GOMÉZ, L.C.; MONTAÑEZ, J.C.; MÉNDEZ-ZAVALA, A.; AGUILAR, C.N. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microb. Cell Fact.*, v. 13, 12p., 2014.

MOLINÉ, M.; LIBKIND, D.; VAN BROOCK, M. Production of torularhodin, torulene, and β -carotene by *Rhodotorula* yeasts. *Methods in Molecular Biology*, 898p., 275–283. 2012.

RADDADI N, CHERIF A, DAFFONCHIO D, NEIFAR M, FAVA F. Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. *Appl. Microbiol. and Biot.*, v. 99, p. 7907–7913, 2015.

ZOZ, L., CARVALHO, J. C., SOCCOL, V. T., CASAGRANDE, T. C., & CARDOSO, L. Torularhodin and torulene: bioproduction, properties and prospective applications in food and cosmetics- a Review. *Braz. Arch. Biol. and Techn.*, v. 58, n. 2, 278-288. 2015. EpubOctober 14, 2014.



WANG, W.; LIN, X.; JIANG, T.; PENG, Z.; XU, J.; YI, L.; LI, F.; FANNING, S.; BALOCH, Z. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* cultured from raw Milk taken from dairy cows with mastitis in Beijing, China. *Front. Microbiol.*, v. 9, p. 1123, 2018.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro concedido.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Produtos naturais e química medicinal

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UM NOVO CANDIDATO ANTI-ZIKA LPSF/ZKC-4 POR MEIO DE CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

J.A.S. MOURA¹, J.F. BRANCO JÚNIOR¹, G.B. COUTINHO¹, A.B.L.M. de OLIVEIRA¹, I.R. PITTA¹, M.R. GALDINO-PITTA¹

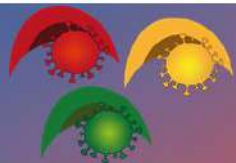
¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino, Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos;

E-mail para contato: arion-tomaz@outlook.com

RESUMO – O vírus Zika é classificado na família de outras arboviroses como a dengue. Ele surgiu na floresta Zika da Uganda em 1947 e, desde então, foi identificado em situações epidemiológicas no mundo. Em 2015, foi relatada sua chegada ao Brasil, onde causou um grande problema de saúde pública, tanto pela epidemia, quanto por sua correlação com problemas neurológicos. Atualmente, não há vacina nem tratamento específico para a infecção, sendo de grande importância a descoberta de novos fármacos antivirais. Nesse contexto, a hibridização molecular surge como uma alternativa de planejamento de novas moléculas. O núcleo da tiazolidina-2,4-diona, que está presente em fármacos já comercializados, é também relatado em moléculas com diversas atividades, como a antiviral. Portanto, é objetivado sintetizar e elucidar estrutura molecular a partir de Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas, do LPSF/ZKC-4 um novo agente proposto contra o vírus Zika. Foi possível obter o derivado em bom rendimento e puro e observar picos característicos da fragmentação da molécula e suas respectivas massas, além da massa do íon molecular (411 m/z).

Palavras-chave: Tiazolidina-2,4-diona, antiviral, fragmentação molecular.

ABSTRACT - The Zika virus is classified in the family of other arboviruses such as dengue. It emerged in Uganda's Zika forest in 1947, and has since been identified in epidemiological situations around the world. In 2015, it was reported that he arrived in Brazil, where he caused a major public health problem, both because of the epidemic and because of its correlation with neurological problems. Currently, there is no vaccine or specific treatment for the infection, and the discovery of new antiviral drugs is of great importance. Thus, molecular hybridization emerges as an alternative for planning new molecules and with this the thiazolidine-2,4-dione nucleus, which is present in drugs already commercialized, also reported in molecules with different activities, such as antiviral. Therefore, it is aimed to synthesize and elucidate molecular structure using LPSF/ZKC-4 Mass Chromatography Coupled to Mass Spectrometry, a new agent proposed



against the Zika virus. It was possible to obtain the derivative in good and pure yield and to observe characteristic peaks of the fragmentation of the molecule and its respective masses, in addition to the mass of the molecular ion (411 m/z).

Keywords: Thiazolidine-2,4-dione, antiviral, molecular fragmentation.

1. INTRODUÇÃO

O vírus Zika (ZIKV) pertence à família Flaviviridae e ao gênero Flavivirus. Sua principal forma de transmissão é a vetorial, principalmente por mosquitos do gênero *Aedes*, como o *A. aegypti* e *A. albopictus*. Há relatos também de transmissão de modo não vetorial, como por via sexual, congênita, transfusão sanguínea, contato com fluidos corporais, mordidas de animais, e exposição laboratorial e outros mosquitos (Hasan *et al.*, 2019; Baud *et al.*, 2017).

A primeira observação do Zika ocorreu em 1947, em um macaco rhesus, na floresta Zika, na Uganda, durante monitoramento da febre amarela. Anos depois, em 1954, o primeiro caso de infecção humana foi relatado. Durante várias décadas, poucos casos foram relatados, havendo observações apenas nos continentes asiático e africano, além de epidemias na Micronésia e Polinésia Francesa (Gubler *et al.*, 2017).

No ano de 2015, o ZIKV chegou ao Brasil e rapidamente se distribuiu na América Latina. No país, ocorreu uma epidemia da doença e essa foi declarada como uma emergência de saúde pública nacional por ser associada a muitos casos de microcefalia em neonatos. Também são relatadas complicações neurológicas em adultos devido à associação do vírus com a síndrome de Guillain-Barré. Apesar de tamanha necessidade, não existem vacinas nem medicamentos regulamentados específicos para o vírus (Baud *et al.*, 2017).

A série LPSF/ZKC, composta por um grupo de novos derivados tiazolidínicos está em desenvolvimento com a proposta de uma possibilidade terapêutica para a doença. O núcleo da tiazolidina-2,4-diona é frequentemente utilizado no design de novas moléculas e é encontrado na estrutura de fármacos antidiabéticos comercializados, além de possuir diversas atividades conhecidas, dentre as quais a antiviral, antimicrobiana, anti-inflamatória e antitumoral (Manjal *et al.*, 2017; Rêgo *et al.*, 2018).

Portanto, este trabalho objetivou realizar a síntese de um novo derivado tiazolidínico promissor na terapêutica do ZIKV, e a elucidação estrutural através de Cromatografia Gasosa acoplada a um Espectrômetro de Massas (CG-EM). Trata-se de um método analítico, o qual combina características de cromatografia gasosa e espectrometria de massas na identificação de diferentes substâncias. A combinação entre as técnicas proporciona boa seletividade, pois picos não resolvidos podem ser isolados monitorando-se um valor de razão massa/carga (m/z) selecionada. Dessa forma, a técnica analítica foi empregada para elucidação da estrutura química do composto proposto.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a síntese da molécula LPSF/ZKC-4, foi sintetizada inicialmente a TZD, a partir da ciclização da tiouréia com ácido cloroacético, usando água como solvente a 80°C. A partir do produto da TZD, foi produzido o intermediário, a partir de uma reação de substituição nucleofílica de ordem 2, com um cloreto de arila, na promoção de base a 65°C. Dessa forma, o produto foi condensado com o 3-furancarboxaldeído através da reação de Knoevenagel, em meio ácido, com



promoção de acetato de amônio produzindo o LPSF/ZKC-4.

A caracterização através da técnica de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM), foi utilizado o cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas Shimadzu QP-2010, com fase estacionária coluna Restek rtx-5 30m x 0.25mm x 0.25 μ m e fase móvel gás hélio. Foi preparada uma solução do analito na concentração de 0.2g/mL com solvente acetonitrila e filtrado em um filtro de celulose 0.2 μ m para um vial. A temperatura de aplicação foi de 320°C e a temperatura inicial de eluição foi de 40°C até 1 min., aumentou até 180°C com taxa de variação de 20°C/min., seguido do aumento da temperatura até 320°C com taxa de variação de 10°C/min. até atingir 18 min. O tempo de eluição foi de 40 min. e o volume aplicado de 8 μ L. O intervalo de scan do espectrômetro de massas foi de 40-600 m/z.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A molécula LPSF/ZKC-4 apresenta massa molecular de 411.21g.mol⁻¹ e Log P de 3.38, calculados no *software ChemDraw Ultra 12.0*. Os cristais de LPSF/ZKC-4 obtidos a partir da metodologia empregada apresentaram coloração preta e rendimento total de 64,5%. A partir do cromatograma gasoso (Figura 1) é possível observar que no tempo de retenção (Tr) de 21.280min. é apresentado o pico do LPSF/ZKC-4, com pureza maior de 99.99%

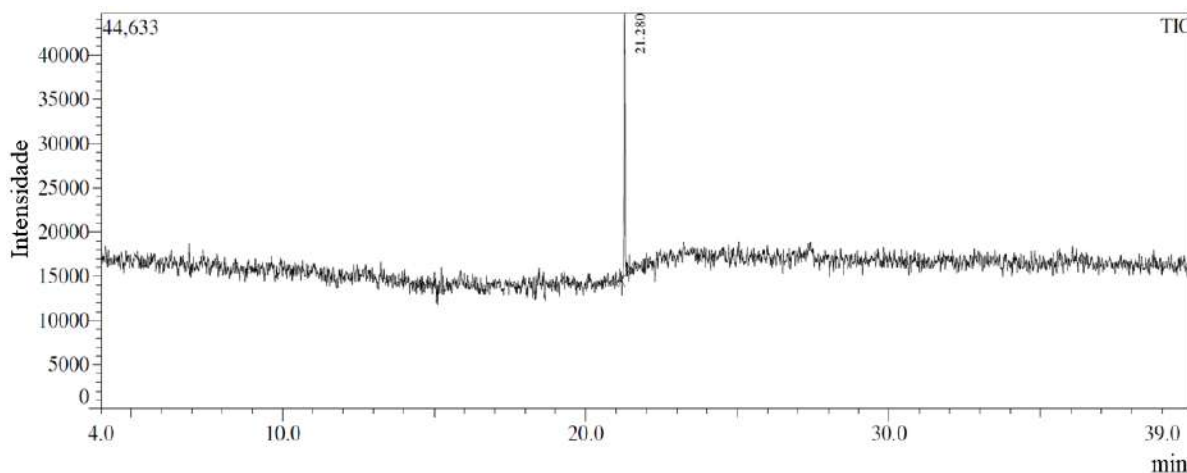


Figura 1 – Cromatograma gasoso do LPSF/ZKC-4. Pureza maior que 99.99%, Tr de 21.280min.

A partir do espectro de massas, observado na Figura 2, é possível observar o íon molecular (M^+) em 411 m/z, além do pico base em 124 m/z, que apresenta a maior intensidade, o qual pode representar o produto a quebra da ligação do C5. É possível observar também em 217 m/z, um pico referente a formação do íon tropílio característico da molécula.

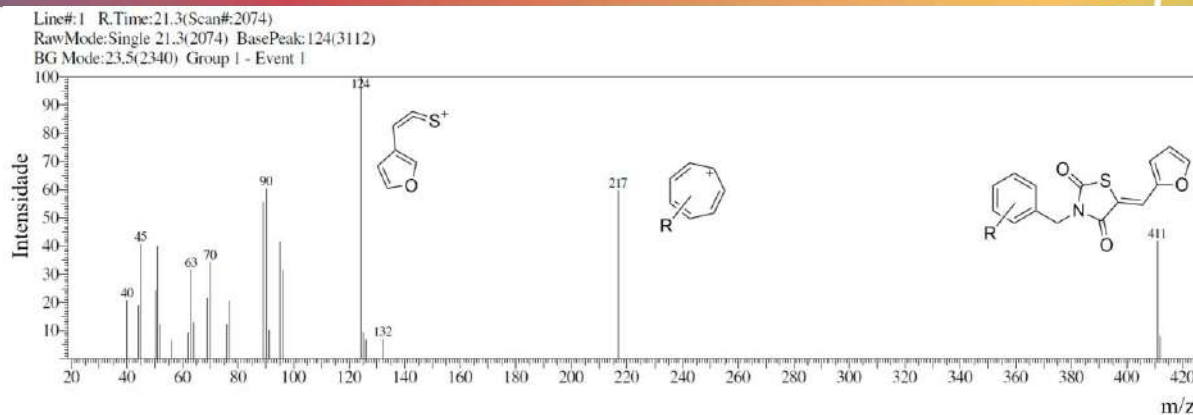


Figura 2 – Espectro de massas por impacto eletrônico do LPSF/ZKC-4. Íon molecular: 411m/z; Pico base: 124m/z; Íon trópílio: 217m/z.

4. CONCLUSÃO

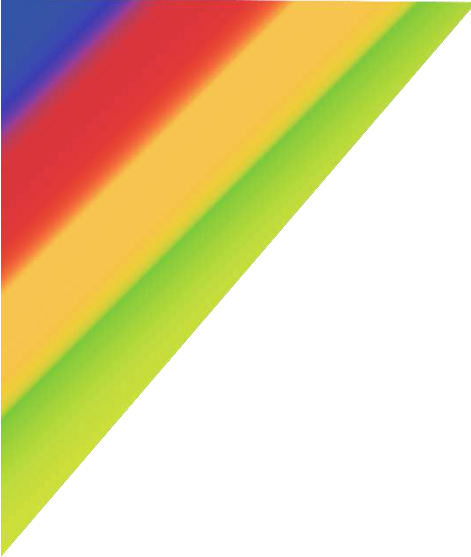
A partir da metodologia sintética foi possível obter a molécula LPSF/ZKC-4 com bom rendimento e alto grau pureza, a qual foi comprovada pela cromatografia gasosa. Foi observado que o espectro de massas, revelou picos característicos da fragmentação molecular do derivado, e dessa forma confirmando sua massa de acordo com o M^+ .

5. REFERÊNCIAS

- BAUD D.; GUBER D. J.; SCHAUB B.; LANTERI M. C.; MUSSO D. An update on Zika virus infection. *The Lancet*, v. 390, n. 10107 p. 2099-2109, 2017.
- DUANE J. G.; NIKOS V. D. M., History and Emergence of Zika Virus, *The Journal of Infectious Diseases*, v. 216 p. S860–S867, 2017.
- HASAN S.; SAEED S.; PANIGRAHI R.; CHOUDHARY P. Zika virus: A global public health menace: A comprehensive update. *J. Int. Soc. Prevent. Communit. Dent.* v. 9, p. 316-327, 2019.
- MANJAL S. K.; KAUR R.; BHATIA R.; KUMAR K.; SINGH V.; SHANKAR R.; KAUR R.; RAWAL R. K. Synthetic and medicinal perspective of thiazolidinones: A review. *Bioorganic Chemistry*, v. 75, p. 406-423, 2017.
- RÊGO, M. J. B. M.; AZOUBEL-ANTUNES, A.; BEZERRA, M. B. C. F.; PEREIRA, M. C.; SILVA, J. C.; LINS, T. U. L.; SARINHO, E. S. C.; AMORIM, C. A. C.; LIMA, M. C. A.; GALDINO-PITTA, M. R. Ability of two new thiazolidinediones to downregulate proinflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells from children with asthma. *Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences*, v. 54, n. 3, p. 1-10, 2018

6. AGRADECIMENTOS

Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT-SG); Universidade Federal de Pernambuco (UFPE); Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE); Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT-IF); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).



SISTEMAS DE INOVAÇÃO EM SAÚDE



ÁREA DE SUBMISSÃO: Sistemas de Inovação em Saúde

MAPEAMENTO DO CENÁRIO DE MÁSCARAS FACIAIS PARA O ENFRENTAMENTO DA COVID-19: UMA REVISÃO DE PATENTES

T de A. ANDRADE¹, J. A. C. NASCIMENTO Jr¹, A. M. SANTOS¹, L. P. BORGES¹, L. J. QUINTANS-JÚNIOR², C. I. B. WALKER¹, L. A. FRANK³ e M. R. SERAFINI¹

¹ Universidade Federal de Sergipe, Departamento de Farmácia;

² Universidade Federal de Sergipe, Departamento de Fisiologia;

³ Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Farmácia.

E-mail para contato: tatianny_aa@hotmail.com

RESUMO – A COVID-19 é considerada o maior evento pandêmico na medicina moderna. O coronavírus adapta-se a novos ambientes através de mutação e recombinação, portanto, sua transmissão pode ser realizada por meio de contato pessoal, toque e gotículas respiratórias. Devido à falta de vacinas e tratamentos eficazes contra a COVID-19, as máscaras tornaram-se as principais medidas não farmacológicas no controle da transmissão do vírus. Entretanto, a eficiência de filtração das máscaras depende das características do material utilizado e tamanho do poro. Desta forma, esta revisão tem como objetivo analisar as patentes do último ano que desenvolveram máscaras para proteção contra partículas de poeira e patógenos. As patentes avaliadas são datadas de janeiro a maio de 2020 e a pesquisa foi realizada através do Espacenet. No período analisado houve um crescente aumento do número de publicações, porém no mês de maio observou-se uma queda nesses depósitos. Além disso, os países que mais publicaram patentes durante esse período foram China e Coreia, seguidos do Japão, constando como principal aplicante a indústria. Patentes sobre fabricação de máscaras também foram analisadas, nas quais observou predomínio de matérias-primas como algodão, nylon, fibra de prata, polipropileno, assim como, máscaras associadas à nanotecnologia. Desta forma, o desenvolvimento de máscaras vem aumentando, uma vez que o seu uso se tornou obrigatório na maioria dos países do mundo, fazendo com que haja a busca pelo aumento da sua eficiência de filtração e habilidade de retenção do vírus.

Palavras-chave: coronavírus; COVID-19; transmissão; máscara de proteção.

ABSTRACT - COVID-19 has been considered a pandemic spread and the most devastating global event in modern medicine. The coronavirus is capable of adapting to new environments through mutation and recombination, therefore, its transmission can happen through personal contact, touch and respiratory droplets. Due to the lack of effective vaccines and treatments against COVID-19, the masks have become the main non-pharmacological measures in the control of the



virus transmission. However, the filtration efficiency of the masks depends on the characteristics of the filter and the pore. Thus, this review aims to analyze the current patents which have developed masks to protect against dust particles, and pathogens. Besides that, the countries that most published patents during this period were China and Korea, followed by Japan, with Industry as the main applicant. Masks manufacturing patents were also analyzed, in which there was a predominance of raw materials such as cotton, nylon, silver fiber, polypropylene, as well as, masks associated with nanotechnology. Thus, the development of masks has been increasing, since its use has become mandatory in most countries of the world, making it necessary to increase its filtration efficiency and ability to retain the virus.

Keywords: coronavirus; COVID-19; transmission; protection mask.

1. INTRODUÇÃO

A Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2) e sua doença, a COVID-19, são consideradas o maior evento pandêmico na medicina moderna (Piva et al., 2020). O primeiro caso do vírus foi identificado em Wuhan, China, em dezembro de 2019 (Guan et al., 2020), entretanto o coronavírus obteve sua primeira aparição em 1960 e dois outros eventos altamente patogênicos aconteceram nos anos de 2003 e 2012. As viroses originadas pelos coronavírus são capazes de adaptar-se a novos ambientes através de mutação e recombinação (Li, 2016), assim como, sua transmissão pode ser efetuada entre as espécies (Yang et al., 2020). Desta forma, o vírus pode ser transmitido por meio do contato pessoal próximo, aerossóis e através do toque (Chan et al., 2020; Yang et al., 2020), assim como, gotículas respiratórias durante a tosse ou espirro (Maier et al., 2015). Ademais, a COVID-19 pode existir por um longo período no estado de pequenas partículas (Zhou et al., 2020).

Devido à falta de vacinas ou tratamento eficaz para a COVID-19, novas abordagens foram desenvolvidas para controlar a propagação do vírus. Sendo assim, fez-se necessário a implementação de equipamentos de proteção individual (EPI) (Vogel, 2020), como as máscaras, para reduzir a transmissão viral e o risco de infecção (Ma et al., 2020a). Diversos tipos de máscaras, atualmente, são utilizados para o controle da transmissão do coronavírus (Balachandar et al., 2020), como: a N95, máscaras cirúrgicas e máscaras de tecidos (Ma et al., 2020b). Apesar da grande variedade de máscaras de proteção, a sua eficiência de filtração depende das características do filtro e do poro, cujo tamanho deve ser menor que o do vírus (120 nm) (Balachandar et al., 2020).

Nesse contexto, esta revisão teve como objetivo avaliar as patentes atuais que desenvolveram máscaras para proteger contra partículas de poeira e patógenos, como vírus. Esta revisão fornece uma visão abrangente dos principais materiais utilizados para produção de máscaras, bem como sua eficiência na proteção para impedir a transmissão de vírus, como o coronavírus.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A presente revisão apresenta depósitos de patentes de janeiro de 2020 a maio de 2020. A pesquisa foi realizada através da base de dados Espacenet. A busca de patentes foi realizada utilizando o código A41D13/11 da Classificação Internacional de Patentes (IPC). Este código refere-se a máscaras protetoras, por exemplo para uso cirúrgico ou para uso em atmosferas sujas. Um total de 506 patentes foram identificadas para avaliação preliminar a partir do banco de dados, das quais 1 patente foi excluída por não possuir o título disponível, 7 patentes foram excluídas



porque o texto completo estava indisponível e 34 patentes eram duplicatas. Posteriormente, após a leitura do título e resumo, 241 patentes foram excluídas por estarem fora do escopo da nossa revisão. Assim, após o processo de triagem e elegibilidade, 223 patentes foram selecionadas para nossa análise de acordo com o objetivo do estudo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso de máscaras se tornou obrigatório em diversos países ao redor do mundo, principalmente em locais públicos, durante a pandemia causada pelo coronavírus, uma vez que esta é uma das principais intervenções não farmacológicas para prevenir a transmissão do vírus através do ar e reduzir a sua taxa de transmissão. Conseqüentemente, o número de depósitos de patentes sobre as máscaras tem crescido. Na Figura 1A, durante os meses de janeiro a abril, observa-se esse aumento, causado, possivelmente, pela expansão da doença neste período de tempo. Entretanto, no mês de maio, houve uma redução exacerbada no número de depósitos, cuja explicação relaciona-se com o processo de publicação das patentes, não as deixando disponível para análise. Além disso, como em alguns países do Ocidente e da Europa o pico da pandemia já está sendo superado, espera-se que o número de depósitos naturalmente comece a cair.

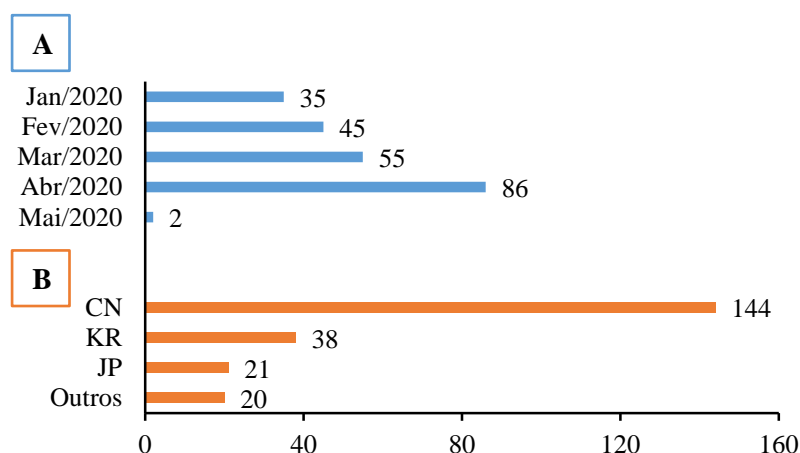


Figura 1 – A: Número de publicação de patentes por mês após a seleção final. B: Número de pedidos de patentes por países.

Ademais, de acordo com a Figura 1B, a maioria das patentes analisadas pertencem a países como China e Coréia, com 144 e 38 patentes, respectivamente, seguidos do Japão, com 21 publicações. Na China, por exemplo, as máscaras sempre estiveram presentes no dia a dia dos seus habitantes, uma vez que são usadas para prevenir a transmissão de viroses, assim como, para proteger a população da poluição, explicando, desta forma, o alto número de patentes publicadas por este país. Os países do continente asiático concentram essas publicações, possivelmente, porque os primeiros casos de coronavírus surgiram nesses locais, assim como, as primeiras tentativas de diminuir a propagação da doença.

Além dos países, as patentes também foram classificadas e divididas de acordo com os aplicantes. A indústria é um dos maiores aplicantes, com 130 patentes sobre máscaras, seguida por 68 patentes com aplicante do tipo autônomo (Figura 2). O alto número de patentes publicadas pelas

indústrias é esperado, devido à crescente tentativa de inovação em relação aos produtos durante a pandemia. Desta forma, a indústria apresenta diversos tipos de máscaras, tais como: máscaras de proteção, que são classificadas entre N95 e máscaras cujo material é composto por variantes de plástico, como polipropileno, para usar diferentes matérias-primas.

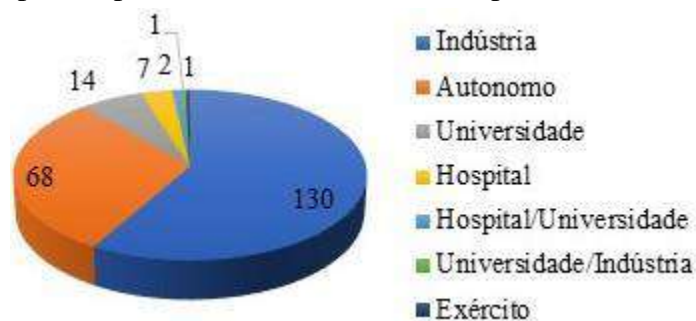


Figura 2 - Seleção final das patentes: tipo de aplicante.

O aumento do uso de máscaras de proteção pela população durante a pandemia do COVID-19 acarretou na escassez deste elemento de proteção, surgindo a necessidade da fabricação de máscaras de tecidos. Essas máscaras fornecem proteção inferior contra doenças respiratórias em comparação com as máscaras cirúrgicas no bloqueio da emissão de partículas, porém seu uso correto é eficaz, pois impede que uma pessoa dissemine aerossóis no ambiente, transmitindo o vírus a outras pessoas.

Baseado nas patentes selecionadas para essa revisão, a maioria dos produtos utilizados na fabricação das máscaras consistem em tecidos, como o algodão, sendo este um tecido que apresenta boa eficiência de filtração (Konda et al., 2020). Sendo assim, a habilidade de filtração através do uso correto das máscaras consiste na melhor maneira de se lidar com uma pandemia. Entretanto, as máscaras confeccionadas com estes materiais geralmente apresentam espaços vazios entre as camadas, o que pode comprometer sua eficácia, especialmente ao lidar com partículas extremamente finas.

Desta forma, algumas patentes selecionadas nesta revisão abordaram máscaras associadas à nanotecnologia, especialmente com diâmetro na faixa de nanômetros (Junbo, 2020; Yaixin and Shaoyun, 2020), que surge como uma alternativa para aumentar a capacidade de filtração, ou seja, a capacidade de reter o vírus na máscara, proporcionando assim mais segurança aos usuários.

4. CONCLUSÃO

A COVID-19 tem sido considerado o evento mais devastador da medicina moderna. Esta doença tornou-se uma pandemia devido a rápida transmissão do vírus, que pode acontecer por meio do contato pessoal próximo, aerossóis e através do toque, como também por gotículas respiratórias durante a tosse ou ao espirrar. Os EPIs e protocolos de segurança são recomendados para a redução da propagação do vírus, fazendo das máscaras a principal maneira de reduzir o risco de infecção. Além disso, existem diversos tipos de máscaras de proteção, como a N95, máscaras cirúrgicas e de tecidos. Portanto, o desenvolvimento de máscaras vem aumentando e outros materiais estão sendo utilizados, como algodão, nylon, tecidos de fibra de prata, polipropileno, a fim de criar alternativas para enfrentar a crise. A nanotecnologia também se apresenta incluída como uma alternativa no aumento da capacidade de filtração e a habilidade de retenção do vírus pela máscara, uma vez que



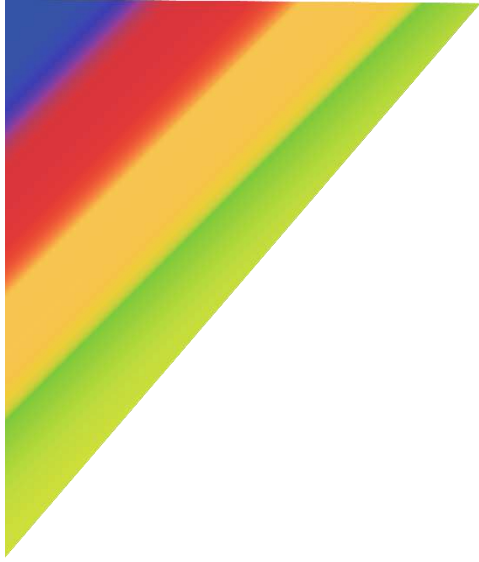
as capacidades de filtração das máscaras dependem das características de filtração e do tamanho do seu poro.

5. REFERÊNCIAS

- BALACHANDAR V, MAHALAXMI I, KAAVYA J, VIVEKANANDHAN G, AJITHKUMAR S, ARUL N, SINGARAVELU G, KUMAR NS, DEVI SM. COVID-19: Emerging protective measures. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 24(6):3422–3425, 2020.
- CHAN JFW, YUAN S, KOK KH, TO KKW, CHU H, YANG J, XING F, LIU J, YIP CCY, POON RWS, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet.* 395(10223):514–523, 2020.
- GUAN W, NI Z, HU YMD, LIANG W, OU C, HE J, LIU L, SHAN H, LEI C, HUI DSC, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.* 382:1708–1720, 2020.
- JUNBO F, inventor; Junbo F, assignee. 2020 Feb 21. Electrostatic spinning nano fiber mask . China patent CN 210094734.
- KONDA A, PRAKASH A, MOSS GA, SCHMOLDT M, GRANT GD, GUHA S. Aerosol Filtration Efficiency of Common Fabrics Used in Respiratory Cloth Masks. *ACS Nano.* 14(5):6339–6347, 2020.
- LI F. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annu. Rev. Virol.* 3:237–261, 2016.
- MA QX, SHAN H, ZHANG CM, ZHANG HL, LI GM, YANG RM, CHEN JM. Decontamination of face masks with steam for mask reuse in fighting the pandemic COVID-19: experimental supports. *J. Med. Virol.* 2020^a.
- MA QX, SHAN H, ZHANG HL, LI GM, YANG RM, CHEN JM. Potential utilities of mask-wearing and instant hand hygiene for fighting SARS-CoV-2. *J. Med. Virol.* 2020b.
- MAIER HJ, BICKERTON E, BRITTON P. Coronaviruses: Methods and protocols. New York (NY):Springer. 2015.
- PIVA S, FILIPPINI M, TURLA F, CATTANEO S, MARGOLA A, DE FULVIIS S, NARDIELLO I, BERETTA A, FERRARI L, TROTTA R, et al. Clinical presentation and initial management critically ill patients with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection in Brescia, Italy. *J. Crit. Care.* 58:29–33, 2020.
- VOGEL L. Who should wear a face mask? Experts weigh in on Canada’s COVID-19 response. *CMAJ.* 192(16):440–441, 2020.
- YANG Y, PENG F, WANG R, GUAN K, JIANG T, XU G, SUN J, CHANG C. The deadly coronaviruses: The 2003 SARS pandemic and the 2020 novel coronavirus epidemic in China. *J. Autoimmun.* 109:102434, 2020.
- YAOXIN Z, SHAOYUN L, inventors; Qianbaidun Technology Co. Ltd., assignee. 2020 Apr 21. Nanofiber mask with high efficiency filtration. China patent CN 210353320.
- ZHOU ZG, YUE DS, MU CL, ZHANG L. Mask is the possible key for self-isolation in COVID-19 pandemic. *J. Med. Virol.* 2020.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).



TERAPIAS EM SAÚDE



ÁREA DE SUBMISSÃO: Terapias em Saúde

FLORETINA NA QUIMIOPREVENÇÃO E QUIMIOTERAPIA DO MELANOMA: REVISÃO DA LITERATURA

T. P. A. CASARINI¹, L.A. FRANK¹, A. R. POHLMANN¹ e S. S. GUTERRES¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre RS, Brazil

E-mail para contato: casarini.talita@gmail.com

RESUMO – A floretina é um flavonoide que apresenta efeitos antioxidante, anti-inflamatório e antitumoral. Este composto tem demonstrado resultados promissores no tratamento do melanoma. Portanto, com o objetivo de atualizar a literatura, foi conduzida uma pesquisa eletrônica na base de dados Medline. A floretina induz a fragmentação do DNA em linhagem celular de melanoma B16 4A5, por possível bloqueio do transporte transmembrana de glicose, além do aumento da expressão proteica pró-apoptótica Bax. Em pesquisa que associou floretina e HSP70, foi demonstrado que houve aumento da morte específica de células B16. Já a incubação com floretina 20 μ M estimulou um aumento da lise específica comparado com as células não tratadas. Na etapa in vivo, quando os animais foram tratados topicamente com hidrogel de floretina, houve redução do tamanho do tumor pela metade. Em linhagem celular B16F10, tanto o floretina isolada como a floretina encapsulada em nanopartículas revestidas com quitosana apresentaram valores de IC50 semelhantes, sem diferença estatística. Porém, na etapa in vivo, conduzido em modelo de melanoma em camundongos, o grupo tratado com nanopartículas exibiu menor número de foco de metástase de forma estatisticamente significativa. Os estudos apresentados entre 1990 e 2020 evidenciam a promissora aplicação de floretina tanto na quimioprevenção como na quimioterapia do melanoma.

Palavras chave: floretina, flavonoide, melanoma, câncer de pele

ABSTRACT – Phloretin is a flavonoid with antioxidant, anti-inflammatory and antitumoral effects. This compound has shown promising results in melanoma treatment. Therefore, in order to update the literature, an electronic search was conducted in Medline database. Phloretin induces DNA fragmentation B16 mouse melanoma 4A5 cells, due to possible blockage of glucose transmembrane transport, in addition to increase of pro-apoptotic Bax protein expression. In a study associating phloretin and HSP70, it was demonstrated enhanced B16 cell death. Incubation with phloretin 20 μ M stimulated the augment of dead cells compared with non-treated cells. The in vivo study, with the application of a hydrogel containing phloretin alone, the flavonoid halved the size of tumor. In B16F10 cell line, ether phloretin isolated or chitosan-coated nanoparticles containing phloretin, IC₅₀ values were not significantly different between the groups in the in vitro



study. However, the in vivo experiment conducted in melanoma mouse model, the group treated with nanoparticles exhibited a lower number of metastasis foci with statistical significance. The studies presented between 1990 and 2020 show the promising application of phloretin in both chemoprevention and melanoma chemotherapy.

Keywords: phloretin, flavonoid, melanoma, skin cancer.

1. INTRODUÇÃO

A floretina é um fitoquímico entre cerca de 6.000 flavonoides existentes e é considerada promissora seja na quimioprevenção como no tratamento do melanoma, o tipo de câncer de pele mais agressivo. Moléculas oriundas de plantas podem combater o dano induzido pela radiação ultravioleta, um conhecido fator desencadeante de melanoma. Pesquisas mostram que a floretina apresenta atividade antioxidante, anti-inflamatória e anticâncer (GARBE *et al.*, 2020; ORESAJO *et al.*, 2008; PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016; SUN *et al.*, 2019).

Nesta revisão de literatura, são descritos os principais conceitos de melanoma e suas causas. Em seguida, é abordado o papel do flavonoide floretina, seus possíveis mecanismos de ação, além de destacar os recentes avanços dentro do contexto de drug delivery.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Esta revisão de literatura foi realizada por meio de busca eletrônica na base de dados Medline, Web of Science e Science Direct incluindo artigos publicados entre 1990 e julho de 2020 que relacionassem a aplicação do flavonoide floretina no melanoma. Os termos de busca e sua localização ("Title/Abstract" para Medline, "Tópico" (pesquisa o título, resumo, as palavras-chave do autor e o Keywords Plus) para Web of Science e "Título, Resumo e Keywords" para Science Direct), foram "phloretin", "skin cancer", "skin tumor", "skin neoplasma" e "melanoma". Cânceres de pele do tipo não melanoma foram excluídos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A pesquisa nas bases de dados Medline, Web of Science e Science Direct resultaram em 11, 24 registros e 5, respectivamente. Dentre estes, foram selecionados os artigos que apresentassem resultados de ensaios sobre a aplicação de floretina no melanoma. A pesquisa na base de dados Web of Science amplia a quantidade de artigos fornecidos visto que inclui busca no KeyWords® Plus. Foram encontrados artigos de revisão sobre a floretina e seus efeitos citoprotetores (DE OLIVEIRA, 2016), bases bioquímicas para os efeitos anticâncer (CHOI, 2019) e seu potencial terapêutico (MARIADOSS *et al.*, 2019). Não foram encontrados artigos de revisão sobre floretina e melanoma. No total, 5 artigos foram incluídos na presente revisão.

O melanoma é o tipo de câncer de pele mais agressivo e com alta taxa de mortalidade. De acordo com a Sociedade Americana de Câncer, no ano de 2020, são estimados 108.420 novos casos de melanoma (65.350 homens e 43.070 mulheres) e 11.480 mortes (8.030 homens e 3.450 mulheres) (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2020). No Brasil, o câncer de pele ocupa a primeira posição, correspondendo a 30% de todos os tumores malignos registrados no país (Instituto Nacional de Câncer, INCA, 2020). Existem três tipos principais de câncer de pele que apresentam etiologia e progressão diferentes, porém, sabe-se que compartilham uma característica importante: todos podem se originar a partir da exposição exacerbada à radiação ultravioleta, dentre eles



podemos destacar: I) carcinoma basocelular (CBC): mais prevalente dentre todos os tipos de câncer. O CBC surge nas células basais, que se encontram na camada mais profunda da epiderme. Está presente com mais frequência nas regiões mais expostas ao sol, como face, orelhas, pescoço, couro cabeludo, ombros e costas. II) Carcinoma espinocelular (CEC): segundo mais prevalente dentre todos os tipos de câncer de pele. Manifesta-se nas células escamosas, que constituem a maior parte das camadas superiores da pele. Pode se desenvolver em todas as partes do corpo, embora seja mais comum nas áreas expostas ao sol, como orelhas, rosto, couro cabeludo, pescoço etc. III) Melanoma: este tipo se inicia nos melanócitos, células presentes na membrana basal, responsáveis pela produção de melanina e constituídos por dendritos que se estendem para os queratinócitos.

A taxa incidência do câncer do tipo melanoma é cerca de 1/10 dos casos de câncer do tipo não melanoma, porém, a taxa de morte é de aproximadamente 8 vezes superior ao tipo não melanoma (LIU-SMITH; JIA; ZHENG, 2017). No Brasil, a estimativa de novos casos é de 8.450, sendo 4.200 homens e 4.250 mulheres. Já o número de mortes é de 1.794, sendo 1.012 homens e 782 mulheres (INCA, 2020).

O recente *guideline* do Consenso Europeu para o diagnóstico e tratamento do melanoma (2020) constata que esta doença é potencialmente a forma de tumor mais perigosa, sendo responsável por 90% da mortalidade causada por câncer de pele e que a recidiva ou recorrência do melanoma é uma falha comum no tratamento (GARBE *et al.*, 2020). O primeiro quimioterápico aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) foi a dacarbazina em 1975, que alquila o DNA e impede a divisão celular. Embora amplamente utilizado tanto isolado como em associações, a dacarbazina exibe eficácia modesta, apresentando taxa de resposta completa em apenas 5% dos casos (MISHRA *et al.*, 2018). Em 2011, um anticorpo conhecido como ipilimumab (Yervoy) também foi aprovado pelo FDA, resultado de um estudo que mostrou que uma terapia foi capaz de promover taxas de sobrevida significativas em melanoma metastático maligno.

De acordo com MOON *et al.* (2017), a radiação UVB é um estímulo extrínseco capaz de iniciar a melanomagenese via processo dependente de inflamação aguda. Como mostrado pela Figura 1, a UVB é a radiação mais energética e que pode induzir a danos no DNA. É definido que a radiação ultravioleta seja o fator etiológico ambiental mais importante para o desenvolvimento do melanoma, pois promove mutações em oncogenes (mutações em NRAS e BRAF encontradas respectivamente em 15–30% e ~60% dos melanomas) e supressão da resposta imune. Já a radiação UVA produz espécies reativas de oxigênio capazes de causar danos secundários ao DNA, e, portanto, induzir ao câncer de pele (LIU-SMITH; JIA; ZHENG, 2017).

Os chamados fitoquímicos são compostos biologicamente ativos derivados de plantas com atividades relevantes tanto na prevenção quanto no tratamento do melanoma, pois têm propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antiproliferativa e antiangiogênica. São bem tolerados, amplamente disponíveis e de baixo custo (NG *et al.*, 2018). Entre os fitoquímicos já avaliados e com aplicações promissoras tanto na quimioprevenção quanto na quimioterapia do melanoma, estão a 6-Prenylnaringenin e 8-prenylnaringenin, capsaicina, curcumina, epigallocatequina-3-galato, genisteína, resveratrol, indol-3-carbinol, compostos organossulfurados (dialil trissulfeto), entre outros (NG *et al.*, 2018; VENTURELLI *et al.*, 2018). O melanoma é uma doença de natureza agressiva e resistente, cujos tratamentos atuais apresentam uma série de desvantagens como a baixa especificidade, alta toxicidade e baixa taxa de resposta completa (MISHRA *et al.*, 2018). Visto que o flavonoide fletina apresenta evidências positivas no tratamento do melanoma, hipotetizamos que ele seja promissor no desafio de se obter melhores prognósticos para os pacientes acometidos pelo melanoma.



A floretina é um flavonoide encontrado especialmente nas frutas, folhas e raízes da macieira (*Malus domestica*), além de estar presente no seu suco. É conhecido por suas importantes propriedades biológicas (DE OLIVEIRA, 2016; SHIN *et al.*, 2014), e pode ser considerado um fitocomposto antioxidante poderoso que pode proteger sistemas biológicos contra o estresse oxidativo, devendo ser usado como um suplemento natural para prevenção de doenças relacionadas aos radicais livres (NITHIYA; UDAYAKUMAR, 2016). Estudos demonstraram que a atividade antioxidante de 100 g de maçãs frescas é comparável a 1500 mg de vitamina C (EBERHARDT; LEE; LIU, 2000).

Já foi demonstrado que a floretina, em concentrações de até 200 $\mu\text{mol/mL}$, apresenta atividade anticâncer contra inúmeras linhagens celulares de câncer, incluindo células humanas (A549) de câncer de pulmão, células de câncer hepático (Bel7402), câncer ileocecal humano (HepG2), e câncer de cólon humano em linhagem celular (HT-29) (QIN *et al.*, 2015).

Como a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio estão envolvidas em uma série de doenças humanas, incluindo o câncer, a atividade antioxidante da floretina deve ser uma das responsáveis pelo seu efeito protetor e terapêutico. Foi mostrado que a floretina reage frente ao radical hidroxila, com IC₅₀ de 0,8 μM (controle positivo: trolox - IC₅₀ 25 μM) (Lin *et al.*, 2007) e inibe a peroxidação lipídica em 50% na concentração de 24 μM (Rezk *et al.*, 2002).

Na presente pesquisa, foram encontrados 5 artigos que avaliaram exclusivamente o efeito antimelanoma da floretina, compreendidos entre 1997 e 2018. O primeiro estudo encontrado relacionando floretina e melanoma foi conduzido por KOBORI *et al.* (1997). Nesta pesquisa, foi verificado que o antioxidante induz a fragmentação de DNA internucleossomal típica de apoptose em células de melanoma B16 4A5. De acordo com os pesquisadores, isso acontece principalmente pelo bloqueio do transporte transmembrana de glicose (efeito supressor do tumor). Em linhagem de células B16, o mesmo pesquisador mostrou em 1999 que a apoptose induzida pelo flavonoide foi inibida por actinomicina D, pelo inibidor de caspase-1-like Ac-YVAD-CHO e pelo inibidor de caspase-3-like Ac-DEVD-CHO. Além disso, durante a indução de apoptose, a expressão de proteína Bax aumentou e os níveis das proteínas p53, Bcl-2 e Bcl-SL não foram alterados. Esse resultado sugere que a floretina induz a apoptose por meio da promoção da expressão proteica de Bax e ativação de caspases (KOBORI *et al.*, 1999). Em outro estudo, foi demonstrado que a floretina 1 μM inibiu a produção intracelular de radicais livres induzida por t-butilhidroperóxido (t-BOOH) em células embrionárias de rim humano (HEK-293) (FUNARI *et al.*, 2011). No mesmo estudo, em ensaio com o corante iodeto de propídeo seguido de leitura por citometria de fluxo, a floretina induziu apoptose de células de melanoma humano (M14) de maneira concentração dependente, sendo pronunciada na concentração de 20 μM após 24h, ao mesmo tempo sem induzir apoptose de HEK-293, indicando possível seletividade do polifenol frente a células tumorais.

Ao avaliar os efeitos da floretina na expressão de COX-2, um alvo molecular importante para muitas moléculas estudadas seja na quimioprevenção como no tratamento de tumores, SHIN, KUNDU e SURH, (2012) verificaram que ao ser aplicado topicamente em camundongos, o flavonoide suprimiu tanto a promoção de tumor induzida por TPA (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate), bem como a expressão de COX-2.

Em outro estudo, *in vitro*, a floretina aumentou a penetração de proteína de choque térmico HSP70 exógena na célula de tumor. Além disso, a incubação com floretina 20 μM também estimulou um aumento da lise específica comparado com as células não tratadas (ABKIN *et al.*, 2016). Na etapa *in vivo*, camundongos receberam subcutaneamente células B16 e foram divididos em 5 grupos para serem tratados por diferentes formas, iniciando no sétimo dia após a inoculação das células de tumor. Ao final do experimento o grupo 5 apresentou redução do tamanho do tumor



em quase 5 vezes comparado aos ratos não tratados, enquanto o *lifespan* dos animais aumentou de 25 para 39 dias. Os autores concluíram que a combinação de HSP70 e phloretin pode ser um novo tratamento para a imunoterapia eficiente de cânceres intratáveis como melanoma cutâneo. Embora o objetivo do estudo conduzido por ABKIN *et al.* (2016) tenha sido o efeito da associação de phloretin no hidrogel com HSP, os resultados mostraram que o grupo tratado apenas com hidrogel de phloretin teve redução do tamanho dos tumores pela metade, porém sem alteração no *lifespan*.

O estudo mais recente envolvendo floretina e melanoma traz o diferencial de comparar o flavonoide com o mesmo nanoencapsulado (LEE *et al.*, 2019). Em linhagem celular B16F10, tanto a floretina isolada como a floretina encapsulada em nanopartículas revestidas com quitosana apresentaram valores de IC50 semelhantes, sem diferença estatística. Porém, na etapa *in vivo*, conduzido em modelo de melanoma em camundongos, o grupo tratado com nanopartículas exibiu menor número de foco de metástase de forma estatisticamente significativa. A nanotecnologia direcionada para o tratamento do melanoma tem sido cada vez mais explorada nos últimos anos, seja para o carreamento de fármacos, seja como o próprio agente antimelanoma. Nanotubos de carbono, nanopartículas de cobre, nanopartículas de ouro, nanopartículas lipídicas e lipossomas são exemplos de estratégias dirigidas pela necessidade de se combater esta doença tão letal (MISHRA *et al.*, 2018).

4. CONCLUSÃO

Estratégias alternativas à terapia medicamentosa têm se tornado cada vez mais frequentes em pacientes oncológicos a fim de diminuir os efeitos adversos causados pelos fármacos antitumorais, e assim contribuir para uma melhor qualidade de vida. A partir das evidências apresentadas, sugere-se que a floretina tenha participação importante tanto na prevenção quanto no tratamento do melanoma, porém, devido a sua baixa solubilidade em água, existem limitações. Acredita-se que o uso nanotecnologia possa ser uma abordagem promissora para viabilizar o uso da floretina topicamente, isto é tanto para produtos dermatológicos quanto para terapêutica.

5. REFERÊNCIAS

- ABKIN, Sergey V. *et al.* Phloretin increases the anti-tumor efficacy of intratumorally delivered heat-shock protein 70 kDa (HSP70) in a murine model of melanoma. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, [S. l.], v. 65, n. 1, p. 83–92, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00262-015-1778-1>
- CHOI, Bu Young. Biochemical basis of anti-cancer-effects of phloretin—a natural dihydrochalcone. **Molecules**, [S. l.], v. 24, n. 2, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules24020278>
- DE OLIVEIRA, Marcos Roberto. Phloretin-induced cytoprotective effects on mammalian cells: A mechanistic view and future directions. **BioFactors**, [S. l.], v. 42, n. 1, p. 13–40, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/biof.1256>
- EBERHARDT, Marian V.; LEE, Chang Yong; LIU, Rui Hai. Antioxidant activity of fresh apples. **Nature**, [S. l.], 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/35016151>
- FUNARI, Cristiano Soleo *et al.* Interconverting flavanone glucosides and other phenolic compounds in *Lippia salviaefolia* Cham. ethanol extracts. **Phytochemistry**, [S. l.], v. 72, n. 16, p. 2052–2061, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.07.004>
- GARBE, Claus *et al.* European consensus-based interdisciplinary guideline for melanoma. Part 1: Diagnostics – Update 2019. **European Journal of Cancer**, [S. l.], v. 126, p. 141–158, 2020.



- Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2019.11.014>
- INCA. **Instituto Nacional de Câncer**. [s. l.], 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma>.
- KOBORI, Masuko *et al.* Phloretin-induced apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells by inhibition of glucose transmembrane transport. **Cancer Letters**, [S. l.], v. 119, n. 2, p. 207–212, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(97\)00271-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(97)00271-1)
- KOBORI, Masuko *et al.* **Phloretin-induced apoptosis in b16 melanoma 4a5 cells and hl60 human leukemia cells**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1271/bbb.63.719>
- LEE, Song Yi *et al.* Application of temporary agglomeration of chitosan-coated nanoparticles for the treatment of lung metastasis of melanoma. **Journal of Colloid and Interface Science**, [S. l.], v. 544, p. 266–275, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.02.092>
- LIN, Yi Pei *et al.* Constituents from the Formosan apple reduce tyrosinase activity in human epidermal melanocytes. **Phytochemistry**, [S. l.], v. 68, n. 8, p. 1189–1199, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.02.001>
- LIU-SMITH, Feng; JIA, Jinjing; ZHENG, Yan. UV-induced molecular signaling differences in melanoma and non-melanoma skin cancer. In: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [S. l.: s. n.]. E-book. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-319-56017-5_3
- MARIADOSS, Arokia V. A. *et al.* Pharmacological Aspects and Potential Use of Phloretin: A Systemic Review. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 19, n. 13, p. 1060–1067, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1389557519666190311154425>
- MISHRA, Harshita *et al.* **Melanoma treatment: from conventional to nanotechnology**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00432-018-2726-1>
- MOON, Hyeongsun *et al.* Melanocyte Stem Cell Activation and Translocation Initiate Cutaneous Melanoma in Response to UV Exposure. **Cell Stem Cell**, [S. l.], 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.09.001>
- NG, Chau Yee *et al.* **Phytochemicals in skin cancer prevention and treatment: An updated review**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms19040941>
- NITHIYA, Tamilarasan; UDAYAKUMAR, Rajangam. *In Vitro* Antioxidant Properties of Phloretin—An Important Phytocompound. **Journal of Biosciences and Medicines**, [S. l.], v. 04, n. 01, p. 85–94, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.4236/jbm.2016.41010>
- ORESAJO, Christian *et al.* Protective effects of a topical antioxidant mixture containing vitamin C, ferulic acid, and phloretin against ultraviolet-induced photodamage in human skin. **Journal of Cosmetic Dermatology**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 290–297, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1473-2165.2008.00408.x>
- PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. **Flavonoids: An overview**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- QIN, Xiaoxiao *et al.* Dihydrochalcone compounds isolated from crabapple leaves showed anticancer effects on human cancer cell lines. **Molecules**, [S. l.], v. 20, n. 12, p. 21193–21203, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules201219754>
- REZK, Bashir M. *et al.* The antioxidant activity of phloretin: The disclosure of a new antioxidant pharmacophore in flavonoids. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 295, n. 1, p. 9–13, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00618-6](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00618-6)
- SHIN, Jun Wan; KUNDU, Joydeb Kumar; SURH, Young Joon. Phloretin inhibits phorbol ester-induced tumor promotion and expression of cyclooxygenase-2 in mouse skin: Extracellular signal-regulated kinase and nuclear factor- κ B as potential targets. **Journal of Medicinal Food**, [S. l.], v. 15, n. 3, p. 253–257, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/jmf.2011.1851>
- SHIN, Seungwoo *et al.* Protective effects of a new phloretin derivative against UVB-induced



damage in skin cell model and human volunteers. **International journal of molecular sciences**, [S. l.], v. 15, n. 10, p. 18919–18940, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms151018919>

SIEGEL, Rebecca L.; MILLER, Kimberly D.; JEMAL, Ahmedin. Cancer statistics, 2020. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [S. l.], 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3322/caac.21590>

SUN, Yanjun *et al.* Sixteen New Prenylated Flavonoids from the Fruit of *Sinopodophyllum hexandrum*. **Molecules**, [S. l.], 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules24173196>

VENTURELLI, Sascha *et al.* 6- and 8-Prenylnaringenin, novel natural histone deacetylase inhibitors found in hops, exert antitumor activity on melanoma cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, [S. l.], 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000495275>

6. AGRADECIMENTOS

FAPERGS, CAPES e CNPq.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Terapias em Saúde

ESTRATÉGIAS PARA O ENFRENTAMENTO DA COVID-19: UMA *OVERVIEW* DE PATENTES SOBRE DIFERENTES TRATAMENTOS

J. A. C. NASCIMENTO Jr^{1,2}, A. M. SANTOS¹, T. de A. ANDRADE^{1,2}, L. J. QUINTANS-
JÚNIOR^{1,2}, C. I. B. WALKER^{1,2}, L. B. PINTO¹, L. A. FRANK³, M. R. SERAFINI^{1,2}

¹ Universidade Federal de Sergipe, Departamento de Farmácia;

² Universidade Federal de Sergipe, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas;

³ Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Farmácia.

E-mail para contato: adaocarv95@gmail.com

RESUMO – Atualmente, com a nova pandemia causada pela a COVID-19, a comunidade científica tem travado uma luta no combate a essa doença. No entanto, ainda não existem medicamentos específicos para tratamento e as terapias de suporte são fortemente recomendadas. Logo, informações contidas em documentos de patentes podem auxiliar na tomada de decisões e guiar pesquisadores com base nos outros coronavírus já estudados. Assim, o presente trabalho teve o objetivo de realizar uma revisão de patentes envolvendo tratamento para SARS e MERS-CoV. A busca foi realizada nas bases de dados de patentes Espacenet e Wipo, e os termos “treatment and coronavirus” foram utilizados nos campos título e resumo. Inicialmente, 35 patentes foram encontradas e após realização de uma triagem, nove documentos foram selecionados. Os tratamentos abordados para SARS e MERS-CoV tinham como alvo proteases e proteínas do vírus. Dentre essas, estavam o uso de anticorpos monoclonais, produtos naturais e reposicionamento de fármacos. Por fim, pode-se concluir que dados obtidos com outros coronavírus podem ser a peça-chave para combater a COVID-19.

PALAVRAS-CHAVE: Coronavírus; Medicamentos; Propriedade Intelectual; SARS-CoV-2; Terapias.

ABSTRACT – Currently, with the new pandemic caused by COVID-19, the scientific community has been fighting to fight this disease. However, there are still no specific drugs for treatment, and supportive therapies are strongly recommended. Therefore, the information contained in patent documents can assist in decision-making and guide researchers based on the other coronaviruses already studied. Thus, the present study aimed to conduct a patent review involving treatment for SARS and MERS-CoV. The search was carried out in the Espacenet and Wipo patent databases, and the terms “treatment and coronavirus” were used in the title and summary fields. Initially, 35 patents were found and after conducting a screening, nine documents were selected. The



treatments addressed for SARS and MERS-CoV targeted virus proteases and proteins. Among these, were the use of monoclonal antibodies, natural products, and drug repositioning. Finally, it can be concluded that data obtained with other coronaviruses may be the key to fighting COVID-19.

KEYWORDS: *Coronavirus; Drugs; Intellectual Property; SARS-CoV-2; Therapies.*

1. INTRODUÇÃO

Os coronavírus (CoVs) são vírus de RNA de fita positiva e genomas relativamente grandes, pertencentes à família *Coronaviridae* e são responsáveis por três surtos que acometeram aos humanos ao redor do mundo. Estes vírus são capazes de infectar o trato respiratório inferior e provocar síndrome respiratória grave. Atualmente, a nova doença pandêmica causada por coronavírus 2019 (COVID-19) é provocada pelo novo coronavírus causador da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2). A COVID-19 apresenta alta patogenicidade e a transmissão se dá através de gotículas expelidas através da fala, tosse e espirro de indivíduos infectados (Chen *et al.*, 2020).

Sabe-se que é possível erradicar pandemias, já que desde a descoberta de medicamentos antivirais no século XX, as doenças tornaram-se menos mortais. Contudo, os fármacos atualmente disponíveis e testados não têm ainda eficácia comprovada contra coronavírus. Além disso, desenvolver antivirais seguros é relativamente difícil, embora estratégias venham sendo utilizadas para tratar a infecção reposicionando fármacos através do uso individual ou em combinação para tratamento da COVID-19 (Nascimento Júnior *et al.*, 2020).

Dessa forma, avaliar possíveis abordagens terapêuticas já submetidas aos outros coronavírus é algo pensável. Assim, as patentes tornam-se instrumentos fundamentais nessa jornada, visto que, cerca de 70% das tecnologias possuem divulgação exclusiva através deste tipo de informação. Adicionalmente, estudos de prospecção de patentes auxiliam no processo de decisão nos âmbitos da ciência, tecnologia e inovação e auxiliam na definição de potenciais rotas para aperfeiçoar produtos e processos já existentes (Cerqueira *et al.*, 2019).

A partir dos pressupostos acima, e do frequente estudo da comunidade científica por alternativas terapêuticas no combate à COVID-19, este trabalho teve como objetivo realizar uma busca de patentes voltadas para tratamentos direcionados ao coronavírus (SARS-CoV-1, MERS-CoV, SARS-CoV-2) a fim de contribuir trazendo uma análise das possíveis abordagens no tratamento da COVID-19.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta revisão de documentos patentes voltadas ao coronavírus, as buscas foram realizadas nas bases de dados do *European Patent Office* (EPO-Espacenet) e *World Intellectual Property Organization* (WIPO) utilizando os termos “*treatment and coronavirus*” nos campos título e resumo. Obteve-se um total de 17 patentes na WIPO e 18 no EPO. Em seguida, os dados obtidos foram submetidos a uma triagem para remoção de patentes duplicatas (14), documentos indisponíveis (4), fora do foco da revisão após leitura de título, resumo e texto completo (8). Ao final, nove patentes foram selecionadas para o estudo. Adicionalmente, algumas patentes encontram-se em período de sigilo de 18 meses após pedido de proteção da invenção e logo não foram incluídas no estudo.



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta revisão, as patentes cobriram um período de ano de 2005 a 2019, tempo de ocorrência dos surtos provocados por coronavírus humanos. Conforme a Figura 1A, a patente mais antiga encontrada foi publicada em 2005, cerca de três anos após o surgimento do primeiro surto causado pelo SARS-CoV. Esse achado pode refletir o fraco interesse da comunidade científica pelo desenvolvimento de tratamentos específicos direcionados aos coronavírus. Com o passar dos anos, com o surto do MERS-CoV em 2012, esse quantitativo não apresentou grande diferença, apesar de que esse outro vírus tenha tido uma maior taxa de mortalidade. Dentre os países que solicitaram a proteção de sua invenção, os Estados Unidos da América lideraram o ranking com três patentes (Figura 1B). Tal fato pode estar atribuído ao grande investimento no desenvolvimento tecnológico e científico deste país. Além disso, como esperado, o setor das indústrias farmacêuticas possuiu forte presença com cinco documentos de patentes, confirmando assim o interesse deste setor no desenvolvimento de drogas para solucionar problemas da sociedade (Figura 1C).

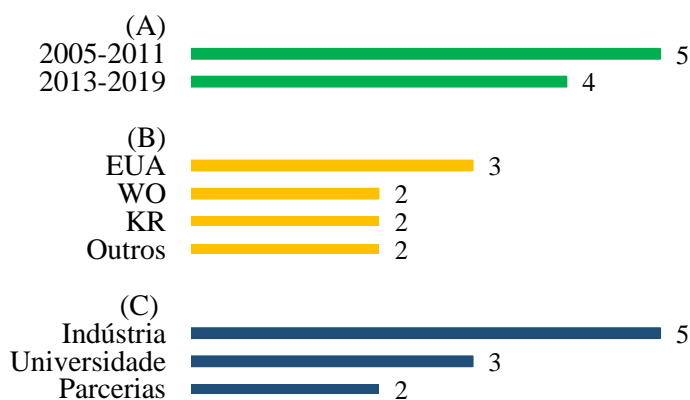


Figura 1 – Seleção final de patentes. (A) Data de publicação; (B) País depositante. EUA: Estados Unidos da América; WO (*World Intellectual Property Organization*); KR: República da Coréia; Outros: Austrália, China e Emirados Árabes. (C) Entidade depositante.

Em se tratando das potenciais terapias para tratamento de coronavírus, as informações coletadas encontram-se resumidas na Tabela 1. Como esperado, grande parte dos tratamentos possuíam como alvo proteases ou proteínas do vírus. Estes compostos buscaram atuar na inibição da ligação do vírus ao receptor de membrana celular, sendo o receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) para SARS-CoV-1 e o receptor dipeptidil peptidase 4 (DPP4) para MERS-CoV (Moss, 2019). Paralelo a isso, estudos já elucidaram que o novo coronavírus também se liga ao receptor da ECA2 para sofrer fusão celular. Em suma, dos tipos de tratamentos encontrados, diversificou-se em produtos naturais, anticorpos monoclonais (mAbs) e reposicionamento de compostos sintéticos. Além disso, grande parte dos ensaios realizados foram *in vitro*, com cultivo de células e infecção viral, e posterior observação da inibição da replicação do vírus.



Tabela 1 – Patentes publicadas para tratamento de coronavírus.

Patente	Tipo coronavírus	Tratamento	Alvo	Ensaio
Naoumov e Von Brunn (2015)	SARS-CoV	Inibidores de ciclofilina	Proteína N	<i>In vitro</i>
Hsu <i>et al.</i> (2009)	SARS-CoV	32 compostos ativos	Não especificado	<i>In vitro</i>
Rosa-Calatrava <i>et al.</i> (2019)	MERS-CoV	Apigenina, Berberina, Monensina	Maturação viral	<i>In vitro</i>
Moss (2019)	MERS-CoV	Domínio de ancoragem sialidase	Receptor DPP4	<i>In vitro</i>
Song <i>et al.</i> (2013)	MERS-CoV	Extrato de ginseng	Protease 3CL	<i>In vivo</i>
Song <i>et al.</i> (2011)	SARS-CoV	Extrato de caqui	Protease 3CL	<i>In vitro</i>
Rudolf e Tathill (2006)	SARS-CoV	Peptídeo α -timosina	Linfócitos T ⁺	<i>In vitro</i>
Yuen <i>et al.</i> (2005)	SARS-CoV	Baicalin e derivados	Protease 3CL	<i>In vitro</i>
Leung <i>et al.</i> (2006)	SARS-CoV	Anticorpos monoclonais	Domínio S2	<i>In vitro</i>

4. CONCLUSÃO

Os coronavírus apresentam particularidades que acometem os seres humanos de diversas formas. No caso da COVID-19, o tratamento desta doença tem gerado um grande desafio para humanidade até hoje. Desta forma, revisamos patentes com tratamentos direcionados aos SARS-CoV e MERS-CoV e verificou-se um leque de alternativas terapêuticas que podem servir de guia para o tratamento da atual pandemia. A utilização de produtos naturais, anticorpos monoclonais e o reposicionamento de fármacos foram alguns dos achados encontrados. Estes tratamentos encontrados nas patentes selecionadas podem contribuir para o desenvolvimento de novas terapias ou mitigação de sintomas. No entanto, reforça-se a necessidade de mais estudos para enfrentamento da COVID-19, pois de fato, possuir conhecimento dos tratamentos de outros coronavírus pode ser uma peça fundamental.

5. REFERÊNCIAS

- CERQUEIRA, T. M. *et al.* Prospecção tecnológica em documentos de patente sobre a fosfoetanolamina associada ao diagnóstico, à prevenção ou ao tratamento do câncer. *Cadernos de Prospecção*, v. 12, 2019.
- CHEN, W-H. *et al.* The SARS-CoV-2 Vaccine Pipeline: an Overview. *Curr. Trop. Med. Rep.*,



2020.

HSU, T-A. *et al.* Treatment of coronavirus infection. Patent US/2009/0149545. 11 Jul. 2009.

LEUNG, K. M. *et al.* Humanized monoclonal antibodies against SARS – associated coronavirus and treatment of patients with SARS. Patent WO/2006/095180. 14 Sep. 2006.

MOSS, R. B. Treatment of Middle East respiratory syndrome coronavirus. Patent US/2019/262432.

NASCIMENTO JÚNIOR, J. A. C. *et al.* SARS, MERS, and SARS-CoV-2 (COVID-19) treatment: a patent review. *Expert Opin. Ther. Pat.*, 2020.

NAOUMOV, N.; VON BRUNN, A. Non-immunosuppressive cyclophilin inhibitors for the treatment of coronavirus infections. Patent WO/2015/161908. 29 Oct. 2015.

ROSA-CALATRAVA, M. *et al.* Antiviral compositions for the treatment of infections linked to coronaviruses. Patent CN/2019/110035767. 19 Jul. 2019.

RUDOLF, A. R.; TATHILL, C. W. Method of treatment or prevention of respiratory coronavirus infection with alfa thymosin peptides. Patent EA/2005/01569. 30 Jun. 2006.

SONG, L. W. *et al.* Composition for preventing or treatment of coronavirus infection and composition for inhibiting the activity of 3C-Like protease comprising *Ecklonia cava*. Patent KR/2011/0086473. 28 Jul. 2011.

SONG, L. W. *et al.* Composition for prevention or treatment of coronavirus infection comprising extracts of *Salvia miltiorrhiza*. Patent KR/2013/0071032. 28 Jun. 2013.

YUEN, K. Y. *et al.* Baicalin and its derivatives as a treatment for SARS coronavirus infection or other related infections. Patent US/2005/215494. 29 Sep. 2005.

6. AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001. Os autores agradecem à CAPES, à FAPITEC/SE e ao CNPq (Brasil) pelo apoio financeiro. Dedicamos este trabalho a todos os profissionais de saúde que morreram ou estão na linha de combate à COVID-19.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Terapias em Saúde

ABORDAGEM TERAPÊUTICA FRENTE AO *Staphylococcus aureus* RESISTENTE À METICILINA

L. S. CAMPOS¹, E. V. BUENO¹, M. D. G. F. NOGUEIRA², A. F. SANTOS³

¹ Discente do curso Farmácia pela Faculdades de Enfermagem Nova Esperança;

² Enfermeira pela Faculdades de Enfermagem Nova Esperança, Mestranda em

³ Enfermeiro pela Faculdades de Enfermagem Nova Esperança, Mestre em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal da Paraíba e Doutorando em Inovação Terapêutica pela Universidade Federal de Pernambuco.

E-mail: Lethiciacampos02@gmail.com

RESUMO – *O uso inadequado e irracional de antibióticos possibilita o desenvolvimento acelerado de cepas bacterianas multirresistentes, tornando-se um obstáculo difícil na terapia farmacológica de doenças infecciosas. Este estudo objetiva identificar as abordagens terapêuticas que podem ser utilizadas em infecções causadas por Staphylococcus aureus resistente à meticilina (MRSA). Trata-se de uma revisão de literatura realizada a partir de uma pesquisa bibliográfica de abordagem qualitativa em estudos e dados de bibliotecas virtuais nacionais e internacionais. Nos últimos anos o MRSA tornou-se um grave problema de saúde pública mundial devido a sua multirresistência aos antimicrobianos, estando relacionada com a alteração na expressão de um gene chamado mecA, desencadeando em baixa afinidade para a ligação dos beta-lactâmicos. As medidas inadequadas de uso, controle de infecção e exposição indiscriminada contínua aos antimicrobianos disponibilizados no mercado resultaram neste grande problema de aquisição e disseminação de MRSA. A utilização do antimicrobiano correto é imprescindível para garantir efetividade no tratamento da infecção e evitar futuras resistência em mecanismo antimicrobianos, como também a necessidade de adoção de medidas que levem a diminuição do surgimento de novas resistências, sendo relevantes para reduzir a mortalidade e favorecer a saúde pública.*

Palavras-chave: Antibióticos; MRSA; Resistência bacteriana; Staphylococcus aureus.

ABSTRACT - *The inappropriate and irrational use of antibiotics enables the accelerated development of multi-resistant bacterial strains, becoming a difficult obstacle in the pharmacological therapy of infectious diseases. This study aims to identify the therapeutic approaches that can be used in infections caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). This is a literature review based on a bibliographic research with a qualitative approach in studies and data from national and international virtual libraries. In recent years MRSA has become a serious public health problem worldwide due to its multidrug resistance to*



antimicrobials, being related to the alteration in the expression of a gene called mecA, triggering in low affinity for the binding of beta-lactams. Inadequate measures of use, infection control and continuous indiscriminate exposure to antimicrobials available on the market resulted in this major problem of MRSA acquisition and dissemination. The use of the correct antimicrobial is essential to ensure effectiveness in the treatment of infection and avoid future resistance in antimicrobial mechanisms, as well as the need to adopt measures that reduce the emergence of new resistance, being relevant to reduce mortality and favor health public.

Keywords: Antibiotics; Bacterial resistance; MRSA; Staphylococcus aureus.

1. INTRODUÇÃO

O uso inadequado e irracional de antibióticos possibilita o desenvolvimento acelerado de cepas bacterianas multirresistentes, tornando-se um obstáculo difícil na terapia farmacológica de doenças infecciosas (ANGLES, 2018).

Segundo estimativas da OMS, a cada ano até 2050 irão ocorrer 10 milhões de mortes desencadeadas por microrganismos multirresistentes, tornando a resistência antimicrobiana uma das maiores ameaças à saúde pública mundial, necessitando de medidas preventivas e terapêutica eficazes diante destes patógenos (OPAS, 2019; REZENDE-JÚNIOR *et al.*, 2020).

A resistência é um acontecimento ecológico que deriva de mutações, seleções e transduções. Essas modificações podem acontecer como uma resposta da bactéria à utilização de antibióticos e a sua presença no ambiente, que pode levar a mudança nos genes de linhagens bacterianas do mesmo gênero ou de gêneros diferentes (TEIXEIRA; FIGUEIREDO; FRANÇA 2019).

Os microrganismos multirresistentes são frequentemente associados a infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e sua ocorrência mostra-se em crescimento acentuado em todo o mundo, sendo este aumento de microrganismos resistentes aos antimicrobianos de amplo espectro, desencadeando em IRAS de difícil tratamento, conseqüentemente aumentando a morbimortalidade, o tempo de internação e os custos com o tratamento destes pacientes (NOGUEIRA *et al.*, 2016).

Dentre as bactérias de importância clínica, está a espécie *Staphylococcus*, uma bactéria de grande importância devido ao seu fator de virulência, capacidade de difusão, grande susceptibilidade a diversas drogas e alta capacidade de adquirir resistência a medicamentos por desenvolver diversos mecanismos, como bombas de efluxo e produção de enzimas inativadoras de antimicrobianos, sendo geralmente encontrados na pele e mucosas nasais de indivíduos saudáveis. Além disso, sua alta prevalência e patogenicidade tem a capacidade de causar infecções em pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos (HANIF; HASSAN 2019; SOUSA *et al.*, 2020).

Uma das formas de tratamento disponíveis na terapêutica para infecções por esse microrganismo é a meticilina ou oxacilina, porém um ano após a sua introdução no mercado, foram encontradas cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina, prevalecendo até os dias atuais (OLIVEIRA, 2019).

Inicialmente as infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) estavam limitadas apenas a hospitais, mas logo depois começaram a aparecer infecções causadas por essa estirpe na comunidade, o que levou a diferenciação de MRSA adquirida no hospital (HA-MRSA) e adquirida na comunidade (CA-MRSA) (FREITAS *et al.*, 2016).



As principais diferenças entre essas duas estirpes estão nas suas manifestações clínicas e no perfil de resistência aos antimicrobianos, onde HA-MRSA é mais resistente a diversas drogas, e está associada a infecções da corrente sanguínea e respiratórias. Já o CA-MRSA, que está associada a infecções de pele e tecidos moles e exibe uma maior sensibilidade aos antibióticos (FREITAS et al., 2016; GOMES, 2017).

A importante atenção dada ao MRSA, não está apenas associada a sua resistência idiossincrática às penicilinas e cefalosporinas, mas também pelo seu alto padrão de resistência a outros antibióticos e em sua fácil transmissibilidade (FERNÁNDEZ; BORREGO 2019).

Diante do exposto é notório que existem dificuldades em desenvolver uma terapia eficiente em pacientes que estão acometidos por infecções causadas pelo MRSA. Pelos diversos mecanismos apresentados por essa bactéria, o arsenal de antibacterianos está cada vez mais escasso dificultando o tratamento, restando apenas poucas opções terapêuticas no mercado. Sendo assim, este estudo tem por objetivo identificar as abordagens terapêuticas que podem ser utilizadas em infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina, a partir de dados disponíveis na literatura atualmente.

2. METODOLOGIA

Trata-se de uma revisão de literatura de abordagem qualitativa, exploratória, descritiva realizada em estudos e dados indexados em bases de dados e bibliotecas virtuais nacionais e internacionais, sendo o *PubMed*, *ScienceDirect* e o *Google Scholar* as escolhidas. Foram utilizados, para busca de estudos, os seguintes descritores: MRSA, *Staphylococcus aureus* resistente à metilina, antibioticoterapia, infecções hospitalares multirresistentes.

Os critérios de inclusão foram estudos completos, publicados em língua inglesa e portuguesa que abordam temas como, infecções por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina e suas respectivas características, curiosidades e abordagem terapêutica, bem como estão indexados nos referidos bancos de dados e foram publicados nos últimos 10 anos (2011-2020). Já os critérios de exclusão foram estudos repetidos, incompletos, duplicados, indisponíveis e que não abordam o tema proposto.

A análise dos estudos selecionados, em relação ao delineamento de pesquisa, forneceu tanto a síntese quanto a análise dos dados extraídos dos estudos selecionados, sendo realizadas de forma descritiva, possibilitando observar, descrever, contar e classificar os dados, visando reunir o conhecimento produzido sobre o tema explorado na revisão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Procura literária

As pesquisas eletrônicas resultaram em 587 estudos encontrados. Após inserir os critérios de inclusão e exclusão previamente estabelecidos, a amostra final do estudo finaliza-se com 22 estudos científicos, destes 7 (31.8%) foram encontrados no PubMed, 2 (9.1%) no ScienceDirect e 13 (59.1%) no Google Scholar. A bases de dados Google Scholar prevaleceu devido a relevância e abundância de estudos disponibilizados, predominando diante dos critérios de inclusão e exclusão estabelecidos.



3.2 Mecanismo de resistência do *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

Nos últimos anos o MRSA tornou-se um grave problema de saúde pública mundial devido a sua multirresistência aos antimicrobianos, e inclusive aos antissépticos e desinfetantes. Foi descrito pela primeira vez na literatura em 1961 e desde então foram ocorridos vários surtos em diferentes países, surgindo cepas com novas linhagens multirresistentes, levando a uma calamidade mundial que ainda está acontecendo nos dias atuais (TONG *et al.* 2015, GAJDÁCS, 2019; LAKHUNDI; ZANG, 2018; NASCIMENTO, 2019).

A resistência presente no MRSA está relacionada com a alteração na expressão de um gene chamado *mecA*, que codifica a síntese de uma proteína de ligação à penicilina chamada PBP2a, desencadeando em baixa afinidade para a ligação dos beta-lactâmicos com a bactéria, que não é encontrada em isolados de estafilococos sensíveis e também a hiperprodução de betalactamases (NASCIMENTO; OLIVEIRA 2016; FERNÁNDEZ; BORREGO 2019).

Este mecanismo é principalmente ligado ao gene *mecA*, que é um gene adquirido e tem acarretado em mais dois genes que regulam a sua expressão, sendo eles *mecR1* e *mecI* (OLIVEIRA, 2019). Tornando a resistência praticamente completa a todos antibióticos beta-lactâmicos incluindo as penicilinas semi-sintéticas, como a oxacilina (FERNÁNDEZ; BORREGO 2019).

As PBPs (Penicillin Binding Protein) são enzimas responsáveis pelas ligações cruzadas, entre as moléculas de peptidoglicano para a construção da parede celular bacteriana, e os locais de ação dos antimicrobianos beta-lactâmicos (SIQUEIRA, 2017).

O grupo MLS_B são drogas quimicamente diferentes constituídos pelas classes farmacológicas, macrolídeos (eritromicina, azitromicina, claritromicina) lincosamidas (clindamicina), e estreptogramina do grupo B (dalfopristina e quinupristina), mas que apresentam mecanismo de ação semelhante atuando na inibição da síntese protéica, pela ligação no receptor 23s do mRNA. A resistência do *S. aureus* a esse grupo é conhecida desde 1956, logo após a introdução da eritromicina na prática clínica, onde a resistência a essas drogas ocorre por três mecanismos distintos: efluxo ativo ou inativação enzimática da droga e modificação no alvo de ligações do ribossomo (SIQUEIRA, 2017). Essa resistência pode ser constitutiva (MLS_{Bc}), apresentando resistência a clindamicina e a eritromicina ou induzível (MLS_{Bi}), onde esse fenótipo apresenta resistência a eritromicina e uma falsa sensibilidade a eritromicina (OLIVEIRA, 2019).

3.3 Infecções desencadeadas por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

As infecções desencadeadas por MRSA são consideradas um problema grave de saúde pública podem ocorrer na comunidade, como também ser adquirida em âmbito hospitalar, sendo a mais predominante, este microrganismo são altamente provido de alta virulência e toxinas, sendo tanto de forma sintomática, quanto assintomática e podem ser graves e crônicas, promovendo sérias consequências clínicas no indivíduo, podendo afetar a pele, a corrente sanguínea, os tecidos moles e o trato respiratório inferior (LAKHUNDI; ZANG, 2018).

As infecções hospitalares ocorridas por MRSA causam um aumento significativo, na morbimortalidade de pacientes internados, resultando em expressivo aumento no custo de internações hospitalares, visto que após a instalação do microrganismo neste ambiente, a erradicação é de dificilmente realizada, resultando em risco ao paciente internado. Além disso, a possibilidade de infecções relacionadas à materiais médicos hospitalares perfurocortantes são relevantes, por facilitar a promoção de infecção na corrente sanguínea de nível grave e profunda, como endocardite e osteomielite (MUNITA; ARIAS, 2016; GOMES, 2017).

Atualmente a terapêutica utilizada para o tratamento de infecções causadas por *S. aureus* varia de acordo com a cepa que está presente no paciente, que é auxiliada pelos testes de susceptibilidade antimicrobiana. E também pelo tipo de infecção, se é uma infecção comunitária

ou hospitalar, nessa última a maioria das cepas apresentam certo grau de resistência, sendo assim a primeira escolha de tratamento irá de acordo com essa resistência (CORRÊA; MOURA 2018; GAJDÁCS, 2019).

3.4 Antimicrobianos frente ao *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

Durante anos a droga de primeira escolha para o tratamento de MRSA eram os Glicopeptídeos, como a vancomicina e teicoplanina, que atuam sobre a parede celular bacteriana. Mas com a difusão das cepas de MRSA houve um aumento de protocolos para o tratamento empírico e direcionado, o que inevitavelmente causou redução da sensibilidade dessas cepas e o aparecimento dos primeiros achados isolados com resistência a essa classe de fármacos (CASANOVA *et al.*, 2018).

Esses isolados foram nomeados de acordo com a resistência expressa por eles, *S. aureus* intermediário para vancomicina (VISA) e *S. aureus* resistente a vancomicina (VRSA) (ZURITA; MEJIA; GUZMÁN-BLANCO 2010). Com o surgimento de cepas resistentes a vancomicina, as Oxazolidinonas (linezolida), surgiu como uma alternativa terapêutica para MRSA e VISA, sendo o primeiro dessa classe aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration), para o tratamento de pneumonias nosocomiais e adquiridas na comunidade, e infecções de pele, tecidos moles e ósseo causados por esse microorganismo, também possui uma boa utilização em paciente diabéticos (LOPES, 2014; FREITAS *et al.*, 2016; CASANOVA, 2018).

Segundo Siqueira (2017), os antimicrobianos que apresentam boa atividade para o tratamento de infecções causadas por MRSA são diversos, clindamicina, doxiciclina, sulfametoxazol/trimetopim, quinolonas e rifampicina. Para infecções clínicas mais graves são utilizados a vancomicina, linezolida e daptomicina. Outros antimicrobianos também parecem ter boa atividade contra cepas de MRSA como tetraciclina e fluoroquinolonas, e também estão sendo utilizadas associações de quinupristina-dalfopristina nessas infecções, assim conforme mostrado na figura-1.

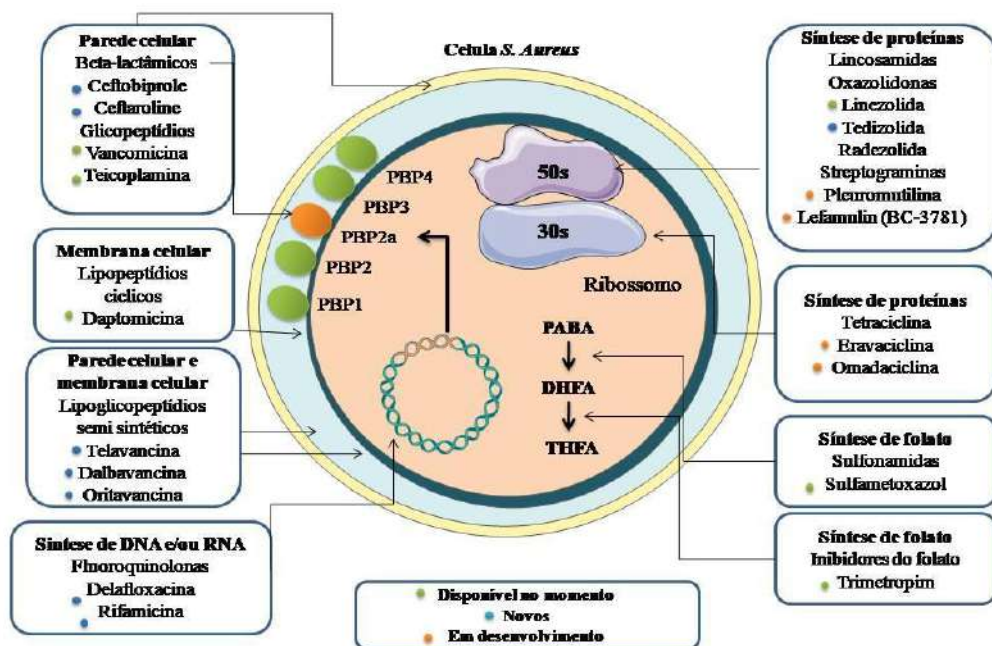


Figura 1 - Alvos bacterianos de antibióticos ativos contra MRSA e drogas terapêuticas utilizadas, em desenvolvimento e novas drogas. Fonte: Adaptado de LEE, 2018.



Outros antibióticos utilizados são da classe Lincosamidas (clindamicina), que é muito empregada em infecções causadas por *Staphylococcus ssp.* ou outras espécies estafilocócicas, em tecidos e pele. A clindamicina apresenta boa atividade no local da infecção, possuindo a capacidade de inibir os fatores de virulência do MRSA, e é uma alternativa para pacientes alérgicos a penicilinas (NASCIMENTO; OLIVEIRA 2016, SIQUEIRA, 2017).

Sobre os CA-MRSA inicialmente mostram-se resistentes aos beta-lactâmicos e a eritromicina, a clindamicina mostra-se uma boa alternativa terapêutica, mas com os crescentes relatos de *S. aureus* resistentes surgiram dúvidas com relação ao seu uso universal nessas infecções. Porém, a associação de sulfametoxazol/trimetropim mostrou boa atividade *in vitro* frente à maioria dessas cepas, mas ainda não existe seu uso em casos graves garantido de forma conclusiva por estudos clínicos randomizados (MIMICA, 2011).

Outra classe de fármacos que foi sintetizada para expansão do tratamento, por microrganismos multirresistentes é a Glicilciclina (tigeciclina), que atua inibindo a tradução protéica aderindo-se a subunidade 30s. É considerada a terceira principal indicação para o tratamento das infecções causadas por MRSA, quando outras drogas existentes não possam ser utilizadas. A mesma não tem sua atividade reduzida pelos principais mecanismos de resistência bacteriana como: Beta-lactamases, bombas de efluxo, modificação no sítio alvo. Portanto mostrando-se eficaz *in vivo* e *in vitro* frente a diversos microrganismos multirresistentes (LOPES, 2014; NASCIMENTO; OLIVEIRA 2016).

A Daptomicina da classe dos lipopeptídeos vem tornando-se uma opção para a terapêutica de infecções causadas por bactérias gram-positivas multirresistentes incluindo MRSA e VISA. Tem indicação para ser empregada naqueles pacientes com endocardite bacteriana e bacteremia, mas é contra indicada em pneumonias por ser inativada por surfactantes pulmonares. É uma droga bactericida dependente de concentração, tem uma ação mais rápida que a vancomicina, nafcilina e linezolid e além disso é descrito que a daptomicina é de 4 a 8 vezes mais ativa que a vancomicina e 30 vezes mais que a linezolid frente a MRSA e a MSSA (*Staphylococcus aureus* suscetível à meticilina) (LOPES, 2014; CASANOVA, 2018).

Alguns antibióticos em fase de investigação também estão inclusos no tratamento de MRSA, como as cefalosporinas (LOPES, 2014).

Uma nova droga da classe das Cefalosporinas de 5º geração (ceftobiprole), de amplo espectro demonstrado *in vitro*. Possui uma alta afinidade pelas proteínas mutadas responsáveis pela resistência a beta-lactâmicos em *S. aureus* e Pneumococos, e pelas proteínas PBPs nas bactérias Gram-negativas. Na Europa, o ceftobiprole foi licenciado, para o tratamento de pneumonia adquirida na comunidade e no hospital, excluindo a associada a ventilação mecânica, contudo existem alguns estudos para a indicação dessa droga à outras infecções, sendo uma possível opção terapêutica para o tratamento de bactérias multirresistentes. Outra droga da mesma classe que recentemente foi aprovada pelo FDA, que tem ação sobre o MRSA é a Ceftarolina (MIMICA, 2011; TASCINI *et al.*, 2019).

3.5 Novos possíveis antimicrobianos frente ao *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

As medidas inadequadas de uso, controle de infecção e exposição indiscriminada contínua aos antimicrobianos disponibilizados no mercado resultaram neste grande problema de aquisição e disseminação de MRSA. Por sua vez, isso limita a escolha do tratamento para infecções por MRSA. Visto que o MRSA desenvolveu resistência à maioria dos antibióticos usados no



tratamento de suas infecções. Neste contexto, a indústria farmacêutica vem buscando acompanhar e obter respostas frente as resistências microbianas, com o desenvolvimento de novas drogas e a modificação das que já existem no mercado (LAKHUNDI; ZANG, 2018; COSTA, 2019).

Entre 2013 e 2017 houve novos registros de antibióticos aprovados pela FDA, sendo eles: Telavancina, Dalbavancina, Tedizolida, Oritavancina, Bezloxumab, Delafloxacin e as associações Ceftolozana-Tazobactam, Caftazidima-Avibactam. Destes o Ceftalozana com Tazobactam, que foi aprovado pelo FDA em 2014, já encontra-se comercializado no Brasil, apresenta eficácia contra bactérias resistentes apresentando diversas indicações, como infecções urinárias e infecções intra-abdominais de maior complexidade (ROCHA; PRADO; TAKETANI 2019).

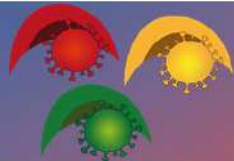
De acordo com Rocha, Prado e Taketani (2019) uma nova classe terapêutica foi descoberta, as Malacidinas que são lipopeptídeos cíclicos cálcio dependentes, que atuam na integridade da membrana celular, mas em um sítio de ação diferente dos outros antibióticos que agem pelo mesmo mecanismo, o que despertou interesse para a descoberta de novos antibióticos com mecanismo de ação e potencial terapêutico diferente dos já existentes. Em testes *in vivo* a malacidina mostrou uma atividade terapêutica excelente frente a MRSA, atingindo cura completa do animal e mostrou baixa toxicidade e atividade hemolítica nas concentrações mais altas testadas.

4. CONCLUSÃO

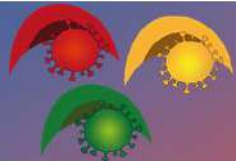
A utilização de antimicrobianos de forma correta é imprescindível para garantir efetividade no tratamento da infecção, e evitar futuras resistências, sejam desenvolvidas ou adquiridas por esses microorganismos. A literatura descreve classes de medicamentos específicas para promoção do tratamento frente ao MRSA, como as oxazolidinonas, gliciliclinas e os lipopeptídeos, mas que a escolha terapêutica sempre dependerá da sensibilidade do microrganismo a droga. Estes sempre necessitam serem acompanhados por critérios para a sua escolha, a partir do estado clínico do paciente, visando o melhor antibiótico, como também adoção de medidas que levem a diminuição do surgimento de novas resistências, sendo pertinentes e relevantes para reduzir a mortalidade tanto em pacientes internados como na comunidade, e assim, favorecer uma melhor qualidade da saúde pública.

5. REFERÊNCIAS

- ANGLES, E. Uso racional de antimicrobianos y resistencia bacteriana:¿ hacia dónde vamos?. *Ver. Med. Her.*, v. 29, n. 1, p. 3-4, 2018.
- RVALHO, K.A. Resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. 2017.
- CASANOVA, N.G. *et al.* Bases moleculares de la resistencia a daptomicina en *Staphylococcus aureus*. 2018.
- CORRÊA, R.M. *Staphylococcus aureus* multirresistentes: da virulência a novas alternativas farmacológicas. 2018.
- DO MONTE, P.R.A. *et al.* Pesquisa de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) em metrô da região metropolitana do Recife-PE. *Psico Sau Deba*, v. 5, n. 2, p. 43-51, 2019.
- FERNÁNDEZ, M.C.M.; BORREGO, M.C.C. Vigilancia microbiológica de la resistencia bacteriana en "*Staphylococcus*" meticilina resistente. Hospital Universitario General Calixto García. Años 2015-2017. *Pano Cub y Sal*, v. 14, n. 1, p. 33-40, 2019.



- FREITAS, A. *et al.* Abordagem terapêutica nas infecções por *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina. *Gaze Médi*, 2016.
- GOMES, T.R. Resistência induzível ou constitutiva MLSb em isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes à Meticilina. 2017.
- LAKHUNDI, S.; ZHANG, K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clinic microbi revie*, v. 31, n. 4, 2018.
- LEE, A.S. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat. Revi. Dis. Pri.*, v. 4, n. 1, p. 1-23, 2018.
- LOPES, Hélio Vasconcellos. Novos tratamentos para o *Staphylococcus Aureus* Meticilino-resistente. *Rev. panam. infectol*, p. 77-78, 2014.
- MIMICA, M.J. Ceftobiprole: uma nova cefalosporina com ação contra *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina. *Arqu. Méd Hosp. Facul. Ciên. Méd. As. Ca. S. Pau.*, v. 56, n. 2, p. 107-111, 2018.
- MUNITA, J.M.; ARIAS, C.A. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microb. Spec.*, v. 4, n. 2, 2016.
- REZENDE-JÚNIOR, L. M. *et al.* Chalcones Isolated from *Arrabidaea brachypoda* Flowers as Inhibitors of NorA and MepA Multidrug Efflux Pumps of *Staphylococcus aureus*. *Anti.*, v. 9, n. 6, p. 351, 2020.
- SIQUEIRA, C.P. Perfil de resistência em isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina em um hospital municipal. 2017. 21 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.
- TASCINI, C. *et al.* Ceftobiprole for the treatment of infective endocarditis: a case series. *Jour. of Glo. Antim. Resis*, v. 20, p. 56-59, 2020.
- TONG, S. Y. C. *et al.* *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin. Microb. Rev.*, Washington, v. 28, n. 3, p. 603-661, jul. 2015
- NASCIMENTO, T. H. D. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana de *Momordica charantia* L, contra *Staphylococcus aureus*. *Ver. Ter. & Cul: Cad de Ens e Pesq, Lon*, v. 34, n. 67, p. 31-42, 2019.
- OLIVEIRA, S.N. Prevalência de *Staphylococcus aureus* em jalecos de graduandos e profissionais da saúde na Universidade Federal de Uberlândia. 2019. 28 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.
- Resistência bacteriana, Organização panamericana de saúde. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5592:novos-dados-revelam-niveis-elevados-de-resistencia-aos-antibioticos-em-todo-o-mundo&Itemid=812. Acessado em 15 jul 2020.
- ROCHA, M. A.; PRADO, R.; TAKETANI, N. F. Malacidinas: uma nova classe de antibióticos e seu potencial terapêutico. *Ens. USF*, v. 1, n. 2, p. 14-22, 2019.
- ZURITA, J.; MEJIA C.; GUZMÁN-BLANCO, M. Diagnóstico e teste de sensibilidade para *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina na América Latina. *The Brazilian Journal Infectious Diseases*. Salvador, v.14, n.2, p.97-107, dez. 2010.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Terapias em Saúde

ATUAÇÃO DO FISIOTERAPEUTA NA ASSISTÊNCIA EM PACIENTES QUE POSSUEM DOENÇAS CARDIOVASCULARES E CONTRAÍRAM A COVID-19

M. F. da SILVA¹, H. N. da SILVA¹, M. C. A. WANDERLEY² e R. L. N. GODONE^{1,3}

¹ Faculdade Uninassau, Campus Caruaru-PE

² Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife-PE

³ Secretaria de Educação de Pernambuco, Recife-PE

E-mail para contato: fernanda16062001@gmail.com

RESUMO – A covid-19 é uma doença causada pelo coronavírus, denominada de SARS-CoV-2, onde a sua fisiopatologia é semelhante a SARS-CoV-1, que foi a causadora da epidemia de 2002. Pessoas que contraem a covid-19 possuem sintomas como: arritmias, isquemia miocárdica, miocardite e choque, que pode piorar a situação de pessoas que já possuem problemas cardiovasculares, que estão dentro do grupo de risco da atual pandemia, que também apresentam deficiência no seu sistema imunológico. Onde além dessas complicações, mesmo depois de curado, o vírus deixa sequelas, precisando assim de uma reabilitação com um fisioterapeuta cardiovascular. O objetivo do trabalho é ressaltar a importância que os fisioterapeutas têm nos cuidados dos acometidos pelo vírus da covid-19 que já possuem uma doença cardiovascular. A metodologia foi utilizada na ordem qualitativa, método descritivo e a metodologia de pesquisa bibliográfica. Os critérios de inclusão foram materiais relacionados ao tema, e as bases de dados Scielo, PubMed tratado sobre o novo coronavírus. É essencial que aqueles que apresentam problemas cardiovasculares sigam as orientações de prevenção contra o coronavírus, e caso contraia, se trate durante e depois da doença com um fisioterapeuta cardiovascular, pois será necessário tanto no tratamento, quanto na reabilitação, com a promoção de exercícios.

Palavras-chaves: Reabilitação. Coronavírus. Fisioterapia cardiovascular.

ABSTRACT - Covid-19 is a disease caused by the coronavirus, called SARS-CoV-2, where its pathophysiology is similar to SARS-CoV-1, which was the cause of the 2002 epidemic. People who contract covid-19 have symptoms such as arrhythmias, myocardial ischemia, myocarditis and shock, which can worsen the situation of people who already have cardiovascular problems, who are within the people at risk of the current pandemic, who also have deficiencies in their immune system. Where in addition to these complications, even after being cured, the virus leaves sequelae, thus needing rehabilitation with a cardiovascular physiotherapist. The objective of the work is to emphasize the importance that physiotherapists have in the care of those affected by the covid-19 virus who already have cardiovascular disease. The methodology was used in the qualitative



order, descriptive method and bibliographic research methodology. The inclusion criteria were material related to the theme, and the Scielo, Lillacs, PubMed databases treated on COVID-19. It is essential that those who have cardiovascular problems follow the prevention guidelines against the coronavirus, and if they contract it, treat them during and after the disease with a cardiovascular physiotherapist, as it will be necessary both in the treatment and in the rehabilitation, with the promotion of Exercises.

Keywords: Rehabilitation. Coronavirus. Cardiovascular physiotherapy

1. INTRODUÇÃO

Infecções respiratórias são comuns em todo o mundo e o novo coronavírus 2019 (COVID-19) é um vírus que foi identificado na China, causando sintomas parecidos com os de uma gripe comum. Porém, pacientes com COVID-19 podem necessitar de cuidados intensivos, por ser altamente contagiosa, a COVID-19 se tornou um problema de saúde pública mundial. A transmissão do vírus de humano para humano ocorre, aproximadamente, 2 a 10 dias antes do indivíduo se tornar sintomático, dificultando o controle da disseminação do vírus. (DE VITIS., 2020).

A COVID-19 sendo causadora da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2), que provoca um comprometimento respiratório, faz com que o sistema cardiovascular seja bastante afetado por essas condições e, muitas vezes, é o responsável por complicações e mortalidade desses pacientes (COSTA et al, 2020). Profissionais da saúde indicam que pessoas com doenças cardiovasculares e idosos são mais propensos a desenvolver estas complicações, devido a apresentações de deficiência no sistema imunológico, ou seja, diante do coronavírus correm um risco maior de progredir para complicações mais sérias da doença (TAN e ABOULHOSN, 2020). Essas complicações cardiovasculares evidenciadas nos pacientes com COVID-19 resultam de vários mecanismos, que vão desde lesão direta pelo vírus até complicações secundárias à resposta inflamatória e trombótica desencadeada pela infecção. O cuidado adequado do paciente com COVID-19 exige atenção ao sistema cardiovascular em busca de melhores desfechos. (J. COSTA et al, 2020).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho trata de uma revisão da literatura, que é um tipo de pesquisa elaborada a partir de material já publicado, constituído, principalmente de artigos científicos. Este estudo apresenta uma abordagem qualitativa e descritiva sobre a importância da fisioterapia na assistência de cardiopatas com COVID-19, utilizando as bases de dados de textos e artigos como PubMed e SciELO. Nesse processo, foram encontrados apenas 11 artigos sobre o tema abordado e, desses, foram utilizados 6 artigos, publicados no período entre 2017 a 2020 por tratarem de aspectos relevantes sobre o assunto.

Para proceder as eventuais buscas, utilizaram-se os descritores: Fisioterapia; Doenças cardíacas; Infecções por coronavírus. Diante dos seguintes critérios de inclusão e exclusão, são eles inclusão: presença dos descritores escolhidos no título do trabalho, artigos publicados de 2017 a 2020 e artigos disponíveis na íntegra. Foram critérios de exclusão: artigos repetidos e artigos que não abordavam o tema deste estudo. Para análise e interpretação dos dados, utilizou-se leitura minuciosa e crítica de cada estudo.



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Toda a pesquisa foi realizada nas bases de dados já mencionada teve o intuito de facilitar a integração dos estudos seguindo a linha de raciocínio, sobre o trabalho do profissional de fisioterapia na rede de assistência ao paciente portador de doença cardiovascular acometido de COVID-19. Foram identificados 11 artigos. Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão a amostra final do estudo foi composta por 6 artigos.

Ao analisarmos a natureza metodológica dos trabalhos encontramos: 01 trabalho de revisão de literatura, 02 trabalhos do tipo descritivo, 01 trabalho do tipo estudo de caso, 02 estudos qualitativo. O período de publicação dos trabalhos analisados foi entre 2017 a 2020, sendo que o ano de 2020 foi identificado o maior número de publicações (n=05).

Dados recentes da pandemia da COVID-19 descrevem que o vírus pode afetar o sistema cardiovascular com manifestações diversas como injúria miocárdica, insuficiência cardíaca (IC), síndrome de Takotsubo (ST), arritmias, miocardite e choque. O dano ao sistema cardiovascular é provavelmente multifatorial e pode resultar tanto de um desequilíbrio entre alta demanda metabólica e baixa reserva cardíaca, quanto de inflamação sistêmica e trombogênese, podendo ainda ocorrer por lesão direta cardíaca pelo vírus. Esse dano ao sistema cardiovascular decorrente da COVID-19 ocorre principalmente nos pacientes com fatores de risco cardiovascular (idade avançada, hipertensão e diabetes) ou com doença cardiovascular (DCV) prévia (I. COSTA, 2020). Mesmo havendo estudos sugerindo que alguns medicamentos que atuam para manter a saúde do coração estes podem agravar quadros de coronavírus, porém não se pode suspender o seu uso de forma abrupta e sem recomendação médica, pois pode elevar o risco ainda mais para o paciente. Por outro lado, dados apontam que o COVID-19 pode atingir o coração e provocar sequelas cardiovasculares (TAN e ABOULHOSN, 2020).

Segundo dados da Sociedade Brasileira de Cardiologia 2020 (SBC), alguns pacientes com coronavírus podem apresentar: Arritmias (atinge 16% dos infectados pelo vírus): desde benignas até as mais graves; Isquemia miocárdica (afeta 10% dos doentes): angina ou infarto do miocárdio; Miocardite (7,2% dos doentes): inflamação do músculo do coração, chamado de miocárdio. As causas são muitas, desde as infecções por diversos vírus, bactérias, protozoários (da Doença de Chagas), alguns medicamentos, várias doenças autoimunes, elevado consumo de álcool, cocaína, maconha e outras drogas; Choque (1-2% dos doentes): quando uma infecção se alastra pelo corpo rapidamente e atinge vários órgãos que vão deixando de funcionar e a pressão arterial vai caindo a níveis muito baixos, levando à morte (FIGURA 1).

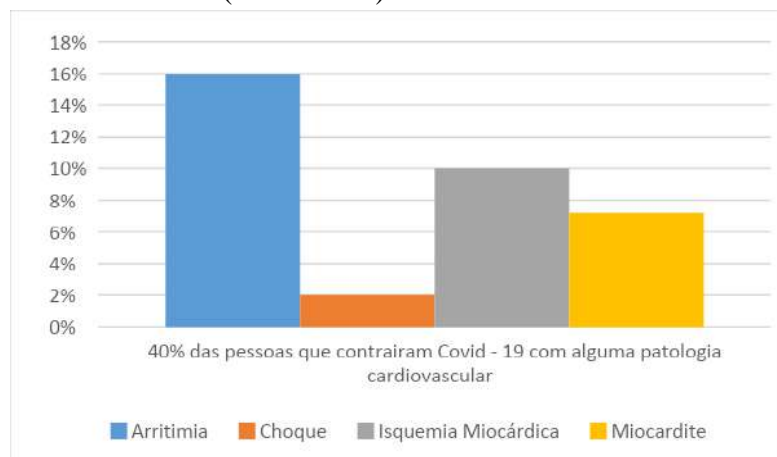


Figura 1: Manifestações no sistema cardiovascular causadas pelo coronavírus.

Fonte: Adaptado de COSTA et al., 2020.



De acordo com os riscos apresentados pelo coronavírus, o fisioterapeuta como um profissional na linha de frente irá adaptar o paciente à ventilação mecânica, programando o ventilador de forma adequada; realizando a pronação (posicionamento de barriga para baixo) deste paciente quando necessário; objetivando uma melhor oxigenação pulmonar; irá avaliar exames laboratoriais e de imagem para analisar a evolução do paciente, também irá realizar a aspiração de resíduos pulmonares, que podem dificultar a respiração do paciente (SILVA et al., 2020).

Nos pacientes hospitalizados, a atividade física deve ser controlada de forma que a frequência cardíaca permaneça em < 60% do máximo para a faixa etária (p. ex., cerca de 160 bpm para indivíduos de 60 anos). Após a sua alta o paciente deverá continuar sua reabilitação, pois apesar dos exercícios praticados enquanto estava internado, será imprescindível uma reabilitação, pois o covid-19 causará consequências em seu sistema cardiovascular. Essa reabilitação cardíaca visa ajudar os pacientes a manter ou recuperar a independência, durante essa reabilitação o fisioterapeuta irá realizar exercícios, que pode envolver caminhada em esteira ou em uma bicicleta estacionária. (MOROZ, 2017).

4. CONCLUSÃO

Em virtude do que foi mencionado, é imprescindível que aqueles que apresentam alguma doença crônica, como os problemas cardiovasculares, se conscientizem e sigam as orientações de prevenção contra o coronavírus, e para aqueles que já contraíram o vírus será imprescindível continuar a reabilitação com um fisioterapeuta cardiovascular mesmo após a sua alta, pois será necessário um monitoramento em relação às possíveis sequelas ocasionadas pela covid-19.

5. REFERÊNCIAS

- COSTA, I. B. S. S. et al. (2020). O Coração e a COVID-19: O que o Cardiologista Precisa Saber. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 114, n. 5, p. 805-816.
- COSTA, J. A., SILVEIRA, J. D. A., SANTOS, S. C. M. D., & NOGUEIRA, P. P. (2020). Implicações Cardiovasculares em Pacientes Infectados com Covid-19 e a Importância do Isolamento Social para Reduzir a Disseminação da Doença. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 114(5), 834-838.
- DE VITIS R, PASSIATORE M, PERNA A, PROIETTI L, TACCARDO G. (2020). COVID-19 contagion and contamination through hands of trauma patients: what risks and what precautions?. *J Hosp Infect.* 2020;105(2):354-355. doi:10.1016/j.jhin.2020.03.037.
- MOROZ A. (2017). Reabilitação cardiovascular. Manual MSD Versão para Profissionais de Saúde. Disponível em: < <https://www.msmanuals.com/pt/profissional/tópicos-especiais/reabilitação/reabilitação-cardiovascular>>.
- SILVA, C. M., SILVA, A. D. N. A., NEPOMUCENO, B., XAVIER, D. S., LIMA, E., GONZALEZ, I., ... & DA SILVA, R. (2020). Evidências científicas sobre Fisioterapia e funcionalidade em pacientes com COVID-19 Adulto e Pediátrico. *J Hum Growth Dev*, 30(1), 148-155.
- TAN W, ABOULHOSN J. (2020) The cardiovascular burden of coronavirus disease 2019 (COVID-19) with a focus on congenital heart disease. *Int J Cardiol.* 2020 ;309:70-77. doi:10.1016/j.ijcard.2020.03.063.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Terapias em Saúde

PRÁTICAS INTEGRATIVAS E COMPLEMENTARES DURANTE A PANDEMIA DA COVID-19: DESAFIOS PARA A CONTINUIDADE DOS CUIDADOS COM A SAÚDE ATRAVÉS DE PLATAFORMAS DIGITAIS

R. V. L. da SILVA¹, M. J. S. de ARAÚJO¹, M. MATWIJSZYN² e K. P. RANDAU¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas; Laboratório de Farmacognosia.

² Serviço Integrado de Saúde – SIS, Prefeitura da Cidade do Recife.

E-mail para contato: rodrigo_luzsilva@hotmail.com

RESUMO – *Práticas Integrativas e Complementares em Saúde (PICS), são métodos de cuidado que usam de recursos terapêuticos baseados no conhecimento tradicional, com o intuito de tratar o ser humano como um todo. Elas são a base de um projeto de extensão desenvolvido pelo Curso de Farmácia na UFPE, o qual teve que se adaptar à nova realidade imposta pela pandemia da Covid-19, suspendendo suas atividades presenciais e passando a utilizar meios digitais. O objetivo desse trabalho foi o de realizar atendimentos individuais e encontros coletivos com os pacientes acompanhados pelo projeto através de plataformas digitais, orientando com PICS já aprendidas antes da pandemia e incorporando novas técnicas durante o isolamento. Por fim, averiguou-se o progresso dos pacientes. Foram utilizadas quatro plataformas como aliadas para a manutenção das consultas, possibilitando a orientação dos pacientes durante esse período. Grande parte deles relatou melhoras em suas condições emocionais, essas que haviam se agravado durante a pandemia, além de demonstrarem satisfação com o acompanhamento virtual e uso das PICS propostas. Diante disso, nota-se a importância da adaptação de projetos acadêmicos para meios virtuais por possibilitarem que em momentos extraordinários, como uma pandemia, suas atividades possam ser mantidas. Também pode ser atestada a importância das mesmas para a manutenção de cuidados com pacientes. Por fim, fica nítido o papel das mídias sociais na divulgação de informações sobre a saúde.*

Palavras chaves: Fitoterapia, Meditação, Reiki, Saúde Mental

ABSTRACT – *Integrative and Complementary Health Practices (PICS) are methods of care that use therapeutic resources based on traditional knowledge, in order to treat human beings in an integral way. They are the basis of an extension project developed by the Pharmacy Course at UFPE, which had to adapt to the new reality imposed by the Covid-19 pandemic, suspending face-to-face activities and switching to digital media. The objective of this work was to carry out*



individual consultations and collective meetings with patients monitored by the project through digital platforms, guiding with PICS already learned before the pandemic and incorporating new techniques during isolation. Finally, the progress of the patients was checked. Four platforms were used as allies for the maintenance of consultations, enabling the orientation of patients during this period. Most of them reported improvements in their emotional conditions, which had worsened during the pandemic, in addition to showing satisfaction with the virtual monitoring and use of the proposed PICS. Therefore, it is noted the importance of adapting academic projects to virtual media as they allow that in extraordinary moments, such as a pandemic, their activities can be maintained. Their importance for maintaining patient care can also be attested. Finally, the role of social media in disseminating health information is clear.

Keywords: Phytotherapy, Meditation, Reiki, Mental Health

1. INTRODUÇÃO

Ocorreu, em 2019, o primeiro caso confirmado de infecção pelo novo coronavírus, o Sars-Cov-2, em Wuhan, capital e maior cidade da província de Hubei na China (Wang *et al.*, 2020). Depois disso, o vírus ganhou status pandêmico, se espalhando por todo o globo terrestre. Só no Brasil, até o dia 13 de julho de 2020, foram notificados mais de um milhão e oitocentos mil casos (Brasil, 2020a). Diante das proporções dessa pandemia, foram vivenciados impactos ligados não somente à infecção pelo Sars-Cov-2, mas também devido ao isolamento social, que foi e vem sendo utilizado como estratégia para diminuir a velocidade de propagação do vírus. Essa medida de distanciamento vem afetando a vida de pessoas em todo o mundo, seja em suas relações interpessoais, no mercado de trabalho e nos cuidados com a saúde, além de atividades escolares e acadêmicas que tiveram que ser interrompidas (Bittencourt, 2020). Entre essas atividades que tiveram suas ações suspensas, podem ser citados os projetos de extensão, como foi o caso do “Práticas Integrativas e Complementares em Cuidados Clínicos Farmacêuticos na Promoção da Saúde”, realizado por alunos e professores do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco e servidores da Prefeitura da Cidade do Recife, no Serviço Integrado de Saúde (SIS), e que tem como base a divulgação e promoção das Práticas Integrativas e Complementares em Saúde (PICS).

As PICS, também conhecidas como Medicina Tradicional e Complementar/Alternativa (MT/MCA), são práticas que resultam de conhecimentos populares transmitidos através de gerações, podendo ser aplicadas para o tratamento de doenças físicas e mentais (WHO, 2020). Alguns exemplos de PICS são a meditação, ioga e auriculoterapia. Elas são utilizadas de forma paralela ou integrada com o sistema biomédico. Porém, diferente do modelo curativista vigente, que geralmente vê o ser humano dividido em diversas partes e sistemas sectarizados, as PICS consideram o homem de forma integral e atuam estimulando mecanismos naturais para prevenção e promoção da saúde (Carvalho *et al.*, 2019). Elas vêm sendo enfaticamente recomendadas aos países membros pela OMS, desde os anos 70, quando a mesma criou o Programa de Medicina Tradicional, e quando na Conferência de Alma Ata – Cazaquistão, em 1978, sobre Atenção Primária em Saúde, colocou-se a importância do uso dessas tecnologias eficazes e seguras, numa visão ampliada do processo saúde-doença. Foi visada a promoção global do cuidado humano com ênfase no auto cuidado, na educação em saúde, na escuta acolhedora, no desenvolvimento do vínculo terapêutico e na integração do ser humano com o meio ambiente e a sociedade (Brasil, 2006). Embora tais práticas possuam eficácia comprovada,



muitas ainda enfrentam o problema de serem pouco conhecidas entre os profissionais da saúde e, em alguns casos, até mesmo são vistas com incredulidade (Carvalho e Nóbrega, 2017; Matos *et al.*, 2018). Por promoverem saúde com bem estar, se vê a importância de políticas para implementação e promoção das PICS no Brasil.

No Brasil, as discussões sobre esse tema iniciaram-se na década de 1980, coincidindo com a criação do Sistema Único de Saúde (SUS), com destaque para a 8ª Conferência Nacional de Saúde, em 1986, que deliberou a introdução de práticas alternativas no âmbito dos serviços de saúde (Santos e Tesser, 2012). O Ministério da Saúde, em maio de 2006, na portaria nº 971, aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), no SUS, onde oficializa diretrizes sobre ações e serviços relativos às PICS em âmbito nacional. Esta portaria recomenda que as Secretarias de Saúde dos Estados, do Distrito Federal e dos Municípios, implantem e implementem ações e serviços relativos às Práticas Integrativas e Complementares promovendo a elaboração ou a readequação de seus planos plurianuais de saúde, com programas, projetos e atividades, tendo em vista a inclusão da medicina tradicional chinesa-acupuntura, homeopatia, plantas medicinais e fitoterapia e termalismo social nos serviços oferecidos à população (Brasil, 2006; Brasil, 2020b). Atualmente, o Sistema Único de Saúde pode oferecer, de forma integral e gratuita, 29 modalidades de Práticas Integrativas e Complementares à população. Os atendimentos começam na Atenção Básica, principal porta de entrada para o SUS (Brasil, 2020c).

Baseando-se nessas políticas que promovem a inclusão das PICS no SUS, que se idealizou o projeto de extensão “Práticas Integrativas e Complementares em Cuidados Clínicos Farmacêuticos na Promoção da Saúde”, criado no ano de 2017, inicialmente com a ideia de acompanhar apenas pacientes que apresentavam Doenças Crônicas Não Transmissíveis. Entretanto, o mesmo acabou alcançando outros públicos, principalmente portadores de transtornos mentais leves, o que implicou com que o foco se voltasse para a saúde de forma geral. Esse projeto se baseia na realização de encontros semanais entre pacientes, extensionistas e professores no Serviço Integrado de Saúde (SIS), unidade de saúde de referência em PICS, localizada no bairro do Engenho do Meio, no Recife. Nesses encontros ocorrem aulas sobre PICS e realização das mesmas, explanação de temas sobre saúde, troca de experiências e o acompanhamento dos pacientes por meio de questionários e aferição de taxas como glicose, pressão arterial, medida da circunferência abdominal e peso. Além disso, também se realizam consultas individuais com a farmacêutica integrativa da unidade, possibilitando um cuidado mais personalizado ao paciente.

Esse trabalho se justifica pelas mudanças causadas com o isolamento social imposto pela pandemia da Covid-19, acontecimento esse que tornou necessário que as atividades presenciais do projeto fossem suspensas, motivando a readaptação para um novo formato de atenção aos pacientes acompanhados. Deste modo, os professores e extensionistas adotaram rapidamente as plataformas digitais e as redes sociais como forma de se manterem conectados aos pacientes, dando continuidade às atividades de cuidado do projeto. Tais plataformas são um espaço dinâmico e que permitem uma boa visibilidade para a divulgação científica, tornando o conhecimento público e atingindo os mais diversos tipos de indivíduos (Oliveira, 2018).

Diante disso, os objetivos deste trabalho foram o de realizar o atendimento individual e coletivo dos pacientes acompanhados através de plataformas digitais. Ademais, promover encontros em grupo, assim permitindo a continuidade do projeto e do progresso dos participantes, realizando PICS já conhecidas pelos mesmos através dos encontros ocorridos antes da pandemia, além novas técnicas incorporadas durante o isolamento social. Por fim, com a aplicação dessas estratégias, buscou-se averiguar a evolução dos pacientes.



2. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido qualitativamente por meio de três ações. A primeira delas foi a manutenção das consultas individuais/coletivas que já ocorriam presencialmente antes do isolamento social, permitindo assim o progresso dos pacientes. Tais encontros foram realizadas por três plataformas digitais: WhatsApp, Google Meet e Zoom. Os participantes foram atendidos de forma virtual com práticas de meditação, técnicas de relaxamento, Reiki, fitoterapia e quando já utilizavam e conheciam, outras práticas também foram continuadas.

A segunda ação se deu por meio do retorno da realização dos encontros em grupo, agora quinzenais, através da plataforma Google Meet, reunindo usuários participantes e novatos, extensionistas e professores envolvidos na extensão, para vivências em PICS e troca de experiências sobre o período de pandemia.

Por fim, como uma forma adicional de manter os pacientes mais informados, foi criada uma conta no Instagram, o *Florescer Integrativo*, para a elaboração de postagens e informes sobre as Práticas Integrativas e Complementares, como as mesmas podem ser utilizadas para ajudar nesse período de pandemia da Covid-19 e para a divulgação das atividades que são realizadas pelos participantes e extensionistas.

Este projeto de extensão encontra-se no quarto ano e tem aprovação no comitê de ética sob o CAAE: 71740517.3.0000.5208.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De início, foi possível perceber uma boa aceitação por parte dos pacientes acerca das consultas online e das informações recebidas pela conta no Instagram, que transmitiram sentimentos de tranquilidade e confiança para que pudessem enfrentar momentos difíceis. Isso pode ser visualizado com o relato a paciente C. L. C. M., que participa do projeto desde 2017:

“Fui orientada, através de receituários fitoterápicos e procedimentos terapêuticos para melhorar o meu quadro respiratório, sinusite e o estado de fraqueza que atravessei. Também passei a receber o Reiki aos sábados e domingos onde me tranquilizava muito. Passei a dormir bem e confiante. A angústia e medo diminuíram, pois estava sendo bem acompanhada de perto. E fiquei segura. Obrigada”

Tal aceitação pode se dar devido à concepção holística, essa que se caracteriza como uma das principais contribuições para usuários das PICs no âmbito da promoção da saúde. Uma vez que não é por falta de diagnósticos, médicos, medicamentos ou outros recursos que existe o resgate das medicinas tradicionais. É por vontade de afirmar uma identidade de cuidado oposta à prática curativista vigente e de expressar e que é possível implementar outras práticas de saúde (Telesí Jr, 2016).

Ainda durante as consultas, percebeu-se que um dos tópicos mais abordados foram problemas relacionados à saúde mental, como insônia, depressão e ansiedade. Foi relatado por S. R. C. – paciente do projeto:

“Venho apresentando episódios de surtos e depressão há alguns anos, e nessa pandemia fiquei muito fragilizada. Estou recebendo atendimento contínuo, com orientações naturais e protocolos de florais para ansiedade e depressão durante esse período crítico os quais me tranquilizaram muito.”

Outra paciente, G. M. P. C. - 61 anos, usuária do projeto desde 2017, ACS da rede municipal



do Recife, também relatou melhoras na saúde mental. A mesma agradeceu o acompanhamento online, com a prescrição fitoterápicos, durante esse período pandêmico para o fortalecimento de sua saúde e controle da ansiedade, depressão, medo e pânico. Ficou especialmente surpresa e agradecida com o sucesso no tratamento. Desde de março de 2020 foram realizadas várias ligações e mensagens por meio do WhatsApp. Ela relata:

“Além dos atendimentos pelo WhatsApp (...) também venho recebendo (...) as transmissões de Reiki a distância para tratamento mental várias vezes por semana, especialmente nos momentos mais críticos, pelo que muito agradeço, pois me fizeram muito bem, e se estenderam à minha família e ambiente da casa, o que tem sido muito bom (...)”

Outro ponto abordado pelos pacientes foram os sentimentos de apreensão causados pela pandemia. É o que pode ser visto pelo relato da paciente B. A. S, do sexo feminino, que entrou no projeto no final do ano de 2019 e participou de algumas reuniões e aulas nesse ano de 2020. Ela chegou a fazer duas consultas com a farmacêutica integrativa para o tratamento de fibromialgia no começo de 2020 e logo informou que se encontrava bem melhor. Mas, devido a situação de saúde do seu filho que teve que ser internado por complicações causadas pela covid-19, acabou tendo seu estado emocional desestabilizado, o que acarretou em uma piora no seu quadro. Ela relata:

“(...) senti-me muito acolhida no momento mais crítico de minha existência, quando em maio, meu filho ficou isolado em casa, piorou e teve que ser internado com diagnóstico de covid-19. A farmacêutica nos ofertou o Reiki e nos acompanhou. Ele melhorou graças a Deus e sentia-se bem recebendo Reiki no hospital. Foi providencial ter começado a participar desse grupo uns meses antes da pandemia, pois me encontrava com a saúde muito fragilizada e não havia tido sucesso com os tratamentos alopáticos.”

Segundo Kurebavashi et al. (2016), após realizarem um ensaio clínico randomizado sobre Reiki, verificou-se que 30 minutos da prática são efetivos no controle de ansiedade, dor e bem-estar global. Ainda relataram que ao serem feitas avaliações antes e depois da aplicação do Reiki, foi identificado melhoria no bem-estar, qualidade do sono, relaxamento, alívio da dor, e redução dos níveis de ansiedade.

T. T. também relatou os problemas causados pela pandemia. Ela é paciente do projeto desde 2018 e estava muito apreensiva quando a Covid-19 chegou em Recife pois a filha sofre com asma. Sabendo de suas fragilidades ela rapidamente buscou as orientações para dar continuidade ao tratamento com fitoterápicos. Através do contato por meio do digital, foram esclarecidas algumas dúvidas que a paciente apresentou sobre notícias a respeito do uso da homeopatia. E ela relata:

“Durante o período de 16/03 a 31/06, fui orientada para mudança de muitos dos meus hábitos, o uso de suplementos para melhorar minha anemia e dores musculares, com levedura, vitamina C e chás. Fui orientada a fazer meditação. Usei outras receitas online de fitoterápicos, aprendi o escalda pés, compressas e os alongamentos específicos (...) sinto-me bem orientada; segura, fazendo tratamento p/ curar meus problemas de saúde mesmo em plena quarentena sinto que já melhorei muito...”

Em *Por que meditar, experiência subjetiva da Meditação* (Menezes e Dell'Aggio, 2009) estão expostos os benefícios emocionais, cognitivos, físicos, espirituais e sociais, mas especialmente emocionais, como corroborado anteriormente por diversos autores, o que coincide com o observado nesse período de existência do Projeto e nas experiências vivenciadas e



ressaltadas pelos pacientes e usuários. Segundo Kasala *et al.* (2014) a meditação tem efeitos em vários sistemas fisiológicos envolvidos na fisiopatologia do transtorno depressivo maior. As intervenções baseadas em meditação foram associadas à melhora dos sintomas depressivos e à prevenção de recaídas, embora mecanismos fisiológicos aos efeitos terapêuticos da meditação não são claramente definidos e até paradoxais.

Já os fitoterápicos e plantas medicinais têm sido um recurso terapêutico para o tratamento da ansiedade e/ou depressão, insônia. As principais espécies indicadas são: *Valeriana officinalis* L.; *Passiflora incarnata* L e *Melissa officinalis* L. Estas espécies estão presentes no Formulário Terapêutico de Fitoterápicos (2018) e na Farmacopéia Brasileira (2019). *Passiflora incarnata* é utilizada no tratamento da ansiedade, agindo como um depressor inespecífico do Sistema Nervoso Central. E *Valeriana officinalis* é utilizada em quadros de insônia por possuir propriedades sedativa, hipnótica e ansiolítica. *Melissa officinalis* é utilizada como auxiliar no tratamento sintomático da ansiedade leve e insônia leve; como auxiliar no alívio de sintomas gastrintestinais leves, incluindo distensão e flatulência.

4. CONCLUSÃO

Diante dos dados expostos, fica clara a importância da adaptação às tecnologias digitais para a manutenção de projetos acadêmicos, principalmente aqueles que envolvam cuidados em saúde de seus participantes.

Ademais, pode ser constatado o sucesso do uso das plataformas digitais para o acompanhamento de pacientes, seja em consultas individuais ou em grupo. Observa-se, com tais atividades, que os participantes acabam expressando a sensação de se sentirem cuidados e lembrados, o que é algo essencial para tempos de isolamento social. Tais sentimentos são extremamente importantes para o equilíbrio da saúde mental dos indivíduos atendidos, assim proporcionando motivação para manterem os cuidados com sua saúde e adesão aos tratamentos.

Por fim, podemos constatar a importância do uso das mídias e redes sociais para a disseminação de informações relacionadas à saúde e PICS, principalmente durante esse momento de distanciamento físico.

5. REFERÊNCIAS

- BITTENCOURT, R. N. Pandemia, isolamento social e colapso global. *Rev. Espaço Acadêmico.*, v. 221, p. 168-178, 2020.
- BRASIL. Farmacopéia Brasileira 6 ed. Brasília: ANVISA, 2019.
- BRASIL. Formulário de Fitoterápico. Farmacopéia Brasileira. 1 ed. Brasília: ANVISA, 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Coronavírus Brasil. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br/>. Acesso em: jul. de 2020a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria N°.971 de 3 de maio de 2006. Diário Oficial da União. 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Práticas Integrativas e Complementares (PICS): quais são e para que servem. Disponível em: <https://saude.gov.br/saude-de-a-z/praticas-integrativas-e-complementares>. Acesso em: jul. de 2020b.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Práticas Integrativas e Complementares (PICS): quais são e para que servem. Disponível em: <https://saude.gov.br/saude-de-a-z/praticas-integrativas-e-complementares>. Acesso em: jul. de 2020c.



- CARVALHO, R. V. S.; ÂNJOS, A. M. C.; OLIVEIRA, M. M.; SILVA, C. A. L.; LEAL, S. R. M. D.; OLIVEIRA, V. A.; LIMA, A. C. G. Práticas integrativas e complementares aplicadas aos trabalhadores de uma unidade básica de saúde: relato de experiência. *Rev. Saúde Pública de Mato Grosso do Sul*, v. 2, p. 70-76, 2019.
- CARVALHO, J. L. S.; NÓBREGA, M. P. S. Práticas integrativas e complementares como recurso de saúde mental na Atenção Básica. *Rev. Gaúcha Enferm.*, v. 38, p. 1-9, 2017.
- COOKE, B.; ERNST, E. Aromatherapy: a systematic review. *Br J Gen Pract.* v. 50, p. 493-496, 2000.
- KASALA, E. R.; BODDULURU, L. N.; MANETI, Y.; THIPPARABOINA, R. Effect of meditation on neurophysiological changes in stress mediated depression. *Complement Ther Clin Pract.* v. 20, p.74-80, 2014.
- KUREBAYASHI, L. F. S.; TURRINI, R. N. T.; SOUZA, T. P. B.; TAKIGUCHI, R. S., KUBA, G.; NAGUMO, M. T. Massagem e Reiki para redução de estresse e ansiedade: Ensaio Clínico Randomizado. *Rev. Latino-Am. Enfermagem.* v. 24, p. 1-8, 2016.
- MATOS, P. C.; LAVERDE, C. R.; MARTINS, P. G.; SOUZA, J. M.; OLIVEIRA, N. F.; PILGER, C. Práticas integrativas e complementares na atenção primária à saúde. *Cogitare Enferm.*, v. 23, 2018.
- MENEZES, C. B.; DELL'AGLIO, D. D. Por que meditar? A experiência subjetiva da prática de meditação. *Psicol. Estud.*, v. 14, p. 565-573, 2009.
- OLIVEIRA, T. M. Miatização da ciência: reconfiguração do paradigma da comunicação científica e do trabalho acadêmico na era digital. *MATRIZES*, v. 12, p. 101-126, 2018.
- SANTOS, M.; TESSER, C. D. Um método para a implantação e promoção de acesso às Práticas Integrativas e Complementares na Atenção Primária à Saúde. *Cienc Saude Colet.*, v. 17, p. 3011-3024, 2012.
- TELESÍ JÚNIOR, E. Práticas integrativas e complementares em saúde, uma nova eficácia para o SUS. *Estud. av.* v. 30, p. 99-112, 2016.
- WANG, C.; PAN, R.; WAN, X.; TAN, Y.; XU, L.; HO, C. S.; HO, R. C. Immediate Psychological Responses and Associated Factors during the Initial Stage of the 2019 Coronavirus Disease (COVID-19) Epidemic among the General Population in China. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, v. 17, p. 1-25, 2020.
- WHO. World Health Organization. Tradicional, Complementary and Integrative Medicine. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/traditional-complementary-and-integrative-medicine#tab=tab_1. Acesso em: Jul de 2020.

6. AGRADECIMENTOS

À PROEXC- UFPE pelo financiamento do projeto.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Terapias em Saúde

USOS TERAPÊUTICOS DA IMUNOGLOBULINA INTRAVENOSA NO TRATAMENTO DA COVID-19

M. F. LIMA¹, A. F. SILVA NETO¹, H. I. LEÃO¹, L. B. L. MARTINS¹, S. S. BARROS¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia

E-mail para contato: milena.ferrlima@gmail.com

RESUMO – A rápida disseminação global do coronavírus (COVID-19), causando impactos econômicos e sociais imensuráveis, classificou a doença como uma pandemia. Até os dias atuais, não há registros de vacinas e medicações específicas, acarretando na busca por outras alternativas efetivas de tratamento com terapias já conhecidas. A imunoglobulina intravenosa (IVIg) é uma opção plausível, que está sendo utilizada em pacientes sintomáticos e apresentando resultados promissores. Utilizando plataformas de dados científicos, realizou-se uma revisão da literatura, com artigos publicados entre os anos de 2006 e 2020, com o intuito de explicitar os usos e os resultados terapêuticos obtidos com a IVIg. Em conclusão, nota-se estudos que destacam o uso promissor em pacientes com coronavírus que foram tratados também com imunoterapia, apresentando desaparecimento dos sintomas em semanas porém, necessita-se de estudos com maiores amostras de caso, na intenção de esclarecer mecanismos de ação e possíveis efeitos colaterais.

Palavras-chave: IVIg, coronavírus, imunoterapia.

ABSTRACT- *The rapid global spread of the coronavirus (COVID-19), causing immeasurable economic and social impacts, has classified the disease as a pandemic. Until today, there are no records of vaccines and specific medications, leading to the search for other effective treatment alternatives with therapies already known. Intravenous immunoglobulin (IVIg) is a plausible option, which is being used in symptomatic patients and showing promising results. Using scientific data platforms, a literature review was carried out, with articles published between the years 2006 and 2020, in order to explain the therapeutic uses and results obtained with IVIg. In conclusion, there are studies that highlight the promising use in patients with coronavirus who were also treated with immunotherapy, with disappearance of symptoms in weeks, however, studies with larger case samples are needed, with the intention of clarifying mechanisms of action and possible side effects.*

Keywords: IVIg, coronavirus, immunotherapy.



1. INTRODUÇÃO

O surgimento do novo coronavírus (SARS-CoV-2), originário de Wuhan, na China, é responsável pela doença conhecida como COVID-19 e se tornou um problema de saúde global em decorrência do seu alto índice de propagação e a possibilidade de ocasionar síndrome respiratória grave e infecções em humanos (Chen *et al.*, 2020). O SARSCoV-2, um vírus pertencente à família *Coronaviridae*, envelopado e contendo RNA de fita simples no sentido positivo, está associado a um surto contínuo de pneumonia atípica que afetou mais de 90.000 pessoas em mais de 60 países em março de 2020. Em janeiro de 2020, a Organização Mundial da Saúde declarou a epidemia uma emergência de saúde pública (Jawhara, 2020; Walls *et al.*, 2020).

Uma das alternativas terapêuticas utilizadas para o tratamento da doença, visto que atualmente não é ofertado vacinas e medicamentos específicos, é a Imunoglobulina Intravenosa (IVIg), que é um pool de IgG de doadores saudáveis que sofreram exposição a doenças infecciosas endêmicas e também a microrganismos, tendo como resultado a fomentação da produção de anticorpos IgG contra diferentes microrganismos e os seus produtos (Diep, 2016). Sendo assim, a imunoterapia usando imunoglobulina G vem sendo usada como alternativa terapêutica tratar e fortalecer a resposta imune de pacientes contra o coronavírus (Pyrç, 2006; Rao, 2014).

Em virtude dos fatos apresentados, este trabalho tem por objetivo explicar as possíveis inclusões terapêuticas no tratamento do COVID-19, apresentando resultado de casos envolvendo pacientes que foram tratados com imunoglobulina intravenosa, não necessariamente associada a outros fármacos.

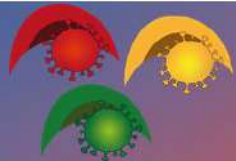
2. MATERIAIS E MÉTODOS

Efetou-se uma revisão da literatura e recorreu às plataformas de dados científicos Scielo, Pubmed, Google Scholar e Medline, por mais de um revisor para que posteriormente os dados obtidos fossem cruzados e debatidos. Os descritores utilizados foram immunoglobulin, covid-19 e efficacy, considerando artigos publicados entre os anos de 2006 e 2020, sem restrição de país ou idioma. Como filtros de pesquisa, utilizou-se textos completos, concedendo preferência aos textos de ensaio clínico, revisão e revisão sistemática. Também foi avaliado as referências utilizadas nos artigos selecionados, com o intuito de amplificar o referencial teórico utilizado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na plataforma Pubmed foi encontrado apenas 18 trabalhos, sendo estes posteriormente analisados. Utilizando o Google Scholar, aproximadamente 17.400 resultados foram obtidos, que foram classificados por ordem de relevância. Porém, fazendo uso do banco de dados da Scielo e Medline, nenhum documento foi encontrado. Adotou-se como critério de exclusão artigos com insuficiência de dados e com fuga ao tema e como critério de inclusão, trabalhos alinhados com o assunto, dando preferência aqueles que correlacionassem o uso de imunoglobulina intravenosa em pacientes com covid-19.

Cao *et al.* (2020) desenvolveram um estudo onde reporta o tratamento de três pacientes com SARS-CoV-2 do tipo severo e apresentando problemas respiratórios, com altas doses de imunoglobulina intravenosa. No primeiro caso, foi registrado febre, tosse e falta de ar onde foi relatado uma melhora em aproximadamente 24 horas após a administração de IVIg. O segundo paciente apresentava febre, tosse seca e falta de ar e foi submetido a terapia com imunoglobulina



intravenosa por cinco dias. No segundo dia, não havia mais sinais de febre e a falta de ar foi cessada gradativamente. O último paciente, uma mulher com hábitos saudáveis, demonstrava falta de ar e febre e foi tratada também com metilprednisolona, por cinco dias. Após três dias, não havia mais sintomas. De acordo com o resultados obtidos pelos autores, é provável que uma alta dose de IVIg administrada corretamente pode bloquear a evolução da doença e melhorar o resultado clínico.

Segundo estudos de Jones *et al* (2020), o tratamento utilizando IVIg concomitante ao ácido acetilsalicílico é capaz de amenizar alguns dos sintomas do coronavírus como febre, em pacientes que portam também a doença de Kawasaki. Os autores notificaram o tratamento em uma criança com seis meses de idade, com febre, apresentando congestão nasal, conjuntivite, erupção cutânea eritematosa e leve opacidade na região do pulmão. Após a administração de imunoglobulina intravenosa, a paciente apresentou melhoras na temperatura corporal e ao longo de duas semanas, não apresentou mais sintomas.

De acordo com Jawhara (2020), a imunoterapia com IgG pode neutralizar o vírus causador do COVID-19, podendo ser mais eficaz se essas imunoglobulinas fossem coletadas de pacientes recuperados da doença na mesma região visto que estilo de vida, dieta e ambiente são de fundamental importância no desenvolvimento de anticorpos específicos. A autora também reitera sobre a combinação dos anticorpos imunológicos IgG com drogas antivirais, que pode oferecer alternativas terapêuticas contra o coronavírus.

Para Shao *et al*, a utilização antecipada de altas doses A IVIg pode melhorar o prognóstico de pacientes com covid-19. No estudo realizado, os autores avaliaram 325 adultos diagnosticados com coronavírus, sendo 103 em estado crítico. O dados obtidos demonstraram que em pacientes com tipo crítico, a IVIG poderia reduzir de forma significativa a mortalidade em 28 dias e a resposta inflamatória. Também, observou-se que a aplicação da imunoglobulina no estágio inicial no tipo crítico com uma dose alta, causaria uma redução da mortalidade em 60 dias.

4. CONCLUSÃO

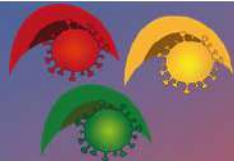
Isto posto, infere-se que a IVIg é uma potente alternativa para o tratamento de pessoas sintomáticas ao COVID-19, com interessante potencial, principalmente se for associado à outras drogas, como antivirais. Contudo, é perceptível a escassez de estudos utilizando um maior número de pacientes usufruindo desta possibilidade terapêutica, a fim de elucidar possíveis efeitos colaterais, mecanismo de ação e efeitos a longo prazo.

5. REFERÊNCIAS

CAO, W *et al*. High-Dose Intravenous Immunoglobulin as a Therapeutic Option for Deteriorating Patients With Coronavirus Disease 2019. *Oxford University Press*. 48, 1–6, 2020. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa102>

CHEN, L. *et al*. Convalescent plasma as a potential therapy for COVID-19. *The Lan. Infec. Dis.*, v. 20, n. 4, p. 398-400, 2020.

DIEP, B.A.; LE, V.T. *et al*. IVIG-mediated protection against necrotizing pneumonia caused by MRSA. *Sci. Transl. Med.* 21 Sep 2016. Vol. 8, Issue 357. DOI: 10.1126/scitranslmed.aag1153



JAWHARA, S. Could Intravenous immunoglobulin collected from recovered coronavirus patients protect against COVID-19 and strengthen the immune system of new patients?. *Intern. journal of molecular sciences*. v. 21, n. 7, p. 2272, 2020.

JONES, V.G *et al.* COVID-19 and Kawasaki Disease: Novel Virus and Novel Case. *Hosp. Ped.* Volume 10, Issue 6, June 2020.

RAO, S *et al.* Coronavirus Associated Fulminant Myocarditis Successfully Treated with Intravenous Immunoglobulin and Extracorporeal Membrane Oxygenation. *Crit. Care.* 2014, 146, 336A. DOI: 10.1378/chest.1992018.

SHAO, Z *et al.* Clinical Efficacy of Intravenous Immunoglobulin Therapy in Critical Patients with COVID-19: A Multicenter Retrospective Cohort Study. *The Lancet*. p. 1-19, 2020.

WALLS, A.C *et al.* Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*. 281–292, April 16, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>



ÁREA DE SUBMISSÃO: Terapias em Saúde

IMUNOTERAPIA À BASE DE ANTICORPOS MONOCLONAIS PARA TRATAMENTO DE NEOPLASIA PULMONAR

T. B. ANJOS¹, L. E. S. SOUZA¹, T. BEZERRA², A e A. A. SILVA Jr³

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Núcleo Ciências da Vida, Departamento de Medicina;

² Universidade De Pernambuco, Campus Serra Talhada, Departamento de Medicina;

³ Doutorando em Cancerologia pelo Programa de pós-graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências.

E-mail para contato: auvaniantunes@gmail.com

RESUMO - *Introdução: Este estudo discorre sobre os avanços no tratamento de pacientes acometidos pelo câncer de pulmão, através do uso de anticorpos monoclonais (mAbs). Objetivo: promover uma revisão literária sobre o uso dos mAbs no tratamento do câncer pulmonar e debater as advertências associadas. Metodologia: Foi realizada uma pesquisa com os descritores “anticorpos monoclonais”, “câncer de pulmão”, “antineoplásico” e “mAbs” nos bancos de dados PubMed, Scielo e MedLine. Foram selecionados artigos em inglês e português publicados no período de 2016 a 2020, foram excluídos os artigos sobre imunoterapia com mAbs para tratamento de doenças autoimunes e infecciosas. Resultados: Esta pesquisa, delimitou-se a averiguar acerca de quatro mAbs, sendo eles bevacizumabe, atezolizumabe, nivolumabe e o pembrolizumabe. Foram escolhidos 2 ensaios clínicos por medicamento e anexando-se a isso revisões sistemáticas. Analisando-se os medicamentos: O bevacizumabe reduz a expansão do tumor, diminuindo a vascularização dele e controla o crescimento dos vasos sanguíneos ao redor. O atezolizumabe gera um efeito antitumoral ao se ligar ao PD-L1, bloqueando sua interação com a PD-1 e gerando aumentando a atividade das células T contra células tumorais, sendo esse mecanismo de ação semelhante ao nivolumabe e pembrolizumabe. Conclusão: A imunoterapia com mAbs vem se tornando um recurso eficaz no tratamento de câncer de pulmão, principalmente quando combinados com outras terapias mais tradicionais.*

Palavras chave: câncer pulmonar; terapia oncológica; mAbs.

ABSTRACT - *Introduction: This study describes the advances in the treatment of patients affected by lung cancer, through the use of monoclonal (mAbs). Objective: to promote a literary review on the use of mAbs in the treatment of lung cancer and to debate related warnings. Methodology: A search was performed with the keywords "monoclonal", "lung cancer", "antineoplastic" and "mAbs" in the PubMed, Scielo and MedLine databases. Articles in English and Portuguese published from 2016 to 2020 were selected, articles on immunotherapy with mAb for the treatment of autoimmune and infectious diseases were excluded. Results: This research delimits an average*



of four mAbs, which are bevacizumab, atezolizumab, nivolumab and pembrolizumab. Two clinical trials for drugs were chosen and attached to these systematic analyzes. Analyzing the medications: Bevacizumab reduces the expansion of the tumor, decreasing its vascularization and controls the growth of the surrounding blood vessels. Atezolizumab generates an anti-tumor effect when it connects to PD-L1, blocking its interaction with PD-1 and generating the activity of T cells against tumor cells, this mechanism of action being similar to nivolumab and pembrolizumab. Conclusion: Immunotherapy with mAbs has become an effective resource in the treatment of lung cancer, especially when combined with other more traditional therapies.

Keywords: lung cancer; cancer therapy; mAbs.

1. INTRODUÇÃO

O câncer de pulmão é uma das principais causas de mortalidade de ambos os sexos em todo o planeta (Mao *et al.*, 2016). Os casos de câncer de pulmão têm aumentado consideravelmente, transformando-se de uma doença antes tida como rara à causa mais comum de morte por câncer a nível mundial (Mao *et al.*, 2016). Apesar do tabagismo ainda permanecer como principal fator de risco, outros fatores como exposições ambientais, ocupacionais e doenças pulmonares crônicas também contribuem para sua incidência (BADE; CRUZ, 2020).

Já se sabe que fatores genéticos e ambientais também estão relacionados com a doença, no entanto não há uma explicação clara para sua taxa de mortalidade (ROMASZKO; DOBOSZYNSKA, 2018). A partir da compreensão da genética do câncer de pulmão e do papel do sistema imunológico no controle da neoplasia pulmonar, novas opções de tratamento surgiram, destacando-se a imunoterapia (BADE; CRUZ, 2020).

A imunoterapia é uma categoria de tratamento que, basicamente, auxilia o sistema imunológico de uma pessoa a controlar a proliferação tumoral ou eliminá-lo, incluídos nessa classe, destacam-se os anticorpos monoclonais (mAbs) (Bruneto *et al.*, 2019; Steven *et al.*, 2016). Os mAbs são produtos à base de imunoglobulinas, onde as propriedades naturais dos anticorpos são aproveitadas e aprimoradas por abordagens de engenharia, aperfeiçoando sua função antitumoral (Bruneto *et al.*, 2019).

Nas últimas décadas, o avanço da engenharia genética e os descobrimentos de expressões fenotípicas como características de tipos específicos de cânceres auxiliaram aos pesquisadores da área médica identificar alvos potenciais, que resultaram no desenvolvimento de vários agentes antitumorais, dentre estes há novas tecnologias de desenvolvimento de fármacos com ligação a anticorpos monoclonais (BADE; CRUZ, 2020). Pelo fato dos mAbs serem proteínas de ligação de alta especificidade, logo representam, atualmente, um grupo bastante variado e estudado, além de serem um dos mais utilizados no tratamento das neoplasias pulmonares, isoladamente ou combinados com outros tratamentos (Bruneto *et al.*, 2019).

Os mAbs frequentemente agem envolvendo antígenos de superfície diferencialmente expressos nas células cancerígenas, podendo provocar a destruição de células tumorais por mecanismos incluindo citotoxicidade celular dependente de anticorpos, citotoxicidade mediada por complemento e fagocitose celular dependente de anticorpos (Singh *et al.*, 2017). Com isso, seu mecanismo de ação depende dos alvos celulares, garantindo assim a especificidade e eficácia. As propriedades terapêuticas dos mAbs são provenientes justamente da interação com as respectivas moléculas-alvo.

Nesse contexto, em virtude da elevada taxa de mortalidade por decorrência do câncer



pulmonar, da ampliação das pesquisas e da inserção dos mAbs na terapia dos pacientes acometidos, e considerando que os tratamentos oncológicos exercem grande impacto na vida desses pacientes, faz-se necessária uma observação da evolução e eficácia dessas novas terapias e dos seus limites de aplicabilidade no momento atual. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi realizar uma revisão sistemática de literatura acerca do uso dos anticorpos monoclonais no tratamento do câncer pulmonar, bem como discutir as advertências associadas a essa abordagem terapêutica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de uma revisão integrativa da literatura realizada nos bancos de dados Bireme, PubMed, Scielo e MedLine, aplicando filtro de ano de publicação do período de 2016 a 2020, e utilizando os descritores em ciências da saúde (DeCs) “anticorpos monoclonais”, “câncer de pulmão”, “antineoplásico” e “mAbs”. Foram incluídos no estudo bibliográfico 8 artigos relacionados ao tratamento oncológico com anticorpos monoclonais para câncer de pulmão, foram excluídos os artigos sobre imunoterapia com mAbs para tratamento de doenças autoimunes e infecciosas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

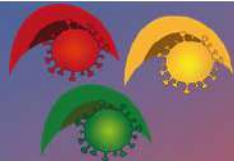
O câncer de pulmão, devido à sua heterogeneidade clínica, endocrinológica, histológica, celulares e moleculares de manifestações, é metodicamente classificado em câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP) e câncer de pulmão de pequenas células (CPPC) (Hirsch *et al.*, 2017). O CPCNP, por sua vez, é subdividido em carcinoma de células grandes, adenocarcinoma, carcinoma espinocelular, carcinoma de células escamosas e tipos histológicos mistos (Hirsch *et al.*, 2017). Essa heterogeneidade antigênica do câncer implica na limitação e dificuldade de aplicação de terapia com imunoterápicos do grupo mAbs no tratamento tumoral (Wang *et al.*, 2013).

Nos últimos 5 anos, diversos ensaios clínicos e randomizados usando mAbs apresentaram benefícios potenciais para o CPCNP, e quatro deles já foram aprovados para o tratamento do CPCNP, como cetuximabe, atezolizumabe, nivolumabe e pembrolizumabe (Silva *et al.*, 2016; Tavares *et al.*, 2018). Outros mAbs já aprovados para o tratamento de tumores distintos, como catumaxomab, panitumumab e trastuzumab, também têm sido investigados como possíveis para neoplasias pulmonares, principalmente para CPCNP (Silva *et al.*, 2016).

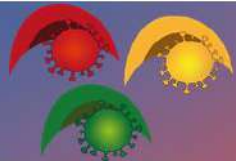
O bevacizumabe é um mAb que interage com o receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Bruneto *et al.*, 2019). Já o atezolizumabe, o nivolumabe e o pembrolizumabe são direcionados para o ligante de morte celular programada 1 (PDL-1) (Silva *et al.*, 2016). Este trabalho, delimitou-se a pesquisa acerca desses quatro mAbs, e o acervo dos trabalhos utilizados pode ser encontrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição amostral de achados científicos de acordo com títulos, objetivo de conclusão.

Ano	Autor	Título	Objetivo	Conclusão
2018	Kato <i>et al.</i>	Erlotinib Plus Bevacizumab Phase LI Study in Patients With	Fornecer análises atualizadas da segurança e a	A adição de bevacizumabe ao erlotinibe prolongou a



2017	Wakelee <i>et al.</i>	Advanced Non-small-Cell Lung Cancer (JO25567) Adjuvant Chemotherapy With or Without Bevacizumab in Patients With Resected Non-Small-Cell Lung Cancer (E1505)	avaliação da capacidade de eventos adversos Avaliar a adição de bevacizumabe à quimioterapia adjuvante em CPCNP ressecado em estágio inicial	sobrevida livre de progressão no CPCNP. A adição de bevacizumabe à quimioterapia adjuvante não melhorou a sobrevida global de pacientes com CPCNP em estágio inicial ressecado cirurgicamente
2017	Rittmeyer <i>et al.</i>	Atezolizumab Versus Docetaxel in Patients With Previously Treated Non-Small-Cell Lung Cancer (OAK)	Avaliar a eficácia e segurança do Atezolizumab em relação ao docetaxel em pacientes previamente tratados com CPCNP	O tratamento com atezolizumab, resultou em uma melhora clinicamente relevante da sobrevida global vs. docetaxel no CPCNP não tratado anteriormente.
2018	Horn <i>et al.</i>	First-Line Atezolizumab Plus Chemotherapy in Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer	Avaliar atezolizumabe mais carboplatina e etoposídeo em pacientes com CPPC em estágio extenso, que não haviam recebido tratamento anteriormente	A adição de atezolizumabe à quimioterapia no tratamento de primeira linha do CPPC em estágio extenso resultou em sobrevida global mais longa e sobrevida livre de progressão do que a quimioterapia isolada.
2016	Gettinger <i>et al.</i>	Nivolumab Monotherapy for First-Line Treatment of Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer	Avaliação da monoterapia de primeira linha com nivolumab para CPCNP avançado.	A monoterapia nivolumab de 1º linha demonstrou segurança tolerável e respostas duráveis no CPCNP avançado.



2016	Rizvi <i>et al.</i>	Nivolumab in Combination With Platinum-Based Doublet Chemotherapy for First-Line Treatment of Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer	Conduzir e explorar a segurança e eficácia do nivolumab como monoterapia ou combinado com as terapias padrão atuais no CPCNP avançado de primeira linha	O perfil de segurança do nivolumab mais quimioterapia à base de platina foi consistente com o esperado para agentes individuais; no entanto, a interrupção do tratamento relacionada aos AEs foi maior com a combinação.
2016	Reck <i>et al.</i>	Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer	Comparar a sobrevida livre de progressão entre os pacientes que receberam pembrolizumab e a quimioterapia à base de platina	Em pacientes com expressão avançada de CPCNP e PD-L1 em pelo menos 50% das células tumorais, o pembrolizumab foi associado a uma sobrevida mais longa e sem progressão e com menos eventos adversos do que a quimioterapia à base de platina.
2017	Hui <i>et al.</i>	Pembrolizumab as First-Line Therapy for Patients With PD-L1-positive Advanced Non-Small Cell Lung Cancer	Relatar a segurança a longo prazo e a atividade clínica do pembrolizumab como terapia de primeira linha para pacientes com CPCNP avançado e a correlação entre a expressão e a eficácia de PD-L1.	O pembrolizumab fornece benefícios promissores de longo prazo para o sistema operacional com um perfil de segurança gerenciável para CPCNP avançado sem tratamento com expressão de PD-L.

O bevacizumab é um mAb humanizado capaz de reduzir a expansão do tumor por induzir a diminuição da vascularização tumoral através controle do crescimento dos vasos sanguíneos ao redor dele (Bruneto *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2016). Foi o primeiro agente aprovado pela FDA (Food and Drug Administration), em 2004, contra a angiogênese tumoral, como tratamento de primeira linha do câncer colorretal metastazado, quando usado em combinação com quimioterapia (Silva *et al.*, 2016). Sua eficácia contra CPCNP foi comprovada quando utilizado em combinação com carboplatina e paclitaxel, sendo uma das recomendações terapêuticas de primeira linha da FDA para CPCNP (Ruiz-Ceja *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2016).



Um primeiro estudo analisado avaliou a eficácia da utilização do bevacizumab complementar à quimioterapia adjuvante, quando comparada ao tratamento apenas quimioterápico, em 1501 pacientes (Wakelee *et al.*, 2017). Os resultados mostraram que a adição de bevacizumab a quatro ciclos de quimioterapia adjuvante à base de cisplatina para CPCNP em estágio inicial ressecado não melhorou a sobrevida global, embora previamente o bevacizumab tenha demonstrado melhorar a sobrevida global e livre de progressão no CPCNP não escamoso, quando combinado com carboplatina e paclitaxel (Wakelee *et al.*, 2017).

Outro estudo, feito por Kato *et al.* (2018), obteve resultados gerais positivos ao adicionar o bevacizumab ao tratamento com erlotinibe, demonstrando que a terapia de bevacizumab mais erlotinibe obteve maior média de sobrevida livre de progressão em CPNPC positivo para mutação do VEGF, quando comparada à terapia apenas com erlotinibe. No entanto, os efeitos adversos foram maiores na terapia conjunta, principalmente devido à hipertensão, mas todas foram manejáveis e não levaram à interrupções precoces (Kato *et al.*, 2018).

O mAb atezolizumab proporciona um efeito antitumoral por se ligar ao PD-L1, bloqueando sua interação com a PD-1 (proteína de morte celular programada 1), e, conseqüentemente, aumentando a atividade das células T contra células tumorais e revigorando a imunidade anticâncer (Krishnamurthy; Jimeno, 2017). Também aprovado pela FDA para o tratamento de CPCNP metastático resistente à platina, e CPPC (Ruiz-Ceja *et al.*, 2017).

No estudo de Rittmeyer *et al.* (2016), foi demonstrada a significativa eficácia, com um perfil de segurança favorável, do atezolizumab em relação ao docetaxel. Os 425 pacientes que receberam o mAb por via intravenosa apresentaram a sobrevida global melhorada, em comparação com docetaxel, além de que a porcentagem de eventos adversos foi consideravelmente menor no grupo recebedor de atezolizumab, 15% dos pacientes, versus 43% do docetaxel (Rittmeyer *et al.*, 2016).

Com relação ao CPPC, o atezolizumab também se mostrou eficiente, tendo um efeito sinérgico à quimioterapia citotóxica. O estudo de Horn *et al.* (2018), verificou uma média de sobrevida global superior do grupo de 201 pacientes com CPPC em estágio extenso que receberam a terapia quimioterápica (carboplatina e etoposídeo) juntamente ao atezolizumab, em comparação aos 202 pacientes que receberam placebo adjunto à quimioterapia.

Tomando como linha condutora Reck (2016) e Hui (2017), pode-se afirmar que o pembrolizumab é um anticorpo anti-PD-1 que gerou bons resultados na fase clínica e fornece benefícios promissores de longo prazo para o sistema imune. Também, nota-se que em casos com alta expressão de PD-L1 e células neoplásicas, o pembrolizumab foi associado a uma sobrevida mais longa e com menos efeitos adversos se comparado a outros tratamentos inovadores.

Em 2015, a FDA aprovou o pembrolizumab como tratamento de segunda linha para pacientes com câncer de pulmão (Silva *et al.*, 2016). No Brasil, o medicamento passou a ser aprovado pela ANVISA em 2018, sendo utilizado em combinação com quimioterapia à base de platina e pemetrexede para o tratamento de primeira linha em pacientes com CPCNP, não escamoso e metastático independente da expressão do PD-L1 nas células tumorais.

Um dos mAbs atuais que se destacam é o nivolumab. O nivolumab é um anticorpo monoclonal do isótipo IgG4, que também inibe a molécula PD-1 (Silva *et al.*, 2016). Recentemente, ensaios têm sido realizados para testá-lo como uma espécie de terapia de manutenção, ou em combinação com quimioterapia ou outros agentes-alvo (bevacizumab, erlotinibe ou ipilimumab) em pacientes com estágios avançados. No estudo de Gettinger (2016) foi comprovado uma segurança tolerável e respostas duráveis no tratamento de CPCNP avançado. Rizvi (2016), também traz resultados positivos, afirmando que o perfil de segurança do nivolumab



mais quimioterapia à base de platina foi consistente, no entanto, o abandono tratamento foi maior com a combinação dos tratamentos.

4. CONCLUSÃO

A imunoterapia direcionada com mAbs é uma tecnologia aplicada recentemente a tumores, e que sua variedade tem crescido consideravelmente, apresentando significativas contribuições no tratamento do câncer de pulmão, com baixo índice de eventos adversos pois causam menos danos às células normais e os mAbs demonstram eficácia para tratamento do CPCNP e em combinação com outras terapias mais recorrentes, como radioterapia ou quimioterapia, sendo os mecanismos de ação mais recorrentes relacionados ao receptor do fator de crescimento epidérmico, PD-L1 e fator de crescimento endotelial vascular, podendo apresentar efeitos adversos mais frequentes como dor de cabeça, constipação, diarreia, náusea, hipertensão e efeitos colaterais no sistema imunológico.

5. REFERÊNCIAS

BADE, Brett C; CRUZ, Charles S Dela. Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clin. Chest Med.*, [S.l.], v. 41, n. 1, p. 1-24, 2020.

BRUNETO, Ricardo Vinícius et al. Anticorpos monoclonais no tratamento oncológico: revisão de literatura para o atendimento ao paciente e manejo das reações infusionais. *Arq. ciênc. saúde*, [S.l.], v. 26, n. 3, p. 173-178, dez. 2019.

GETTINGER, Scott et al. Nivolumab monotherapy for first-line treatment of advanced non–small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.*, v. 34, n. 25, p. 2980, 2016.

HIRSCH F. R.; SCAGLIOTTI G. V.; MULSHINE J. L. et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *Lancet*, [S.l.], v. 389, n. 10066, p. 299-311, 2017.

HORN L.; MANSFIELD A. S.; SZCZESNA A. et al. First-Line Atezolizumab plus Chemotherapy in Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.*, v. 379, n. 23, p. 2220-2229, 2018.

HUI, Rina et al. Pembrolizumab as first-line therapy for patients with PD-L1-positive advanced non-small cell lung cancer: a phase 1 trial. *Ann. Oncol.*, v. 28, n. 4, p. 874-881, 2017.

KATO T.; SETO T.; NISHIO M. et al. Erlotinib Plus Bevacizumab Phase II Study in Patients with Advanced Non-small-Cell Lung Cancer (JO25567): Updated Safety Results. *Drug Saf*, v. 41, n. 2, p. 229-237, 2018.

KRISHNAMURTHY A.; JIMENO A. Atezolizumab: A novel PD-L1 inhibitor in cancer therapy with a focus in bladder and non-small cell lung cancers. *Drugs Today (Barc)*, v. 53, n. 4, p. 217-237, 2017.

MAO, Yousheng et al. Epidemiology of lung cancer. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.*, [S.l.], v. 25, n. 3, p. 439–445, 2016.

RECK, Martin et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1–positive non–small-cell lung cancer. *N engl J med*, v. 375, p. 1823-1833, 2016.



RITTMeyer A.; BARSELI F.; WATERKAMP D. *et al.* Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *Lancet*, v. 389, p. 255-265, 2017.

RIZVI, Naiyer A. *et al.* Nivolumab in combination with platinum-based doublet chemotherapy for first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.*, v. 34, n. 25, p. 2969, 2016.

ROMASZKO, A. M.; DOBOSZYNSKA, A. Multiple primary lung cancer: A literature review. *Adv. Clin. Exp. Med.*, [S.l.], v. 27, n. 5, p. 725-730, 2018.

RUIZ-CEJA K. A.; CHIRINO Y. I. Current FDA-approved treatments for non-small cell lung cancer and potential biomarkers for its detection. *Biomed Pharmacother*, v. 90, p. 24-37, 2017.

SILVA, A. P. S.; COELHO, P. V.; ANAZETTI, M.; SIMIONI, P. U. Targeted therapies for the treatment of non-small-cell lung cancer: Monoclonal antibodies and biological inhibitors. *Hum. Vaccines Immunother*, v. 13, n. 4, p. 843-853, 2016.

SINGH, S.; KUMAR, N.; DWIWEDI, P. *et al.* Monoclonal Antibodies: A Review. *Curr. Clin. Pharmacol.*, v. 13, n. 2, p. 85-99, 2018.

STEVEN, A.; FISHER S. A.; ROBINSON B. W. Immunotherapy for lung cancer. *Respirology*, v. 21, n. 5, p. 821-833, 2016.

TAVARES, A. B. M. L. A.; LIMA NETO, J. X.; FULCO, U. L.; ALBUQUERQUE, E. L. Inhibition of the checkpoint protein PD-1 by the therapeutic antibody pembrolizumab outlined by quantum chemistry. *Sci. Rep.*, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2018.

WAKELEE H. A.; DAHLBERG S. E.; KELLER S. M. *et al.* Adjuvant chemotherapy with or without bevacizumab in patients with resected non-small-cell lung cancer (E1505): an open-label, multicentre, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.*, v. 18,



ÁREA DE SUBMISSÃO: Terapias em Saúde

USO INDISCRIMINADO DE PSICOTRÓPICOS PELOS PROFISSIONAIS DA SAÚDE

E.G.R. DE ARRUDA¹, T.I. DA SILVA¹, M. C. A. WANDERLEY² e R.L.N. GODONE^{1,3}

¹Universidade Maurício de Nassau, Caruaru-PE

² Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife-PE

³ Secretaria de Educação de Pernambuco, Recife-PE

E-mail para contato: emillyrocha90155@gmail.com

RESUMO – *Fármacos psicotrópicos se referem a drogas que atuam no cérebro. Essas substâncias alteram os processos psicológicos e cognitivos de uma pessoa. Infelizmente, muitos profissionais de saúde recorrem a elas, para o alívio emocional. Esse sofrimento é quase intrínseco, devido às condições extremamente adversas, e ao longo do horário de trabalho, a má qualidade de vida, o que pode ser um risco para o desenvolvimento de um distúrbio mental. O objetivo do trabalho é ressaltar a importância do profissional da psicologia na redução do uso dos psicotrópicos em profissionais atuantes no ramo hospitalar. Através da pesquisa do tipo revisão integrativa de caráter exploratório, e dos artigos indexados nas bases de dados Lilacs, Pipesc, Google Acadêmico e Sciello no período de 1997 á 2020. Foi analisado que terapias psicológicas são mais eficazes, por não possuírem efeitos adversos, e o uso desses psicotrópicos deve se tornar ultrapassado e substituído pelo acompanhamento psicológico. Por fim, conclui-se que a gestão hospitalar deve estar atenta aos possíveis sinais de esgotamento emocional dos seus trabalhadores, e fortalecer a frequência e contato da psicologia.*

Palavras-chaves: Psicologia. Prevenção. Estresse ocupacional

ABSTRACT- *Psychotropic drugs refer to drugs that act on the brain. These substances alter a person's psychological and cognitive processes. Unfortunately, many health professionals turn to them for emotional relief. This suffering is almost intrinsic, due to extremely adverse conditions, and during the working hours, the poor quality of life, which can be a risk for the development of a mental disorder. The objective of the work is to emphasize the importance of the psychology professional in reducing the use of psychotropic drugs in professionals working in the hospital sector. Through an exploratory integrative review of an exploratory nature, and articles indexed in the Lilacs, Pipesc, Google Academic and Sciello databases from 1997 to 2020. It was analyzed that psychological therapies are more effective, as they do not have adverse effects, and the use of these psychotropic drugs must become outdated and replaced by psychological counseling.*



Finally, it is concluded that hospital management must be attentive to the possible signs of emotional exhaustion of its workers, and strengthen the frequency and contact of psychology.

Keywords: Psychology. Prevention. Occupational stress

1. INTRODUÇÃO

No âmbito dos profissionais de saúde, observa-se de forma quase inerentes um sofrimento em virtude do cenário de extrema cobrança e extensas jornadas de trabalho, a associação desses fatores a uma má qualidade de vida desses profissionais de saúde pode atuar como fator de risco no desenvolvimento de transtornos psicológicos (SILVA, SOUZA & ANDRADE, 2020).

Freud em seu texto mal-estar na civilização discorre a respeito do sofrimento humano, que se inicia quando o mesmo abdica de suas vontades para poder viver em sociedade, ele cita três fontes de sofrimento inegável, entre elas o mal-estar inerente às relações sociais (FREUD, 2011).

Psicotrópicos ou psicoativos significa atração pelo psiquismo, e drogas psicotrópicas são aquelas que atuam sobre o nosso cérebro, alterando de alguma maneira o nosso psiquismo (CEBRID-Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas). Essas substâncias, alteram os processos mentais, cognitivos de uma pessoa. É comum o termo "droga" ser visto como algo nocivo pela sociedade, em virtude de não produzir benefícios. Primordialmente, analisa-se no cenário atual vigente o uso desmedido de suas alterações. No entanto, muitos profissionais de saúde realizam o uso constante desses psicotrópicos, isso faz com que aumente a preocupação da gestão hospitalar pela segurança de seus pacientes e saúde mental desses funcionários, evidenciando o apoio e acompanhamento imprescindível dos psicólogos para melhor que esses profissionais possam exercer com excelência suas funções organizacionais (OLIVEIRA, RODACOSKI & SDOUKOS, 2019).

Dessa forma, este estudo teve como objetivo avaliar o contexto dos profissionais de saúde que fazem o uso de forma indiscriminada e abusiva de psicotrópicos, a partir do ponto de vista dos usuários e dos profissionais de saúde, por meio de uma revisão integrativa da literatura, método que viabiliza a análise de pesquisas científicas de modo sistemático e amplo, favorecendo a caracterização e divulgação do conhecimento produzido.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A partir da problemática levantada anteriormente, para alcançar o objetivo proposto, foi realizada uma pesquisa integrativa de caráter exploratório, com metodologia quantitativa, baseada em estudos teóricos, dos resultados obtidos por outros autores especializados no assunto, trazendo assim conhecimento científico sobre o uso indiscriminado dos psicotrópicos pelos profissionais de saúde.

O presente trabalho foi desenvolvido através de revisão da literatura, utilizando para busca os sites das bibliotecas: Scielo, Pipesc e Lilacs no período de 1997 a 2020. Como palavras-chave foram utilizados os seguintes termos: “psicotrópicos”, “psicofármacos”, “saúde mental”, “profissional de saúde” e “psicofarmacologia”. Os critérios de exclusão compreenderam: artigos de revisões de literatura, os que contemplavam mais de uma classe de medicamentos além dos psicotrópicos e estudos que não caracterizavam ações do uso de psicotrópicos exclusivamente por profissionais de saúde. E como critérios de inclusão foram analisados aqueles que contemplavam o tema principal do trabalho.



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram selecionadas 18 publicações que contemplavam os critérios estabelecidos. Os resultados foram apresentados através dos dados encontrados no delineamento observacional: características como variáveis socioeconômicas; características do uso de psicotrópicos; características dos serviços, profissionais prescritores e das prescrições; e características das fontes de dados, foram levadas em consideração.

A maior prevalência de transtornos de ansiedade e depressão foi observada no sexo feminino, bem como a maior utilização dos serviços de saúde por elas, são fatores responsáveis pelo maior uso dessa classe de medicamentos (RODRIGUES et al., 2006). A utilização de psicofármacos, no que diz respeito ao sexo, é prevalente entre as mulheres (FIRMINO et al., 2011; LIMA et al., 2008; GARCIAS et al., 2008; HURTADO et al., 2010; MACHADO-ALBA et al., 2011; KJOSAVIK et al., 2009). Em 12 de maio de 1998 foi criada no Brasil a portaria 344/98 que regulamenta a prescrição destes psicotrópicos, bem como sua adição a lista B1. O uso indiscriminado tem sido observado independente do grau e desenvolvimento econômico estando desde os grandes centros urbanos até a população rural, estima-se que no Brasil 1,6% da população seja usuária crônica de psicotrópicos. (SILVIA et al 2013 e NUNES e BASTOS 2016).

Resultados encontrados mostram que os profissionais de saúde que fazem uso indiscriminado de psicotrópicos por um período de tempo prolongado é um fator causador de dependência, sendo assim mais difícil de interromper seu uso, causando abstinência. (NUNES e BASTOS 2016). Elevada parcela desses profissionais busca soluções rápidas para diminuição nos seus casos de sofrimento psicológico, muitas vezes buscam de forma precipitada o uso dessas medicações, em prol de obter o efeito desejado com mais facilidade. Numerosos profissionais desconhecem também os efeitos colaterais que os psicoativos podem trazer a sua vida. Além disso, a inteligência emocional é algo que deve ser desenvolvido ao longo do tempo, porque isso promove a capacidade de avaliar emoções para promover o crescimento emocional e intelectual (BASU & MASON, 2017). Vale ressaltar, que a gestão hospitalar deveria estar devidamente atenta a esses profissionais, tendo em vista que muitas são as dificuldades que eles enfrentam e muitas vezes, se responsabilizam (BORGES, ARGOLO & BAKER, 2006). Como consequência, pode-se observar que a depressão se enquadra nesse cenário, seus sintomas consistem no “humor deprimido, viés negativo de interpretação, perda do interesse, sentimentos inapropriados de culpa, ideação suicida, ansiedade, irritabilidade e anedonia (LACERDA et al., 2009).

Outro fator, é que a síndrome de burnout também está incluída e tem relações com a depressão, conhecida como “síndrome do enfermeiro”, pela exaustão emocional e insatisfação profissional (RODRIGUES et al., 2018). (Figura 1).

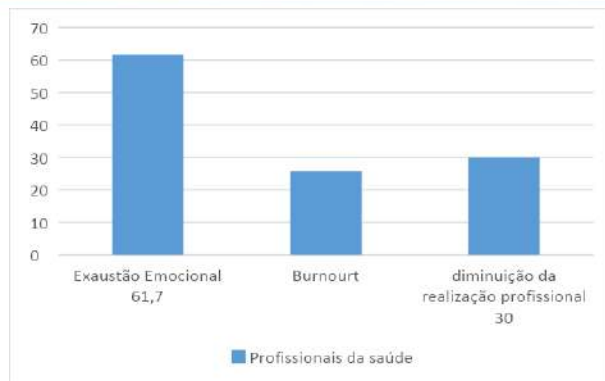


Figura 1: Transtornos psíquicos na área hospitalar. Fonte: Adaptado de SOUZA, 2013.

4. CONCLUSÃO

Portanto, através do uso de psicotrópicos é possível analisar uma redução nos casos de sofrimento emocional dos sujeitos envolvidos, entretanto em alguns casos essa medicação é prescrita de forma equivocada, para tanto é necessária maior conscientização desses profissionais a respeito da importância e benefícios bem como do alívio do sofrimento através das técnicas da terapia cognitivo comportamental, atuando na identificação de comportamentos limitantes, buscando ressignificar e estruturar de forma nova tais comportamentos. A fim de minimizar o desenvolvimento do uso, que eventualmente, atrapalha o seu desempenho.

A gestão hospitalar deve monitorar esses profissionais, dando-lhes assistência e atenção necessárias, promovendo a melhoria da qualidade de serviço. Além de evidenciar que o acompanhamento psicológico não pode ser negado, substituído ou interferido.

5. REFERÊNCIAS

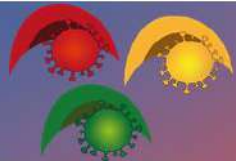
BASU S, QAYYUM H, MASON S. (2017) Occupational stress in the ED: a systematic literature review. *Emerg Med J.* 34(7):441-447. doi:10.1136/emermed-2016-205827.

BORGES, L. O., ARGOLO, J. C. T., & BAKER, M. C. S. (2006). Os valores organizacionais e a Síndrome de Burnout: Dois momentos em uma maternidade pública. *Psicologia: Reflexão e Crítica*, 19 (1), 34-43.

DA SILVA, J. C. S., DE SOUZA, F. D. C. R., & DE ANDRADE AOYAMA, E. (2020). A incidência do uso indiscriminado de medicamentos. *Revista Brasileira Interdisciplinar de Saúde*, 2(1).

FIRMINO, K. F. et al. (2012) Fatores associados ao uso de benzodiazepínicos no serviço municipal de saúde da cidade de Coronel Fabriciano, Minas Gerais, Brasil. *Cad. Saude Publica*, Rio de Janeiro, v. 27, n. 6, p. 1223- 1232.

FREUD, S. (2011). O mal-estar na civilização. São Paulo: Penguin e Companhia das Letras.



GARCIAS, C. M. M. et al. (2008) Prevalência e fatores associados ao uso de antidepressivos em adultos de área urbana de Pelotas, Rio Grande do Sul, em 2006. *Cad. Saude Publica*, Rio de Janeiro, v. 24, n. 7, p. 1565- 1571.

HURTADO, L. R. et al. (2010) Factors associated to antidepressant prescription for civil servants of Belo Horizonte, MG. *Braz. J. Pharm. Sci.*, São Paulo, v. 46, n. 2.

KJOSAVIK, S. R.; RUTHS, S.; HUNSKAAR, S. (2009) Psychotropic drug use in the Norwegian general population in 2005: data from the Norwegian Prescription Database. *Pharmacoepidemiol. drug saf.*, Chichester, v. 18, n.7,p. 572-578.

LACERDA, A. L. T. de et al. (2009) Depressão: Do neurônio ao funcionamento social. 1. Porto Alegre: Artmed. 360 p.

LIMA, M. C.P. et al. (2008) Transtornos mentais comuns e uso de psicofármacos: impacto das condições socioeconômicas. *Rev. Saude Publica*, São Paulo, v. 42, n. 4, p. 717-723.

MACHADO-ALBA, J. E.; MORALES-PLAZA, C. D.; SOLARTE-GÓMEZ, M. J. (2011) Patrones de prescripción de antidepressivos en pacientes afiliados al Sistema General de Seguridad Social en Salud de Colombia. *Rev. Panam. Salud. Publica.*, Washington, v. 30, n. 5, p. 461–468.

NUNES B. S.; BASTOS, F.M. (2016) Efeitos colaterais atribuídos ao uso indevido e prolongado de benzodiazepínicos. SAÚDE & CIÊNCIA EM AÇÃO – *Revista Acadêmica do Instituto de Ciências da Saúde*. v.3, n. 01: Agosto-Dezembro ISSN: 2447 9330.

OLIVEIRA MINAS, H., RODACOSKI, G. C., & SDOUKOS, S. S. A. (2019). Uso de medicamentos psicoativos pelos profissionais de saúde da atenção básica. *Revista de Saúde Pública do Paraná*, 2, 38-46.

RODRIGUES H, COBUCCI R, OLIVEIRA A, et al. (2018) Burnout syndrome among medical residents: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 13(11): e0206840. Published 2018 Nov 12. doi:10.1371/journal.pone.0206840.

RODRIGUES, M. A. P.; FACCHINI, L. A.; LIMA, M. S. (2006). Modificações nos padrões de consumo de psicofármacos em localidade do Sul do Brasil. *Rev. Saude Publica.*, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 107-114.

SILVIA, R. O.; BATISTA L.M.;ASSIS T.S. (2013) Analise do perfil de uso de benzodiazepínicos de um hospital universitário da Paraíba.*Rev. Bras.Farm.*Rio de Janeiro v.94 n. (1) p.59-65.

SOUSA, E C M. (2013). A Síndrome de Burnout em Profissionais de Saúde. *Psicologia Hospitalar*.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Terapias em Saúde

POLIMORFISMOS GENÉTICOS NO CONTEXTO DA COVID-19

A. F. SANTOS¹, A. F. da SILVA FILHO², M. C. PEREIRA³, M. J. B. M. RÊGO⁴

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica;

² Universidade Federal de Pernambuco, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica;

³ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmacologia e Fisiologia;

⁴ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica.

E-mail para contato: anderson.fsantos@ufpe.br

RESUMO – enquanto estão sendo realizados estudos genéticos em larga escala de pacientes com COVID-19, como os coordenados pelo consórcio de genética hospedeira COVID, tem surgido estudos para avaliar os efeitos de variantes genéticas nos genes envolvidos na infecção por SARS-CoV-2 em fenótipos humanos. O presente estudo objetiva identificar polimorfismos de nucleotídeo único relatados na literatura, relacionados em genes relacionados a infecção pelo SARS-CoV-2 e a Covid-19 bem como suas referidas repercussões funcionais. Esta pesquisa consiste em um estudo de revisão integrativa. Foram utilizados artigos indexados e a busca ocorreu no mês de julho de 2020, nas bases de dados Pubmed e ScienceDirect utilizando as terminologias “polymorphism” e “covid-19” e operador booleano “and”. Dos 17 artigos até então inseridos no estudo, 4 foram excluídos por estarem duplicados. Dos 13 restantes, 5 foram excluídos. Os resultados apontando referem basicamente tres genes associadas a invasão Viral, os genes ACE2 e ACE1 que codificam enzimas conversoras de Angiotensina, e o gene TMPRSS2, que codifica a chamada Transmembrane Serine Protease 2. Alelos variantes nos genes Ace1, Ace2 e TMPRSS2 podem interferir no risco de infecção pelo SARS-CoV-2 e gravidade da Covid-19, tendo em vista a interferência na estabilidade proteica e alteração da capacidade de interação com ligante específico. Portanto, são necessários mais estudo nesta perspectiva para esclarecer melhor aspectos individuais.

Palavras-chave: SARS-CoV-2. ACE1, ACE2, TMPRSS2.

ABSTRACT - while large-scale genetic studies of patients with COVID-19 are being conducted, such as those coordinated by the host genetics consortium COVID, studies have emerged to assess the effects of genetic variants on the genes involved in SARS-CoV-2 infection in human phenotypes. The present study aims to identify single nucleotide polymorphisms reported in the literature, related to genes related to infection by SARS-CoV-2 and Covid-19 as well as their functional repercussions. This research consists of an integrative review study. Indexed articles were used and the search took place in July 2020, in the Pubmed and ScienceDirect databases using the



terminologies “polymorphism” and “covid-19” and Boolean operator “and”. Of the 17 articles hitherto included in the study, 4 were excluded because they were duplicated. Of the remaining 13, 5 were excluded. The pointed results refer basically to three genes associated with Viral invasion, the ACE2 and ACE1 genes that encode Angiotensin-converting enzymes, and the TMPRSS2 gene, which encodes the so-called Transmembrane Serine Protease 2. Variant alleles in the Ace1, Ace2 and TMPRSS2 genes can interfere in the risk of infection by SARS-CoV-2 and severity of Covid-19, in view of the interference with protein stability and alteration of the ability to interact with specific ligand. Therefore, more study is needed in this perspective to better clarify individual aspects.

Keywords: SARS-CoV-2. ACE1, ACE2, TMPRSS2.

1. INTRODUÇÃO

O recente surto da doença de coronavírus 2019 (COVID-19) causado pelo vírus SARS-CoV-2 rapidamente se tornou uma pandemia e representa uma grande ameaça para a saúde pública (Maya *et al.*, 2020). O que decorre das taxas de mortalidade, bem como a capacidade infecciosa do vírus, variando de 1% a > 5% em todo o mundo (Bosso *et al.*, 2020).

A infectividade viral dos vírus corona patogênicos (vírus corona da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV e SARS-CoV-2) está relacionada a enzima conversora de angiotensina 2, tendo em vista que eles se ligam às células-alvo através desta. O ACE2 não apenas facilita a invasão do vírus SARS para replicação rápida, mas também o ACE2 está esgotado da membrana celular e, portanto, os efeitos prejudiciais do Ang II são aumentados, resultando em deterioração aguda dos tecidos pulmonares (Delanghe; Speeckaert; Buyzere, 2020).

Os sintomas do COVID-19 variam de febre, tosse seca, fadiga, congestão e dor de garganta e diarreia a pneumonia intersticial bilateral grave com imagem em vidro fosco na tomografia computadorizada (Benetti *et al.*, 2020).

Embora estudos recentes forneçam evidências de um alto número de pacientes assintomáticos ou paucissintomáticos que representam o principal reservatório para a progressão da infecção, os casos graves podem evoluir rapidamente para uma síndrome do desconforto respiratório que pode ser letal. Embora a idade e a comorbidade tenham sido descritas como os principais determinantes da progressão da doença em direção a um desconforto respiratório grave, a alta variação na gravidade clínica entre adultos e crianças de meia idade provavelmente sugere um forte papel do ativo genético do hospedeiro (Benetti *et al.*, 2020).

Fatores genéticos humanos podem contribuir para a transmissibilidade extremamente alta da SARS-CoV-2 e para a doença progressivamente implacável observada em uma proporção pequena, mas significativa, de indivíduos infectados; no entanto, esses fatores são desconhecidos (Hou *et al.*, 2020).

Enquanto estão sendo realizados estudos genéticos em larga escala de pacientes com COVID-19, como os coordenados pelo consórcio de genética hospedeira COVID, tem surgido estudos para avaliar os efeitos de variantes genéticas nos genes envolvidos na infecção por SARS-CoV-2 em fenótipos humanos, incluindo características quantitativas, aproveitando as coortes já existentes. De fato, embora os fenótipos quantitativos nem sempre estejam diretamente associados a uma doença, o conhecimento das variantes genéticas que modulam essas características pode melhorar nossa compreensão do início da doença e da variabilidade nos sintomas (Maya *et al.*, 2020).



Nesse contexto, em que diversos estudos estão sendo desenvolvidos para avaliar a relação entre alelos variantes em diversos genes relacionados a infecção pelo SARS-CoV-2 e a Covid-19, o presente estudo objetiva identificar polimorfismos de nucleotídeo único relatados na literatura, relacionados em genes relacionados a infecção pelo SARS-CoV-2 e a Covid-19 bem como suas referidas repercussões funcionais.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa consiste em um estudo de revisão integrativa. Portanto, para guiá-lo foi estabelecida a seguinte questão norteadora: Qual a correlação entre polimorfismos nos mais diversos genes e a COVID-19?

Foram utilizados artigos indexados e a busca ocorreu no mês de julho de 2020, nas bases de dados Pubmed e ScienceDirect utilizando as terminologias “polymorphism” e “covid-19” e operador booleano “and”. A busca utilizando os termos resultou na identificação de 409 artigos no Pubmed e 189 artigos no ScienceDirect. Destes, somente 11 do Pubmed e 6 do ScienceDirect tinham título e resumo relacionados ao tema.

Dos 17 artigos até então inseridos no estudo, 4 foram excluídos por estarem duplicados. Dos 13 restantes, 5 foram excluídos por serem artigos de revisão, não trazerem dados de genotipagem ou não apontarem correlação entre algum polimorfismo e a infecção pelo SARS-CoV-2 ou Covid-19.

Com intuito de viabilizar a análise dos artigos que integraram a revisão, utilizou-se um formulário de coleta contendo informações acerca do título do artigo, país de publicação, gene, polimorfismo estudado e associações clínicas.

Os procedimentos de análise dos dados envolveram a leitura e releitura dos manuscritos selecionados e distribuição dos dados no referido formulário de coleta, com posterior análise dos pontos de convergência e divergência de cada paper para definição dos aspectos a serem abordados na discussão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O quadro 1 agrega informações acerca de estudos que avaliaram polimorfismos em genes relacionados a infecção pelo SARS-CoV-2 e a Covid-19.

Quadro 1 – Polimorfismos em genes relacionados a infecção pelo SARS-CoV-2 e a Covid-19

Título	País	Gene	Polimorfismos
Lack of Association Between Genetic Variants at ACE2 and TMPRSS2 Genes Involved in SARS-CoV-2 Infection and Human Quantitative Phenotypes	Itália	ACE2	rs17264937, rs5980163, rs150965978, rs28401567
The Expression and Polymorphism of Entry Machinery for COVID-19 in Human: Juxtaposing Population Groups, Gender, and Different Tissues	Dinamarca	ACE2	S19P, I21V, I21T, E23K, A25T, K26R, T27A, E75G, T92I, Q102P, H378R, E35K, E37K, Y50F, N51D, N51S, M62V, K68E, K68E,



			M82I, G326E, E329G, G352V, D355N, Q388L, P389H, R505R
ACE2 and TMPRSS2 variants and expression as candidates to sex and country differences in COVID-19 severity in Italy	Itália	ACE2/ TMPRSS2	c.439 + 4G> A, p.Val749Val/ p.Gly259Gly, p.Ile256Ile, p.Val160Met, p.Thr75Thr
First comprehensive computational analysis of functional consequences of TMPRSS2 SNPs in susceptibility to SARS-CoV-2 among different populations	Irã	TMPRSS2	rs423596, rs8134203, rs464431, rs2298662, rs2094881, rs75603675, rs456142, rs462574 e rs456298, rs402197 e rs456016, rs422761, rs8134203, rs2094881, rs75603675, rs456142, rs462574, rs456298 e rs12473206, rs461194
Structural variations in human ACE2 may influence its binding with SARS-CoV-2 spike protein	Paquistão	ACE2	S19P, K26E e M82I
ACE2 gene variants may underlie interindividual variability and susceptibility to COVID-19 in the Italian population	Itália	ACE2	c.1166C> A p. (Pro389His) e c.1051C> G p. (Leu351Val)
New insights into genetic susceptibility of COVID-19: an ACE2 and TMPRSS2 polymorphism analysis	Estados Unidos	ACE2/ TMPRSS2	p.Met383Thr, p.Pro389His, p.Asp427Tyr, p.Arg708Trp, p.Arg710Cys, p.Arg710His, p.Arg716Cys, p.Leu731Phe/ .Val160Met, p.Gly181Arg, p.Arg240Cys, p.Gly259Ser, p.Pro335Leu e p.Gly432Ala
SARS-CoV-2 infections and COVID-19 mortalities strongly correlate with ACE1 I/D genotype	Alemanha	ACE1	ACE1 I / D

Os resultados apontados referem basicamente tres genes associadas a invasão Viral, os genes ACE2 e ACE1 que codificam enzimas conversoras de Angiotensina, e o gene TMPRSS2, que codifica a chamada *Transmembrane Serine Protease 2*.



Polimorfismos em ACE2

O gene *ACE2* codifica uma metaloprotease de zinco que atua como uma molécula receptora para três cepas de coronavírus, SARS-CoV, NL63 e, recentemente, SARS-CoV-2. Vários estudos explicaram as variações na proteína de pico de coronavírus no receptor ACE2 do hospedeiro para prever e / ou provar a origem e o potencial da transmissão cruzada do vírus. Contudo, menos atenção tem sido dada para explorar o efeito de variantes genéticas e de expressão naturais da ACE2 humana na potencial suscetibilidade e / ou resistência à infecção por coronavírus. Ensaios *in vitro* mostraram que a expressão de ACE2 está positivamente correlacionada com a infecção por SARS-CoV. Da mesma forma, foram propostas variantes genéticas na ACE2 para afetar a interação do receptor com a proteína de pico viral (Hussain *et al.*, 2020).

As variantes c.1166C> A p. (Pro389His) e c.1051C> G p. (Leu351Val), localizadas na região para a interação da proteína spike, são caracterizadas por um efeito desestabilizador parcialmente sobreposto. Juntamente com essas variantes mais comuns, também foram identificadas variantes muito raras, como a c.1166C> A p. (Pro389His) e a c.1051C> G p. (Leu351Val), algumas das quais descritas apenas na população européia não finlandesa, que poderiam gerar uma afinidade diferente para a proteína do pico de SARS-CoV-2 (Benetti *et al.*, 2020).

Desse modo, pode-se afirmar que diversas variantes interferem na estabilidade proteica e, conseqüentemente, em diferentes riscos de desenvolvimento e gravidade da Covid-19.

É plausível pensar que o efeito da variabilidade alélica na conformação da ECA2 seria pelo menos parcialmente responsável pelas diferenças clínicas interindividuais e provavelmente modularia a gravidade clínica. Esse achado reforça a hipótese de que pelo menos algumas das variantes identificadas ou o efeito cumulativo de poucas conferem uma suscetibilidade diferente à entrada de células virais e, conseqüentemente, ao início e progressão da doença. Não podemos excluir que também variantes silenciosas, como a c.2247G> A (p.Val749Val) sem efeito sobre a proteína, possam desempenhar um papel devido a um impacto imprevisível no nível pós-transcricional (Benneti *et al.*, 2020).

Variantes em TMPRSS2

O *TMPRSS2* é um gene conhecido pelos oncologistas como rearranjos genéticos que produzem uma fusão entre o *TMPRSS2* e o *ERG* (ou, mais raramente, outros membros da família ETS). Como o *TMPRSS2* é um gene responsivo ao androgênio, a fusão resulta na transcrição do *ERG* dependente de androgênio nas células tumorais da próstata. Portanto, pode-se supor que os homens também possam ter maior expressão de *TMPRSS2* no pulmão, o que pode melhorar a capacidade do SARS-CoV-2 de entrar nas células, promovendo a fusão da membrana (Asselta *et al.*, 2020)

Dado o papel crucial do *TMPRSS2* na entrada celular de SARS-CoV-2, a variação ou desregulação do *TMPRSS2* pode influenciar a suscetibilidade dos indivíduos à infecção por SARS-CoV-2.

Resultados demonstram uma nova proteína após a conversão de V197M em uma região ampla que provavelmente afetou a estrutura de *TMPRSS2* e, portanto, afetou provavelmente seu papel na entrada de células SARS-CoV2 (Paniri; Hosseini; Akhavan-Niaki, 2020).

Esses polimorfismos únicos, mas predominantes, no *TMPRSS2* oferecem explicações



potenciais para a suscetibilidade genética diferencial ao COVID-19, bem como para fatores de risco, incluindo aqueles com câncer e o grupo de alto risco de pacientes do sexo masculino (Hou *et al.*, 2020).

Polimorfismos em ACE1

Foi relatado que os níveis séricos de ACE1 são significativamente mais altos naqueles com o genótipo DD em comparação com aqueles com os genótipos ID ou II. Além disso, como o ACE2 é um receptor para SARS-COV-2, a infecção viral pode levar à supressão da função do ACE2 e causar desequilíbrio do ACE1 / ACE2 responsável pela superativação do RAAS e pelo desligamento pulmonar. Isso pode reduzir ainda mais os efeitos da ACE2, que neutralizam os efeitos fisiopatológicos da Ang II produzidos pela ACE1 e podem piorar a patologia. O desequilíbrio ACE1 / ACE2 prediz que pacientes COVID-19 com o alelo D da ACE1, especialmente o genótipo DD, terão uma maior gravidade da doença, como observado em pacientes com SARS com um genótipo ACE1 DD. No entanto, um relatório constatou que o *polimorfismo* I / D da ACE1 não está diretamente relacionado à suscetibilidade à infecção por SARS-CoV nem ao desenvolvimento de SARS (Yamamoto *et al.*, 2020).

Pensa-se também que o polimorfismo ACE1 I / D esteja associado ao reflexo da tosse. Sabe-se que a aspiração por diminuição da tosse com o envelhecimento é a principal causa de pneumonia em idosos. Morimoto *et al.* relataram que o alelo ACE1 D contribui para o risco de pneumonia em idosos japoneses. Eles propõem um modelo em que a alta expressão de ACE1 no genótipo ACE1 DD reduz a substância P e aumenta o risco de pneumonia devido a um reflexo de tosse reduzido. Além disso, um grupo chinês realizou uma *meta-análise* de 12 estudos sobre pneumonia e ECA1 incluindo estudos do Japão e da Holanda, e concluiu que o *risco de* polimorfismo e pneumonia da ECA1 I / D está significativamente associado. Esses estudos, realizados durante a era pré-COVID-19, estão de acordo com a observação de muito menos casos e mortes devido ao COVID-19 em populações asiáticas com alta frequência de genótipos ACE1 II (Yamamoto *et al.*, 2020).

Os resultados indicados por Yamamoto e colaboradores (2020) referem que um gene (ACE1) e seu genótipo (I / D) parecem fornecer uma explicação plausível para o motivo pelo qual alguns grupos étnicos, especialmente as populações europeias, foram mais afetados pelo SARS-CoV-2 do que as populações asiáticas. Acreditamos que esta é uma questão muito singular e importante em doenças infecciosas. Essa diferença étnica nunca foi experimentada no passado, mesmo na pandemia de influenza de 1918 que causou altas taxas de mortalidade ou com SARS e MERS, que em muitos aspectos são considerados muito semelhantes ao COVID-19. Nesta análise, mostramos pela primeira vez que a prevalência do alelo D na ECA1O gene está envolvido integralmente na suscetibilidade à infecção por SARS-CoV-2 e na exacerbação dos sintomas da COVID-19, como pneumonia.

4. CONCLUSÃO

Alelos variantes nos genes Ace1, Ace2 e TMPRSS2 podem interferir no risco de infecção pelo SARS-CoV-2 e gravidade da Covid-19, tendo em vista a interferência na estabilidade proteica e alteração da capacidade de interação com ligante específico. Portanto, são necessários mais estudo nesta perspectiva para esclarecer melhor aspectos individuais.



5. REFERÊNCIAS

- ASSELTA, R. et al. *ACE2* and *TMPRSS2* variants and expression as candidates to sex and country differences in COVID-19 severity in Italy. *Aging (Albany NY)*, v. 12, n. 11, p. 10087–10098, 2020.
- BENETTI, E. et al. *ACE2* gene variants may underlie interindividual variability and susceptibility to COVID-19 in the Italian population. *Eur J Hum Genet.*, v. 17, p. 1-13, 2020.
- BOSSO, M. et al. The Two Faces of *ACE2*: The Role of *ACE2* Receptor and Its Polymorphisms in Hypertension and COVID-19. *Mol Ther Methods Clin Dev.*, v. 18, p. 321-327, 2020.
- DARBANI, B. The Expression and Polymorphism of Entry Machinery for COVID-19 in Human: Juxtaposing Population Groups, Gender, and Different Tissues. *Int J Environ Res Public Health.*, v. 17, n. 10, p. 3433, 2020.
- DELANGHE, J. R.; SPEECKAERT, M. M.; BUYZERE, M. L. The host's angiotensin-converting enzyme polymorphism may explain epidemiological findings in COVID-19 infections. *Clin Chim Acta.*, v. 505, p. 192-193, 2020.
- DEVAUX, C. A. et al. *ACE2* receptor polymorphism: Susceptibility to SARS-CoV-2, hypertension, multi-organ failure, and COVID-19 disease outcome. *J Microbiol Immunol Infect.*, v. 53, n. 2, p. 425-435, 2020.
- HOU, Y. et al. New insights into genetic susceptibility of COVID-19: an *ACE2* and *TMPRSS2* polymorphism analysis. *BMC Med.*, v. 18, p. 216, 2020.
- HUSSAIN, M. et al. Structural variations in human *ACE2* may influence its binding with SARS-CoV-2 spike protein. *J Med Virol.*, v. 15, 2020.
- MAYA, E. A. L. et al. Lack of Association Between Genetic Variants at *ACE2* and *TMPRSS2* Genes Involved in SARS-CoV-2 Infection and Human Quantitative Phenotypes. *Front Genet.*, v. 11, p. 613, 2020.
- PANIRI, A.; HOSSEINI, M. M.; AKHAVAN-NIAKI, H. First comprehensive computational analysis of functional consequences of *TMPRSS2* SNPs in susceptibility to SARS-CoV-2 among different populations. *J Biomol Struct Dyn.*, p. 1-18, 2020.
- SAADAT, M. An evidence for correlation between the glutathione S-transferase T1 (*GSTT1*) polymorphism and outcome of COVID-19. *Clin Chim Acta.*, v. 508, p. 213-216, 2020.
- ULHAQ, Z. S.; SORAYA, G. V. V. Anti-IL-6 receptor antibody treatment for severe COVID-19 and the potential implication of *IL-6* gene polymorphisms in novel coronavirus pneumonia. *Medicina Clinica*, 2020.
- YAMAMOTO, N. et al. SARS-CoV-2 infections and COVID-19 mortalities strongly correlate with *ACE1* I/D genotype. *Gene*, 2020.

6. AGRADECIMENTOS

Direcionamos os agradecimentos a CAPES e ao Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Terapias em Saúde

ALTERNATIVAS PROMISSORAS DE VACINAS NA PREVENÇÃO DO COVID-19

M. A. S. ARAÚJO¹, M. M. A. F. SILVA², B. C. FREITAS³ e M. L. C. M. G. R. BARROS⁴

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas;

² Centro Universitário Brasileiro, Departamento de Farmácia;

³ Centro Universitário Brasileiro, Departamento de Farmácia;

⁴ Centro Universitário Brasileiro, Departamento de Farmácia.

E-mail para contato: marcos.araujo9199@gmail.com

RESUMO - *O presente artigo tem como base a análise da corrida mundial na busca de uma vacina capaz de combater o novo coronavírus humano (SARS-CoV-2) que é o causador da pandemia surgida no ano de 2020 com alto índice de infectados. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) há 166 vacinas candidatas com estudos em andamento, possuindo diversos componentes inovadores que apresentam competência para diminuir a disseminação do vírus pelo mundo. O objetivo do artigo é fazer o levantamento de algumas vacinas promissoras ressaltando mecanismos e alternativas que mostram ser eficazes, porém ainda em estudo, além de apresentar detalhes sobre o tratamento atual. A metodologia baseia-se em uma revisão bibliográfica descritiva de caráter exploratório com abordagem qualitativa, onde foi realizado o levantamento de artigos e estudos publicados em revistas renomadas, ambos atualizados recentemente. Resultados mostram detalhes da ação do SARS-CoV-2 quando está em processo de infecção na célula para melhor entendimento dos mecanismos de ação das futuras vacinas, explanando também suas características promissoras. Concluindo que nesse contexto pandêmico, a busca por tecnologias inovadoras no desenvolvimento da vacina para o coronavírus exige grande conhecimento científico, sendo os impactos econômicos e humanos, um incentivo para desenvolvê-las rapidamente, com expectativas de uma resposta imunológica duradora, segura e eficaz, para assim, ser aprovada em sua finalidade.*

Palavras-chaves: SARS-CoV-2. Vacinas. Fisiopatologia. Terapia. Glicoproteína S.

ABSTRACT - *This article is based on the analysis of the global race in search of a vaccine capable of combating the new human coronavirus (SARS-CoV-2) that is the cause of the pandemic that emerged in the year 2020 with a high rate of infected people. According to the World Health Organization (WHO), there are 166 vaccine candidates with ongoing studies, having several innovative components that have the competence to reduce the spread of the virus around the*



world. The objective of the article is to survey some promising vaccines, highlighting mechanisms and alternatives that prove to be effective, but still under study, in addition to presenting details about current treatment. The methodology is based on an exploratory descriptive bibliographic review with a qualitative approach, where the survey of articles and studies published in renowned journals, both recently updated, was carried out. Results show details of the action of SARS-CoV-2 when it is in the process of infection in the cell to better understand the mechanisms of action of future vaccines, also explaining its promising characteristics. Concluding that in this pandemic context, the search for innovative technologies in the development of the coronavirus vaccine requires great scientific knowledge, and the economic and human impacts are an incentive to develop them quickly, with expectations of a golden, safe and effective immune response, thus, be approved in its purpose.

Keywords: SARS-CoV-2. Vaccines. Pathophysiology. Therapy. S glycoprotein.

1. INTRODUÇÃO

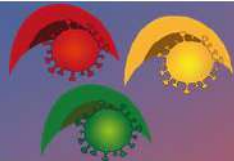
A origem da pandemia do covid-19 se dá na China em dezembro 2019, causado por um novo coronavírus denominado de SARS-CoV-2, pertence à família *Coronaviridae* e à ordem *Nidovirales* sendo capaz de desenvolver síndrome respiratória aguda grave em humanos (ISMAIL *et al.*, 2020). Ele infecta preferencialmente o trato respiratório, e apesar da maioria dos pacientes infectados apresentarem cura, uma parcela, geralmente pessoas acima de 60 anos de idade e com complicações médicas a exemplo de câncer e doenças cardiovasculares (DEB *et al.*, 2020), acaba evoluindo para condições graves como pneumonia grave, edema pulmonar e síndrome do desconforto respiratório agudo, além de falência dos órgãos e choque séptico, que levam ao óbito (AHAMMAD; LIRA, 2020).

Os sintomas clínicos mais relatados do SARS-CoV-2 são tosse seca, febre, dor de cabeça, dispneia e pneumonia, encontrando-se perda do paladar e /ou olfato também sendo alegado. Sendo os sintomas iniciais comuns à de um resfriado comum (AHAMMAD; LIRA, 2020). A transmissão ocorre preferencialmente através de gotículas respiratórias e contato direto entre humanos, tendo um período de incubação geralmente de 14 dias (PANDEY *et al.*, 2020).

Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS, 2020), no dia 21 de julho de 2020, há mais de 14 milhões de casos confirmados e mais 600 mil mortes em decorrência do novo coronavírus no mundo. Os danos econômicos e sociais provocados pelo COVID-19 desencadeou no mundo uma corrida e um grande investimento em estudos para desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz com o objeto de controlar e prevenir a longo prazo o número de mortes e contaminados nos países afetados pelo vírus. Ainda em abril já se relatava a existência de 115 candidatas a vacina estando 73 em fase exploratória ou pré-clínica (THAH LE *et al.*; 2020). Dessa forma, por ainda não haver uma terapia eficaz aprovada direcionada para o Covid-19. Além da busca por uma medida preventiva eficiente ser de interesse mundial. Esse estudo propõe contemplar as principais alternativas viáveis e promissoras na prevenção da Covid-19.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Consiste em uma revisão bibliográfica descritiva exploratória com abordagem qualitativa. A fim de atender os objetivos da produção científica foram realizadas pesquisas nos bancos de dados das bibliotecas eletrônicas: Scopus, ScienceDirect, LILACS, Scielo e Pubmed. Os



descritores abordados para a seleção foram: “COVID-19”, “SARS-CoV-2”, “pathophysiology”, “therapy”, “glicoproteína S” e “Vaccines” (sem restrições de idioma). Os critérios utilizados como inclusão foram estudos clínicos e artigos disponíveis por completo nas bases eletrônicas. Os critérios de exclusão foram capítulo de livros e artigos incompletos. Foram encontrados 83 artigos, dos quais 18 atenderam o propósito desta revisão. Foram utilizados artigos científicos relacionados entre o período de 2020.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O trabalho de Ullrich e Nitshe mostraram que o SARS-CoV-2 é um vírus de RNA de fita simples com envelope positivo, que possui um dos maiores genomas reconhecidos de vírus de RNA, variando entre 26 a 32 k, com no mínimo 14 quadros de leitura abertos. Dos quais o principal campo de leitura codifica duas poliproteínas (pp1a, pp1ab), que são clivadas em 16 proteínas não estruturais pela protease M e protease do tipo papaína.

Processo de infecção e replicação do SARS-CoV-2

Assim como o SARS-CoV, o SARS-CoV-2 utiliza a enzima conservadora de angiotensina II (ACE2), como receptor para entrar na célula. Por via endossômica ou lissômica dependente da proteólise. A proteína S interage com a proteína ACE2 das células hospedeiras, e logo é clivada em dois subtipos: S1 e S2. Dessa forma, ocorre a incorporação do domínio peptídico de fusão (FP) do subtipo S2 à membrana da célula hospedeira, e a incorporação do domínio transmembranar do subtipo S2 ao vírus. Logo após, é formada uma estrutura em gancho hexapolímero a partir do domínio FP-HR1 e os domínios TM-HR2. Facilitando assim a fusão da membrana e o acesso viral à célula hospedeira (HUANG *et al.*, 2020).

Em seguida, depois da fusão da membrana celular, o RNA viral é disperso no citoplasma celular. Logo após, a ORF1a/b é traduzida nas poliproteínas 1a e 1ab (pp1a/pp1ab), que logo são clivadas em 16 NSPs. Formando assim um complexo replicase-transcriptase (RTC) para replicação de RNA genômico. Após o processo de replicação do RNA, as proteínas N, S, E e M são traduzidas e inseridas no retículo endoplasmático. Onde se dirigem ao compartimento intermediário do retículo endoplasmático-Golgi, para formação do vírus maduro. Em seguida, o vírus é levado para periferia celular, onde são liberados para fora da membrana por exocitose (HUANG *et al.*, 2020).

Nesse contexto, devido a glicoproteína S (spike) do SARS-CoV-2 ser exposta à superfície viral e ser responsável pela emersão do vírus as células hospedeiras, se torna um dos principais alvos dos anticorpos neutralizantes (Abs) depois da infecção, bem como alvo principal do seguimento terapêutico e da maioria das vacinas (WALLS *et al.*, 2020).

Vacinas candidatas ao SARS-CoV-2

Segundo levantamento da Organização Mundial de Saúde em 20 de julho de 2020, há 166 candidatos a vacina no mundo, dos quais 24 se encontram em fase clínica. As vacinas (tabela 1) que vão obtendo um papel de destaque são as do tipo DNA, mRNA, vetoriais virais replicantes e não replicantes, vacina autônoma baseada em células dendríticas e inativas contra vírus (ZHU *et al.*, 2020).



Tabela 1 - Vacinas em estágio avançado contra o SARS-CoV-2

Desenvolvedor	Nome	Características	Estágio de desenvolvimento	Referências
Universidade de Oxford e AstraZeneca	ChAdOx1-S	Vacina possuínte de vetor atenuado de adenovírus que é capaz de codificar a proteína spike que desempenha papel fundamental na via de infecção do vírus SARS-CoV-2.	Fase 3	(FOLEGATTI <i>et al.</i> , 2020)
Sinovac Biotech	PiCoVacc	Vacina contendo o vírus inativado purificado. Foi capaz de estimular imunoglobulinas neutralizantes ao SARS-CoV-2.	Fase 3	(GAO <i>et al.</i> , 2020)
Moderna Therapeutics	mRNA-1273	Vacina de mRNA encapsulada em nanopartículas lipídicas composta por quatro lipídios que codifica o antígeno S-2P, que n perfusão (S) de SARS-CoV-2	Fase 3	(JACKSON <i>et al.</i> , 2020)
CanSino Biologics	Ad5-nCoV	Vacina possuínte de adenovírus tipo 5 capaz de expressar respostas imunes específicas análogas a glicoproteína spike.	Fase 2	(ZHU <i>et al.</i> , 2020)
Anhui Zhifei Longcom Biopharma Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences	Proteína recombinante + adjuvante (Dímero RDB-sc).	Vacina de subunidade proteica mais recombinante adjuvante	Fase 2	(DAI <i>et al.</i> , 2020)

Para desenvolver uma vacina eficaz normalmente demora de 12 a 18 meses, porém em períodos pandêmicos como o observado em 2009 quando o vírus influenza A (H1N1)pdm09 acometeu a população global esse tempo foi bastante reduzido, levando apenas 6 meses devido a existência de vacinas anteriormente existentes (KANDIMALLA *et al.*, 2020), no caso do SARS-CoV-2 pode levar vários anos até que haja o desenvolvimento de vacinas devido a inexistência dessas e ao uso de tecnologias nunca empregadas, ou seja, tecnologias bastante recentes, que não foram totalmente testadas quanto à segurança e a produção em larga escala (AMANAT; KRAMMER, 2020).



As vacinas que se encontram em estágio mais avançadas são as ChAdOx1, PiCoVacc e a mRNA-1273 segundo dados da Organização Mundial de Saúde do dia 20 de julho de 2020, estando em teste clínicos de fase 3 (figura 1), por se tratar da primeira vacina a entrar em fase de testes clínicos, a mRNA-1273 da Moderna Therapeutics surgiu como uma das mais promissoras, além de não apresentar resquícios de genoma viral, garantindo segurança, apresentando também elevada potência e ciclos de produção curtos (ZHANG *et al.*, 2020).

Tratamento Atual

Atualmente, o tratamento dos pacientes com a infecção por covid-19, consiste na redução de sinais e sintomas clínicos, além de cuidados de suporte a vida (DHAMA *et al.*, 2020). Medidas incluindo oxigenoterapia, imunoterapia, terapia antiviral, suporte a órgãos são utilizadas na prevenção de complicações no quadro do paciente, como: desconforto respiratório agudo, tempestade de citocinas e infecções secundárias. Normalmente, os pacientes recebem suporte reforçado para permanecer regulada a ingestão calórica necessária e homeostase de água e eletrólitos. Bem como, acompanhamento do aumento da função de coagulação no curso clínico da infecção (HUANG *et al.*, 2020).

4. CONCLUSÃO

O SARS-CoV-2 não tem tratamento específico para a patologia, consistindo apenas no tratamento de seus sinais e sintomas, além do controle de complicações. Impactando diretamente na economia mundial. A busca por uma vacina eficaz se torna atualmente, uma corrida entre as grandes empresas farmacêuticas. Se baseando na literatura observada nos diversos estudos, podemos evidenciar que a rapidez nos resultados no desenvolvimento das vacinas se dá devido ao conhecimento sobre o papel da proteína spike na fisiopatologia do coronavírus e a semelhança com as características de outros vírus da mesma família.

5. REFERÊNCIAS

AHAMMAD, I.; LIRA, S. S. Designing a novel mRNA vaccine against SARS-CoV-2: Na immunoinformatics approach. *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 162, p. 820-837, 2020.

AMANAT, F.; KRAMMER, F. SARS-CoV-2 Vaccines: Status Report. *Immunity.*, v. 52, n. 4, p. 583-589, 2020.

BRASIL. Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde. Folha informativa – COVID-19 (doença causada pelo novo coronavírus), 21 de novembro de 2020. Disponível em: www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=6101:covid19&Itemid=875#datas-notificacoes. Acessado em: 21 de julho de 2020.

DAI, L.; ZHENG, T.; XU, K.; HAN, Y.; XU, L.; HUANG, E.; AN, Y.; CHENG, Y.; LI, S.; LIU, M.; YANG, M.; LI, Y.; CHENG, H.; YUAN, Y.; ZHANG, W.; KE, C.; WONG, G.; QI, J.; QIN, C.; YAN, J.; GAO, G. F. A. Universal Design of Betacoronavirus Vaccines against COVID-19, MERS, and SARS. *Cell.*, 2020. Disponível em: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867420308126?via%3Dihub. Acessado em: 21



de julho de 2020.

DHAMA, K.; SHARUN, K.; TIWARI, R.; DADAR, M.; MALIK, Y. S.; SINGH, K. P.; CHAICUMPA, W. COVID-19, an emerging coronavirus infection: advances and prospects in designing and developing vaccines, immunotherapeutics, and therapeutics. *Hum. Vaccin. Immunother.*, v. 16, n. 6, p. 1232-1238, 2020.

DEB, B.; SHAN, H.; GOEL, S. Current global vaccine and drug efforts against COVID-19: Pros and cons of bypassing animal trials. *J. Biosci.*, v. 45, n. 82, 2020.

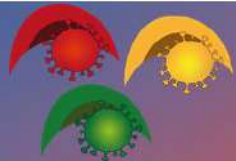
FOLEGATTI, P. M.; EWER, K. J.; ALEY, P. K.; ANGUS, B.; BECKER, S.; BELIJRAMMERSTORFER, S.; BELLAMY, D.; BIBI, S.; BITTAYE, M.; CLUTTERBUCK, E.; DOLD, C.; FAUST, S. N.; FINN, A.; FLAXMAN, A. L.; HALLIS, B.; HEATH, P.; JENKIN, D.; LAZARUS, R.; MAKINSON, R.; MINASSIAN, A. M.; POLLOCK, K. M.; RAMASAMY, M.; ROBINSON, H.; SNAPE, M.; TARRANT, R.; VOYSEY, M.; GREEN, C.; DOUGLAS, A. D.; HILL, A. V. S.; LAMBE, T.; GILBERT, S. C.; POLLARD, A. J. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *The lancet*, 2020. Disponível em: [www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(20\)31604-4/fulltext](http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(20)31604-4/fulltext). Acessado em: 21 de julho de 2020.

GAO, Q.; BAO, L.; MAO, H.; WANG, L.; XU, K.; YANG, M.; LI, Y.; ZHU, L.; WANG, N.; LV, Z.; GAO, H.; GE, X.; KAN, B.; HU, Y.; LIU, J.; CAI, F.; JIANG, D.; YIN, Y.; QIN, C.; LI, J.; GONG, X.; LOU, X.; SHI, W.; WU, D.; ZHANG, H.; ZHU, L.; DENG, W.; LI, Y.; LU, J.; LI, C.; WANG, X.; YIN, W.; ZHANG, Y.; QIN, C. Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. *Science.*, v. 369, n. 6499, p. 77-81, 2020.

HUANG, B.; LING, R.; CHENG, Y.; WEN, J.; DAI, Y.; HUANG, W.; ZHANG, S.; LU, X.; LUO, Y.; JIANG, Y. Z. Characteristics of the Coronavirus Disease 2019 and related Therapeutic Options. *Mol Ther Methods Clin Dev.*, v. 18, p. 367-375, 2020.

ISMAIL, S.; AHMAD, SAJJAD.; AZAM, Immunoinformatics characterization of SARS-CoV-2 spike glycoprotein for prioritization of epitope based multivalent peptide vaccine. *J. Mol. Liq.*, v. 314, a. 113612, 2020.

JACKSON, L. A.; ANDERSON, E. J.; ROUPHAEL, N. G.; ROBERTS, P. C.; MAKHENE, M.; COLER, R. N.; MCCULLOUGH, M. P.; CHAPPELL, J. D.; DENISON, M. R.; STEVENS, L. J.; PRUIJSSERS, A. J.; MCDERMOTT, A.; FLACH An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 - Preliminary Report. *N. Engl. J. Med.*, 2020. Disponível em: www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2022483?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed. Acessado em: 21 de julho de 2020.



KANDIMALLA, R.; JOHN, A.; ABBURI, C.; VALLAMKONDU, J.; REDDY, P. H. Current Status of Multiple Drug Molecules, and Vaccines: An Update in SARS-CoV-2 Therapeutics. *Mol. Neurobiol.*, p. 1-11, 2020.

PANDEY, S. C.; PANDE, V.; SATI, D.; UPRETI, S.; SAMMART, M. Vaccination strategies to combat novel corona virus SARS-CoV-2. *Life Sci.*, v. 256, a. 117956, 2020.

THAH LE, T.; ANDREADAKIS, Z.; KUMAR, A.; GÓMEZ ROMÁN, R.; TOLLEFSEN.; SAVILLE, M.; MAYHEW, S. The COVID-19 vaccine development landscape. *Nat. Ver. Drug. Discov.*, v. 19, n. 5, p. 305-306, 2020.

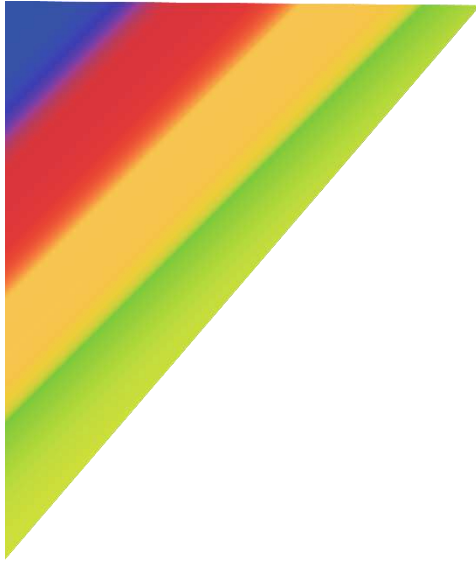
ULLRICH, S.; NITSCHKE, C.; The SARS-CoV-2 main protease as drug target. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 30, n. 17, 2020.

WALLS, A.C.; PARK, Y. J.; TORTORICI, M. A.; WALL, A.; MCGUIRE, A. T.; VEESLER, D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell.*, v. 181, n. 2, p. 281-292, 2020.

WHO. DRAFT landscape of COVID-19 candidate vaccines – 20 July 2020., 2020. Disponível em: www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines. Acessado em: 20 de julho de 2020.

ZHANG, J.; XIE, B.; HASHIMOTO, K. Current status of potential therapeutic candidates for the COVID-19 crisis. *Brain Behav Immun.*, v. 87, p. 59-73, 2020.

ZHU, F. C.; GUAN., X. H.; LI, Y. H.; HUANG, J. Y.; JIANG, T.; HOU, L.H.; LI, J. X.; YANG, B. F.; WANG, L.; WANG, W. J. WU, S. P.; WANG, Z.; WU, X. H.; XU, J. J.; ZHANG, Z.; JIA, S. Y.; WANG, B. S. HU, Y.; LIU, J. J.; ZHANG, J.; QIAN, X. A.; LI, Q.; PAN, H. X.; JIANG, H. D.; DENG, P.; GOU, J. B.; WANG, X. W.; WANG, X. H.; CHEN, W. Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *The lancet.*, 2020. Disponível em: [www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(20\)31605-6/fulltext](http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(20)31605-6/fulltext). Acessado em: 20 de julho de 2020.



VIGILÂNCIA E EPIDEMIOLOGIA EM SAÚDE



ÁREA DE SUBMISSÃO: Vigilância e Epidemiologia em Saúde

ISOLAMENTO SOCIAL E A VIOLÊNCIA DOMÉSTICA: FICAR EM CASA É MAIS (IN)SEGURO? UMA REVISÃO DA LITERATURA CIENTÍFICA E PUBLICAÇÕES DA IMPRENSA NO CENÁRIO MUNDIAL

M. E. A. L. CAMPOS¹, M. C. DANTAS¹ e F. E. C. V. FERNANDES¹

¹ Universidade de Pernambuco – UPE, *Campus Petrolina* (PE), Colegiado de Enfermagem.
E-mail para contato: elda.campos@upe.br

RESUMO – *O isolamento social apresenta-se como uma das alternativas necessárias para o controle da COVID-19. Porém, essa medida cria um contexto oportuno para a prática da violência doméstica (VD). O objetivo foi analisar estudos da literatura científica e publicações da imprensa que correlacionam o aumento da violência contra a mulher ao isolamento social. Realizou-se revisão integrativa da literatura e das publicações da imprensa/mídia eletrônica. A base de dados utilizada foi a PubMed Central, além de busca realizada no Google para obter dados da imprensa. Após análise do título e resumos, 11 artigos da PubMed foram eleitos para construir a base de análise. No Google realizou-se pesquisas com os descritores em inglês e português, sendo escolhidas 6 publicações da imprensa brasileira e 4 da internacional. Todos os textos utilizados neste estudo foram publicados em 2020. Os principais resultados da análise evidenciaram que houve aumento da VD durante o período da pandemia; os agressores possuem um controle maior das vítimas no isolamento social e a imprensa tem exercido um papel importante no combate a VD. Portanto, além do impacto causado pela pandemia, convivemos com o agravamento da VD. A agressão contra a mulher é um sério problema de saúde pública, necessitando aprimoramento contínuo das políticas e intervenções do poder público e de setores afins, assim como o empenho de toda sociedade no combate e no enfrentamento a esse agravo social de tamanha relevância.*

Palavras-chave – Agressão; Coronavírus; Emergência; Pandemia; Mitigação.

ABSTRACT – *Social isolation presents itself as one of the applicable alternatives for controlling COVID-19. However, this measure creates an opportune context for the practice of domestic violence (DV). The objective was to analyze studies of scientific literature and press publications that correlate or increase violence against woman to social isolation. An integrative review of literature and press/electronic media publications was performed. The database used was PubMed Central, in addition to a search on Google to obtain data from the press. After analyzing the title and abstracts, 11 articles from PubMed were elected to build an analysis base. At Google, searches were with descriptors in English and Portuguese, with 6 publications from the Brazilian press and*



4 from the international press. All texts used in this study were published in 2020. The main results of the analysis showed that there was an increase in the DV during the pandemic period; aggressors have greater control over social isolation and the press plays an important role in combating DV. Therefore, in addition to the impact caused by the pandemic, there is a worsening of the DV. Aggression against woman is a serious public health problem, which requires continuous improvement of the policies and interventions by public authorities and related sectors, as well as the commitment of the whole society to combat and confront this social issue of such relevance.

Keywords – Aggression, coronavirus, emergency, pandemic, mitigation.

1. INTRODUÇÃO

A emergência internacional relacionada à COVID-19 declarada em 30 de janeiro de 2020, tem sido marcada por números alarmantes de infectados e mortos pelo novo coronavírus (SARS-CoV-2) no mundo, desse modo, em 11 de março, a Organização Mundial da Saúde decretou que a situação sanitária configura-se como uma pandemia.

Assim, visto a necessidade de minimizar o número de pessoas infectadas e nivelar a demanda por leitos hospitalares, foram implementadas uma combinação de ações de contenção e mitigação contra a propagação do vírus, na tentativa de proteger, principalmente, os mais vulneráveis à infecção e a doença (BEDFORD *et al.*, 2020). Nesse cenário, o isolamento social apresentou-se como uma das alternativas mais efetivas para o controle da COVID-19.

Essa medida é essencial para achatar a curva de novos casos, reduzindo o surgimento de quadros graves da doença, possíveis óbitos e o colapso no sistema de saúde do país (COSTA *et al.*, 2020). Porém, essas restrições nos deslocamentos têm perturbado a rotina das pessoas, inserindo novos focos de tensionamento e estresse (MELO *et al.*, 2020).

O isolamento social implica a necessidade de permanecer longos períodos dentro de casa em contato constante com os familiares, um contexto oportuno para a prática da violência doméstica. Assim, ao mesmo tempo que as mulheres tentam se proteger da infecção pela COVID-19, tornam-se expostas ao risco de sofrerem violências dentro de seu próprio lar.

De acordo com o artigo 5º da Lei Maria da Penha (Lei nº 11.340, de 7 de agosto de 2006), violência doméstica e familiar contra a mulher é "qualquer ação ou omissão baseada no gênero que lhe cause morte, lesão, sofrimento físico, sexual ou psicológico e dano moral ou patrimonial". No mundo, estima-se que um terço das mulheres irá sofrer violência física e/ou sexual em algum período da vida, sendo que a cometida pelo parceiro íntimo é o tipo mais comum (MELO *et al.*, 2020).

Durante o isolamento, as mulheres tendem a ser mais vigiadas e impedidas de conversar com outras pessoas, oportunizando a manipulação psicológica, o controle das finanças domésticas, que costuma ser dominado pela mulher, também é alterado devido à presença mais próxima do homem em casa, bem como, a visão de perda de poder masculino que atinge a figura do homem provedor, culminam no desenvolvimento de comportamentos violentos (VIEIRA *et al.*, 2020).

A violência doméstica não é apenas uma realidade atual, visto que a cultura machista e a estrutura patriarcal sob a qual a sociedade brasileira está arraigada implica na subjugação do feminino, e conseqüentemente, é um dos principais fatores que corroboram à perpetuação da violência contra as mulheres (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

É válido ressaltar que a mulher possui dificuldade para sair de relacionamentos abusivos, em



virtude do desequilíbrio de poder, pois a mulher, com o tempo da relação, torna-se cada vez menos capaz de viver e ser independente sem o apoio do companheiro, em sentidos físico, financeiro e psicológico. Além disso, há a intermitência do abuso, em que as alternâncias entre os momentos calmos e amorosos e os de abuso, geram a esperança na mulher de que o homem possa mudar seu comportamento abusivo/violento (MARQUES *et al.*, 2019).

Nesse sentido, se destaca a importância da intervenção externa nas situações de violência, porém, o isolamento social também tem dificultado essas ações, tanto por parte dos familiares, amigos, vizinhos, como também o acesso ao suporte social e recursos de serviço social normalmente disponíveis (PIQUERO *et al.*, 2020).

O isolamento social acarreta, de maneira exacerbada, alguns indicadores preocupantes em relação a violência doméstica e familiar contra a mulher (CARE; INTERNATIONAL RESCUE COMMITTEE, 2020). Dessa forma, considerando a necessidade da prática do isolamento social e a importância da discussão sobre a realidade da violência doméstica, principalmente, nesse momento, o presente estudo tem o objetivo de analisar estudos da literatura científica e publicações da imprensa que correlacionam o aumento da violência contra a mulher ao isolamento social.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Realizou-se uma revisão integrativa da literatura e das publicações da imprensa/mídia eletrônica com abordagem voltada à temática da violência doméstica e isolamento social. As informações pertinentes a sua construção foram obtidas a partir da base de dados eletrônica da PubMed Central (PMC) assim como informações da imprensa/mídia que foi realizada por meio de buscas no Google usando as palavras “Isolamento social, violência doméstica e COVID-19” usando as grafias em português e em inglês. A busca na base de dados da PubMed utilizou-se os mesmos descritores em inglês: social isolation; domestic violence e COVID-19.

Para a escolha das publicações sobre o assunto não foi estabelecido um período como critério, uma vez que a temática surgiu recentemente. Nesse sentido, o não estabelecimento de limite de tempo possibilitou obter uma quantidade maior de trabalhos relacionados ao objeto do estudo e assim poder proporcionar uma abrangência em torno do tema. Também considerou-se o número reduzido de publicações brasileiras nas bases de dados enfatizando o tema de interesse nesse estudo.

Na estratégia de busca na literatura científica foi selecionado o filtro de estudos com acesso livre. O processo de busca na base de dados da PubMed resultou em 237 textos referentes aos descritores, após leitura do título e resumos dos artigos, foram excluídos aqueles que não faziam alusão e/ou relação com os descritores da busca. Desse modo, 11 artigos foram eleitos para constituir a base de análise deste estudo.

A busca realizada no Google apresentou 4.720.000 resultados utilizando os descritores em português e 44.000.000 ao colocá-los em inglês, dessa maneira, foram observadas as cinco páginas iniciais dos resultados, de forma que após leitura dos títulos e conteúdo foram selecionadas 6 publicações da imprensa brasileira e 4 da imprensa internacional.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados evidenciaram que todos os artigos da literatura científica referentes à temática estudada, foram publicados no ano de 2020, entre abril e junho, com uma concentração de 45% de publicações no mês de maio. Em relação ao número de autores, observa-se que a maior parte das



pesquisas (45%) foi escrita por até 2 autores. Ademais, quanto ao conteúdo, 6 artigos abordaram a relação do aumento da violência doméstica na pandemia; 2 apresentaram dados quantitativos sobre o aumento da violência doméstica durante o isolamento social nos EUA; 1 relatou sobre os riscos à saúde da mulher na pandemia, incluindo a violência doméstica; 1 apresentou a vulnerabilidade das mulheres que vivem com HIV durante a pandemia; e 1 discorreu sobre o papel da psiquiatria frente a violência doméstica na pandemia.

Quanto às publicações da imprensa brasileira selecionadas para composição do presente estudo, a metade (3) não possuía o nome dos autores, apenas o nome das organizações, 2 matérias foram escritas por 1 autor e 1 trabalho realizado por 2 autores. Ademais, 50% das matérias brasileiras foram escritas no mês de maio. Em relação às publicações da imprensa internacional, todas foram escritas por apenas 1 autor, de forma que 2 matérias foram publicadas em abril e 2 no mês de maio. Quanto ao conteúdo das publicações, 5 apresentaram dados quantitativos e qualitativos acerca do aumento da violência doméstica no Brasil e no mundo, em tempos de pandemia; 3 publicaram informações sobre a violência doméstica, formas de ajudar as vítimas ou medidas de enfrentamento implementadas; 1 abordou o abuso de álcool e a violência doméstica durante a pandemia; e 1 apresentou relatos de vítimas da violência doméstica.

A medida imposta do isolamento social para o controle da disseminação do novo coronavírus causou a intensificação de consequências negativas não intencionais, como a violência doméstica (VIVEIROS; BONOMI, 2020), isso é explicado por um tensionamento maior de relacionamentos estressantes através de um isolamento ainda mais restritivo da vítima com o agressor (MOREIRA; DA COSTA, 2020).

Em outros termos, a violência doméstica e as relações abusivas já são uma realidade na sociedade, e o isolamento social surge com potencial de agravar consideravelmente essa situação. Nessa lógica, Hall e Joseph (2020) caracteriza o cenário atual como uma sindemia de violência doméstica e COVID-19.

Em Dallas, Texas (EUA), os resultados de uma análise de séries temporais apontaram aumento da violência doméstica nas primeiras duas semanas após a implementação de isolamento social, porém depois os números diminuíram. Ressalta-se que antes do distanciamento já havia uma tendência crescente de violência doméstica, visto que muitas pessoas mesmo sem a obrigatoriedade de permanecer em isolamento social reduziram as saídas de casa (PIQUERO *et al.*, 2020). Em outro estudo realizado nos EUA, utilizando dados dos departamentos de polícia, identificou aumento percentual nos casos de violência doméstica (incluindo violência por parceiro íntimo, abuso de idosos e infantil) em Jefferson (Alabama), Portland (Oregon), San Antonio (Texas) e New York City (BOSERUP *et al.*, 2020).

Os estudos que apontam a correlação direta do aumento da violência doméstica com o isolamento ainda são limitados, porém trazem à luz uma discussão necessária e pontos que reforçam a relação positiva dessa associação. Piquero *et al.* (2020) aponta a existência da teoria das atividades rotineiras que prevê o aumento da violência doméstica durante os bloqueios, visto que as três condições especificadas pela teoria se mostram presentes no período de isolamento: um agressor motivado, um alvo adequado e a ausência de um tutor.

Além disso, estudos citam outras epidemias e surtos, como a do vírus Ebola, que causaram o aumento da violência doméstica, para afirmar que esse fato também pode ocorrer durante a pandemia da COVID-19 (CHANDAN *et al.*, 2020; CLOSSON *et al.*, 2020), essas informações reforçam a probabilidade de crescimento no fenômeno aqui estudado.

Porém, uma perspectiva importante de ser considerada é que muitos casos nunca chegarão a



ser descobertos e/ou denunciados, Kaukinen (2020) aponta a subnotificação destes crimes à polícia, a subutilização de serviço social e o desafio de coletar dados de autorrelato das vítimas durante a pandemia. Dessa forma, a violência continua sendo sofrida em silêncio, e consequentemente possui dados subestimados, dificultando tomadas de decisão contextualizadas.

Com a ordem de permanência em casa, os agressores podem estar mais aptos a exercer controle diário nas tomadas de decisões, bem como, monitorar e isolar socialmente a vítima de sua família e amigos, outro ponto, é que o agressor pode tentar controlar a vítima ao ameaçar a exposição dos filhos a doença (KAUKINEN, 2020). Uma matéria do The New York Times (2020) destaca que os governos falharam amplamente na preparação e implementação das novas medidas de saúde pública, gerando oportunidades para que os agressores ataquem suas vítimas.

Sabe-se que a pandemia foi um fenômeno inesperado e que as medidas de controle do vírus surgiram de acordo com o avançar dos casos, porém a violência doméstica é um fato constante que, apesar da sua complexidade, precisaria de alternativas que não deixassem as mulheres expostas aos agressores, visto que a elevação de casos dessa violência poderia ser algo previsto.

Considerando que a prevenção e combate à violência doméstica deve ter um caráter intersetorial, foram observados nas publicações da imprensa a divulgação de medidas de suporte que têm sido implementadas nesse período, como, a criação de grupos em redes sociais para receber pedidos de socorro e oferecer ajuda às vítimas, a campanha do X vermelho na palma da mão sinalizando uma situação de violência, a existência de um botão de pânico em aplicativos de lojas de eletrodomésticos online, um vídeo fake de automaquiagem que repassa orientações de como fazer denúncias e campanhas de conscientização com chamadas especiais durante a programação da televisão (CHIARA, 2020; MODELLI, 2020; NAÇÕES UNIDAS BRASIL, 2020).

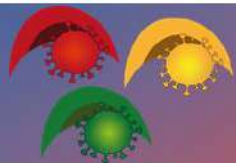
Foi interessante observar que ao final de algumas matérias midiáticas são apontadas formas de denúncia e suporte para as vítimas (BAKER-TINGEY, 2020; GOVERNO DE SANTA CATARINA, 2020; HOLMES, 2020), demonstrando que a imprensa vai além de noticiar os eventos e exerce um papel ativo no combate a violência doméstica.

Diferente da maioria dos estudos científicos que abordou a temática, as publicações da imprensa apresentam uma variedade de dados e de reportagens relatando o aumento da violência doméstica na atual pandemia, visto que o rigor metodológico para publicação em sites da imprensa é mais simplificado do que em plataformas científicas. No Brasil, há informações jornalísticas que mostram o crescimento de 40% nas denúncias de violência doméstica realizadas ao 180 (Central de Atendimento à Mulher) e de 22% nos feminicídios durante o isolamento, segundo o Fórum Brasileiro de Segurança Pública (CHIARA, 2020).

Em outros países da América Latina, como a Argentina, foram registradas uma média de 1 feminicídio a cada 32 horas após o decreto de quarentena obrigatória. No Peru, as chamadas para denunciar um ato de violência familiar duplicaram durante o primeiro mês de isolamento social (BITTENCOURT; SILVA, 2020).

Informações parecidas se repetem pelo mundo, na Espanha, nas duas primeiras semanas de bloqueio, o número de emergência para violência doméstica recebeu 18% mais ligações do que no mesmo período do mês anterior, a França registrou um aumento nacional de 30% de casos de violência doméstica e a Grã-Bretanha indicou 20% de aumento nos relatórios de violência doméstica após uma semana de bloqueio (TAUB, 2020).

O isolamento se associa ao fechamento de estabelecimentos não-essenciais, como bares, nesse sentido, a tendência é que as pessoas consumam álcool dentro de suas casas, o estudo de



Gulati e Kelli (2020) analisa a relação de pessoas com transtornos mentais como autores da violência, com ênfase àqueles que fazem uso de álcool e/ou drogas, sendo esse um fator de risco para a violência doméstica. O aumento do consumo de álcool relacionado a violência doméstica foi evidenciado em publicações da imprensa brasileira, apontando que a substância pode promover impulsos agressivos, bem como a perda de controle sobre o comportamento (GOVERNO DE SANTA CATARINA, 2020; CISA, 2020).

Logo, a ingestão alcoólica deveria ter sido considerada antes da implementação do isolamento, pois o período constante em casa, e muitas vezes, livre de outras tarefas, a facilidade de solicitar delivery de bebidas, somado ao fato de que os serviços de apoio aos viciados em álcool possivelmente foram fechados durante a pandemia, proporcionam condições favoráveis ao consumo.

Além disso, outra questão que merece destaque ao tratar da violência doméstica é que mulheres pertencentes a populações minorizadas tendem a ter um risco ainda maior em ser vítimas da violência (VIVEIROS; BONOMI, 2020). A revista internacional Policy Options afirma que as mulheres que enfrentam isolamento social sem acesso a redes de apoio, incluindo as indígenas, racializadas, imigrantes, transsexuais e mulheres vivendo com deficiência, sempre foram as mais vulneráveis à violência. Closson *et al.* (2020), nessa perspectiva, chama atenção também às mulheres que vivem com HIV, que podem estar em risco particularmente alto de serem vítimas.

Portanto, ser mulher se configura como um fator de risco à violência, e aquelas de maior vulnerabilidade necessitam de medidas específicas para o combate efetivo à violência doméstica.

4. CONCLUSÃO

Nesse contexto pode-se entender que a literatura científica e as publicações midiáticas fundamentaram a compreensão do problema elencado neste estudo.

Entende-se, nesse momento, que o isolamento social torna-se imprescindível e/ou justificável para a contenção da disseminação do vírus no país, dessa forma, visando minimizar os impactos na morbimortalidade concernentes à doença e conseqüentemente a superação das graves conseqüências sanitárias decorrentes, com sérios desdobramentos nas esferas econômicas e sociais.

No cenário atual, além do impacto causado pela pandemia, convivemos com o agravamento de outro fenômeno de grande magnitude e de natureza complexa, que é a violência doméstica e familiar, que se potencializa, também, pela necessidade imperativa em função do momento epidemiológico, circunstancial imposto, pelo isolamento social, como medida protetiva, buscando evitar a proliferação do vírus, no tão propagado “ficar em casa”.

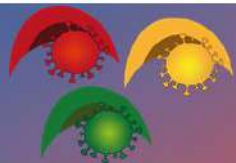
A naturalização da violência cotidiana, especialmente a invisibilidade da violência simbólica sofrida, tem raízes pautadas em uma sociedade patriarcal e androcêntrica. A agressão praticada contra a mulher torna-se um sério problema de saúde pública, necessitando de aprimoramento contínuo das políticas e intervenções do poder público e de setores afins, assim como o empenho de toda sociedade no combate e no enfrentamento a esse agravo social de tamanha relevância.

5. REFERÊNCIAS

BAKER-TINGEY, J. COVID-19 contributing to domestic violence: what to do. *Nevada Today*, 23 de abril de 2020. Disponível em: <<https://www.unr.edu/nevada-today/news/2020/covid-and->



- domestic-violence>. Acesso em: 21 jul 2020.
- BEDFORD, J. COVID-19: towards controlling of a pandemic. *The Lancet*. vol. 395, mar 2020.
- BITTENCOURT, D.; SILVA, R. L. A violência contra a mulher e a política de isolamento social: a perspectiva de gênero da pandemia do COVID-19. *Migalhas*, 30 de abril de 2020. Disponível em: <<https://www.migalhas.com.br/depeso/325886/a-violencia-contra-a-mulher-e-a-politica-de-isolamento-social-a-perspectiva-de-genero-da-pandemia-do-covid-19>>. Acesso em: 20 jul 2020.
- BOSERUP, B. *et al.* Alarming trends in US domestic violence during the COVID-19 pandemic. *The Amer. J. Emerg. Med.*, S0735-6757(20)30307-7. 28 Apr. 2020.
- BRASIL. Lei Maria da Penha. Lei n. 11.340/2006. Coíbe a violência doméstica e familiar contra a mulher. *Presidência da República*, 2006.
- CARE; INTERNATIONAL RESCUE COMMITTEE. Global Rapid Gender Analysis for Covid-19 [Internet]. *Care International/International Rescue Committee*. Suíça, 2020.
- CHIARA, M. Violência contra a mulher aumenta em meio à pandemia; denúncias ao 180 sobem 40%. *Estadão*, 01 de junho de 2020. Disponível em: <<https://brasil.estadao.com.br/noticias/geral,violencia-contra-a-mulher-aumenta-em-meio-a-pandemia-denuncias-ao-180-sobem-40,70003320872>>. Acesso em: 20 jul 2020.
- CHANDAN, J. S. *et al.* COVID-19: a public health approach to manage domestic violence is needed. *The Lanc. Public. Heal.* vol. 5, n.6, ed. 309, jun 2020.
- CISA. Abuso de álcool e violência doméstica em tempos de pandemia. *Centro de Informações sobre Saúde e Álcool*, 30 de abril de 2020. Disponível em: <<https://cisa.org.br/index.php/sua-saude/informativos/artigo/item/222-abuso-de-alcool-e-violencia-domestica-pandemia>>. Acesso em: 21 jul 2020.
- CLOSSON, K. *et al.* When Home is Not a Safe Place: Impacts of Social Distancing Directives on Women Living with HIV. *AIDS and Beh.*, n. 0123456789, p. 1–3, 2020.
- COSTA, J. A. *et al.* Implicações Cardiovasculares em Pacientes Infectados com Covid-19 e a Importância do Isolamento Social para Reduzir a Disseminação da Doença. *Arq. Bras. Cardiol.*, São Paulo, v. 114, n. 5, p. 834-838, May 2020.
- GOVERNO DE SANTA CATARINA. Coronavírus em SC: Saúde divulga medidas de enfrentamento à violência doméstica. *Governo de Santa Catarina*, 28 de maio de 2020. Disponível em: <<https://www.sc.gov.br/noticias/temas/coronavirus/coronavirus-em-sc-saude-divulga-medidas-de-enfrentamento-a-violencia-domestica>>. Acesso em: 21 jul 2020.
- GULATI, G.; BRENDAN D. K. Domestic violence against women and the COVID-19 pandemic: What is the role of psychiatry?. *Intern. J. Law Psych.* vol. 71, 2020.
- HALL, B. J.; JOSEPH D. T. Surviving in place: The coronavirus domestic violence syndemic.” *Asian J. Psych.*, vol. 53. Maio 2020, doi:10.1016/j.ajp.2020.102179
- HOLMES, A. Social isolation in COVID: fears for silent victims of family violence in Tasmania. *The Examiner*, 26 de maio de 2020. Disponível em: <<https://www.examiner.com.au/story/6768511/social-isolation-fears-for-silent-victims-of-family-violence/>>. Acesso em: 21 jul 2020.
- ILLESINGHE, V. The connection between social isolation, entrapment and domestic violence were apparent long before the pandemic. *Policy Options*, 28 de maio de 2020. Disponível em:<<https://policyoptions.irpp.org/magazines/may-2020/pandemic-exposes-existing-link-between-isolation-and-domestic-violence/>>. Acesso em: 21 jul 2020.
- KAUKINEN, C. When Stay-at-Home Orders Leave Victims Unsafe at Home: Exploring the Risk and Consequences of Intimate Partner Violence during the COVID-19 Pandemic. *Amer. J. Crim. Just.*, p. 1–12, Jun 2020.



- MARQUES, B. O. M *et al.* Lei Maria da Penha: uma análise crítica à luz da criminologia feminista. *Deb. Saúde*, Rio de Janeiro, v. 43, n. spe4, p. 140-153, 2019.
- MELO, B. D. *et al.* (org). Saúde mental e atenção psicossocial na pandemia COVID-19: violência doméstica e familiar na COVID-19. Rio de Janeiro: *Fiocruz*, 2020. Cartilha. 22 p.
- MODELLI, L. Violência física e sexual contra mulheres aumenta durante isolamento social provocado pelo coronavírus. *G1*, 19 de abril de 2020. Disponível em: <<https://g1.globo.com/bemestar/coronavirus/noticia/2020/04/19/violencia-fisica-e-sexual-contra-mulheres-aumenta-durante-isolamento-social-provocado-pelo-coronavirus.ghtml>>. Acesso em: 20 jul 2020.
- MOREIRA, D. N.; DA COSTA, M. P. The impact of the Covid-19 pandemic in the precipitation of intimate partner violence. *Intern. J. Law Psych.*, p. 101606, 2020.
- NAÇÕES UNIDAS BRASIL. Campanha de Globo, GNT e ONU Mulheres alerta sobre violência doméstica no isolamento social. *Nações Unidas Brasil*, 04 de maio de 2020. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/campanha-de-globo-gnt-e-onu-mulheres-alerta-sobre-violencia-domestica-no-isolamento-social/>>. Acesso em: 21 jul 2020.
- OLIVEIRA, R. C.; GOMES, R. F.; VERAS, W. S. “ELE DISSE QUE ME MATARIA...”: CULTURA MACHISTA, VIOLÊNCIA DOMÉSTICA E IMPUNIDADE. *Rev. Seç. Jud. RJ*, [S.l.], v. 22, n. 44, p. 131-144, maio 2019.
- PIQUERO, A. R. *et al.* Staying Home, Staying Safe? A Short-Term Analysis of COVID-19 on Dallas Domestic Violence. *Amer. J. Crim. Just.*, p. 1-35, jun 2020.
- TAUB, A. A New Covid-19 Crisis: Domestic Abuse Rises Worldwide. *The New York Times*, 6 de abril de 2020. Disponível em: <<https://www.nytimes.com/2020/04/06/world/coronavirus-domestic-violence.html>>. Acesso em: 20 jun 2020.
- VIEIRA, P. R. *et al.* Isolamento social e o aumento da violência doméstica: o que isso nos revela?. *Rev. bras. epidemiol.*, Rio de Janeiro, v. 23, e200033, 2020.
- VIVEIROS, N.; BONOMI, A. E. Novel Coronavirus (COVID-19): Violence, Reproductive Rights and Related Health Risks for Women, Opportunities for Practice Innovation. *J. Fam. Viol.*, 2020.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO Virtual press conference on COVID-19. *WHO*. Genebra: 2020.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Vigilância e Epidemiologia em Saúde

ALTERAÇÕES PSIQUIÁTRICAS CAUSADAS PELA COVID-19: UMA REVISÃO INTEGRATIVA.

M. A. B. N.C. LIMA¹, M. M. ROSA²

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas;

² Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica.

E-mail para contato: mateus.costa0011@gmail.com

RESUMO – A pandemia causada pelo vírus SARS-CoV-2, popularmente conhecido como Coronavírus e pertencente à família Coronaviridae, trouxe uma série de interrogações à comunidade científica, uma vez que mesmo conhecendo a etiologia e progressão patológica de infecções causadas por outros gêneros pertencentes a mesma família (SARV-CoV-1 e MERS), a fisiopatologia no nCov-19 era totalmente desconhecida. Mesmo nos dias atuais ainda se sabe pouco sobre o processo patológico causado por esta virose. Diante desta situação de obscuridade, a comunidade científica mais do que nunca se empenhou integradamente a fim de disseminar o maior número de informações em períodos de tempo o mais breve possível buscando oferecer subsídio aos profissionais, para que estes pudessem tratar adequadamente cada paciente acometido pela COVID-19. Assim, estudos começaram a ser publicados diariamente com diversas informações sobre a fisiopatogenia desta infecção e melhor nortear condutas terapêuticas adequadas frente ao prognóstico e evolução do paciente acometido. Os presentes estudos, voltados pra os aspectos clínicos e as respectivas consequências da doença, evidenciaram dentre tantas consequências causadas pelo vírus, as alterações psiconeurológicas, incluindo as alterações psiquiátricas, até recentemente pouco discutidas.

Objetivos: *O presente estudo buscar sumarizar dados importantes de estudos com o intuito de elucidar os impactos psiquiátricos causados pela COVID-19 e quais as principais consequências desses impactos para o paciente durante e após o tratamento da infecção.*

Materiais e Métodos: *Levantamento dos estudos por meio de bases de dados científicas (PUBMED, LILACS, MEDLINE, ELSEVIER, SCIELO), bem como definição e aplicação dos critérios de inclusão e exclusão dos estudos selecionados nas bases de dados supracitadas.*

Resultados e Discussão: *As extrações das informações da literatura mostram que a infecção pela COVID-19 e suas consequências sociais, induzem uma ampla cascata inflamatória, corroborando significativamente para o desenvolvimento de alterações psiquiátricas e neurológicas.*

Conclusão: *Os fatores pertinentes a alterações psiquiátricas em pacientes acometidos pela COVID-19 induzem uma nova linha de alterações neuroquímicas produzidas pela doença, que*



merecem maior atenção científica. Um outro ponto a destacar, é a necessidade de um acompanhamento crônico para os pacientes infectados pela doença, uma vez que possam estar mais susceptíveis ao desenvolvimento de alterações psico e neurológicas.

Palavras-chave: *Infecção por Coronavírus, Transtornos psiquiátricos, Psico-neuroendocrinologia.*

ABSTRACT - *The pandemic caused by the SARS-CoV-2 virus, popularly known as Coronavirus and belonging to the Coronaviridae family, brings a series of questions to the scientific community, since even knowing the etiology and pathological progression of infections caused by other genera belonging to same family (SARV-CoV-1 and MERS), the pathophysiology in nCov-19 was totally unknown and until today little is known about the pathological process caused by this virus. Faced with this situation of obscurity, the scientific community has more than ever engaged in an integrated effort to disseminate the largest amount of information in periods of time as soon as possible, seeking to offer support to professionals, so that they could adequately treat each patient affected by COVID -19. Studies started to be published daily with various information on the pathophysiology of this infection and then it can be understood and guided by the appropriate therapeutic approaches in view of the prognosis and evolution of the affected patient. The present study, focused on the clinical aspects and the respective consequences of the disease, showed among many consequences caused by the virus, psychoneurological changes, including psychiatric changes until recently little discussed.*

Objectives: *The present study seeks to summarize important data from studies in order to elucidate the psychiatric impacts caused by COVID-19 and what are the main consequences of these impacts for the patient during and after the treatment of the infection.*

Materials and Methods: *Survey of studies through scientific databases (PUBMED, LILACS, MEDLINE, ELSEVIER, SCIELO), as well as definition and application of inclusion and exclusion criteria for selected studies in the aforementioned databases.*

Results and Discussion: *Extractions of information from the literature show that the infection by COVID-19 and its social consequences induce a wide inflammatory cascade, corroborating significantly for the development of psychiatric and neurological changes.*

Conclusion: *The factors pertinent to psychiatric changes in patients affected by COVID-19 induce a new line of neurochemical changes produced by the disease, which deserve greater scientific attention. Another point to highlight is the need for chronic monitoring for patients infected with the disease, since they may be more susceptible to the development of psycho and neurological changes.*

Keywords: *Coronavirus infection, Psychiatric disorders, Psycho-neuroendocrinology.*

1. INTRODUÇÃO

Os coronavírus (CoVs) são um grupo de vírus pertencente à família *Coronaviridae*, capazes de desencadear infecções respiratórias e do trato gastrointestinal. Até antes do surgimento do SARS-CoV-2, era de conhecimento dos cientistas a existência de 4 tipos de coronavírus, os quais eram capazes de desencadear infecções respiratórias, incluindo a síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV), mas também a síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) ambos



responsáveis por pandemias anteriores nos anos de 2003 e 2012 respectivamente (Brito e Silva, 2020).

Contudo, em dezembro do ano de 2019, uma infecção respiratória iniciada na China chamou a atenção do mundo, pois logo transformou-se em uma pandemia causada por um novo e desconhecido tipo de coronavírus (SARS-CoV-2). Um vírus de alta transmissibilidade e morbidade, o qual não há terapêutica específica disponível para combatê-lo (Dubbioso *et al.* 2020).

A fisiopatologia do vírus se dar por um processo infeccioso, principalmente nas células do epitélio pulmonar, onde multiplica-se rapidamente e causa diversos sintomas devido ao processo infeccioso. Sintomatologia pode-se citar: febre, tosse, dor de cabeça, alteração de olfativas e auditivas, sintomas respiratórios e diarreia, pois diferentes dos outros CoVs, a COVID-19 é capaz de causar disfunções principalmente nos tratos respiratórios e gastrointestinal. Porém, estudos mais recentes, tem apontado a ação do vírus em outros sistemas fisiológicos o que por consequência, leva ao aparecimento de diversos outros sintomas, outrora desconhecidos. Dentre os outros sistemas orgânicos também afetados pelas infecções está o sistema nervoso central (SNC) o qual causa no paciente acometido pela virose em questão cefaleia, confusão mental, ataxia, epilepsia, como também perda de olfato e paladar e neuralgia. Alguns estudos relatam o possível desenvolvimento de alterações cognitivas e humoral, em um olhar crônico a doença (Felite, *et al.* 2020). Além do SNC, o sistema musculoesquelético também é afetado, principalmente em paciente que já apresentem comorbidades que afetem a psicomotricidade (Dubbioso *et al.* 2020; Ferrarese *et al.* 2020).

Quanto ao sistema psiconeurológico, foco do presente estudo, Brito e Silva (2020) apontam diversos mecanismos para a invasão viral no sistema nervoso central, dentre estes podemos citar um dos mais conhecidos mecanismos de invasão intracelular do coronavírus que se dá por meio da interação da sua proteína Spike presente em seu capsídeo com os receptores das enzimas conversoras de angiotensina-2 (ECA2), proteínas que além de estarem presentes nas células pulmonares, também podem ser encontradas nos neurônios e células gliais. Outro mecanismo também mencionado por estes autores é por meio da via trans-sináptica através dos nervos olfativos. Além destes, os autores também ressaltam que uma resposta inflamatória exacerbada pode acometer a barreira hematoencefálica (BHE) permitindo que o vírus alcance o cérebro, desencadeando respostas neurológicas.

Esses acometimentos neurológicos, não apenas promovem uma desregulação da homeostase neural, afetam diretamente a neuroquímica cerebral desencadeando respostas psiquiátricas. Segundo Raony *et al.* (2020), a neuroinvasão e neuropatologia viral impacta diretamente no processo de alterações psicológicas e psiquiátricas nos pacientes. Evidencia-se em seu estudo a presença de distúrbios como depressão, ansiedade, mas também psicoses, aumento do nível de estresse e comportamentos suicidas. Já em pesquisas realizadas durante as pandemias do SARS- CoV-1 e MERS, tudo isso é justificado pelos autores, devido ao que é chamado de “tempestade de citocinas” desencadeada por uma resposta inflamatória severa do organismo na tentativa de combater a infecção, porém ao liberar uma quantidade colossal de citocinas essas começam a interferir significativamente na neuroquímica cerebral por meio da alteração no metabolismo de neurotransmissores, devido a uma desregulação no eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA), causando então disfunções psiquiátricas, principalmente nos pacientes classificados como em fase aguda severa do processo infeccioso.

Além da liberação de substâncias pro-inflamatórias durante a infecção pela COVID-19, os fatores psicossociais são de suma importância como variáveis para a apresentação de condições psiquiátricas. Em um estudo realizado por Kong *et al.* (2020) com pacientes hospitalizados, pelo menos 34.72% e 28, 47% dos pacientes, apresentaram sintomas de depressão e ansiedade



respectivamente, tanto em virtude de fatores fisiológicos quanto pelos fatores sociais, os quais são elucidados por Silva *et al.* (2020) que aborda em seu estudo a susceptibilidade de desenvolvimento de transtornos mentais em pacientes infectados pela COVID-19. Silva *et al.* (2020) afirma que além do lado orgânico os fatores sociais tais como o isolamento, a pressão psicológica insuportável, ausência de comunicação social, bem como efeitos de alguns medicamentos corroboram fortemente para o surgimento de transtornos mentais, principalmente depressão e ansiedade.

Retomando o estudo de Raony *et al.* (2020), pode-se perceber fortemente a relação entre o isolamento social e os surgimentos de quadros psiquiátricos. Os autores afirmam que o isolamento social não só afeta o psiquê do homem, mas também provoca distúrbios psico-neuroendócrinos, por meio de alteração na liberação síntese e recaptura de neurotransmissores essenciais, pela morte neuronal e redução da plasticidade neural, que junto a desregulação do eixo HPA seja por hipo ou hiperatividade forma o cenário perfeito para o surgimento de psicopatologias outrora já mencionadas.

Sendo assim, o presente estudo tem por objetivo discutir os fatores relacionados a infecção pela COVID-19, capazes de causar alterações psiconeurológicas nos pacientes durante o período da virose causada pelo coronavírus, bem como elucidar quais variáveis são responsáveis pelo acometimento psiquiátrico, sejam elas de cunho orgânico ou psicológico, uma vez que corpo e mente funcionam de forma integrada.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo se realizou uma revisão de literatura a partir das bases de dados BVS (Biblioteca Virtual em Saúde) que contempla as bases MedLine, PubMed, Lilacs. Também foi incluído como base de dados o Springer. Como estratégia de busca foram usados os descritores Coronavírus, COVID-19 e Alterações Psiquiátricas, nos idiomas inglês e português.

Os critérios de inclusão foram artigos e/ou estudos com textos completos disponíveis online, as publicações disponíveis serem nos idiomas inglês e/ou português e que atendessem a temática do presente estudo sendo, portanto, excluídos aqueles que não atendessem os critérios supracitados.

Na etapa de identificação dos artigos/estudos foram localizados 812 artigos que envolviam a temática do Coronavírus, contudo 560 foram excluídos pois não contemplavam o tema proposto pelo presente estudo.

Dos 252 restantes, 241 foram também excluídos por não apresentarem textos completos disponíveis ou estarem em idiomas diferentes dos citados nos critérios de inclusão, restando então 11 artigos/estudos que foram analisados minuciosamente e assim foram incluídos por se adequarem em todos os critérios propostos.

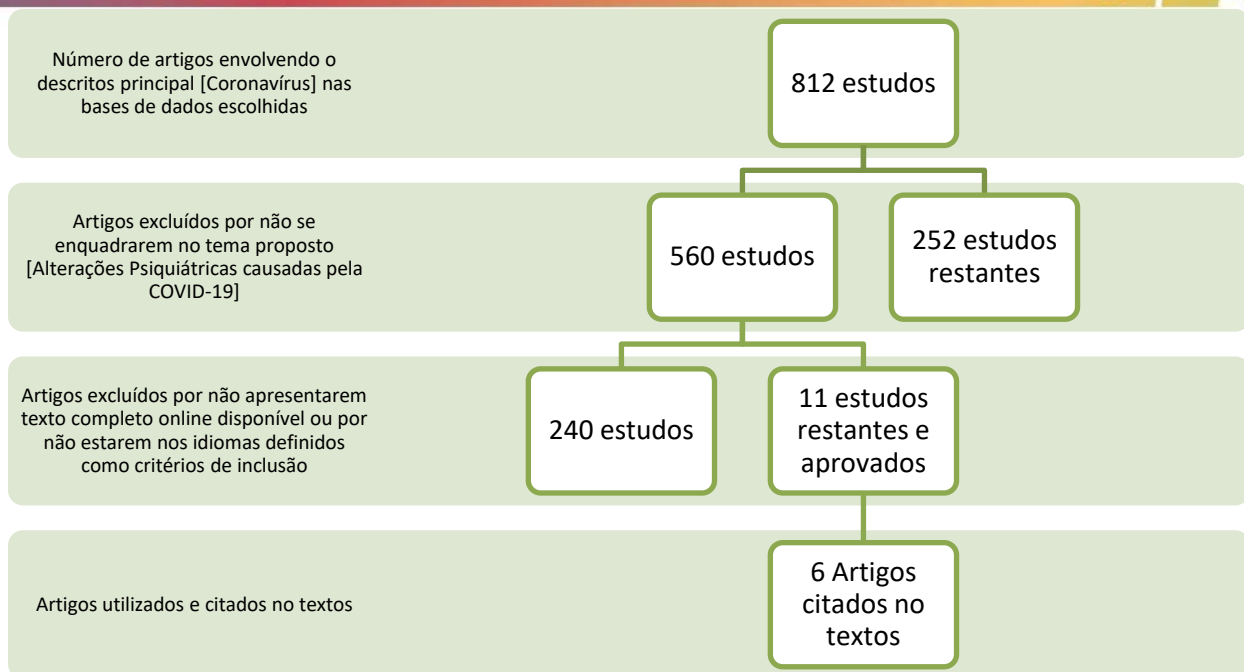


Figura 1. Metodologia de seleção e análise de artigos da revisão de literatura.

Fonte: Autor, 2020.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desde o início da pandemia, até os presentes dias, a ciência tem evoluído bastante frente a fisiopatologia da infecção por coronavírus. Além dos sintomas já comumente conhecidos a comunidade científica tem elucidado cada vez mais outros sistemas que podem ser acometidos pela virose e desencadear então uma nova sintomatologia nos pacientes.

Recentemente, tem-se discutido bastante acerca os impactos da COVID-19 sobre o SNC e quais as principais consequências esses impactos podem acarretar aos pacientes infectados, porém pouco se fala sobre os distúrbios psiquiátricos que podem ser resposta da infecção atuando no sistema nervoso central e periférico.

Os estudos aqui já mencionados trazem consigo pontos importantes que precisam ser elucidados, o primeiro ponto diz respeito a resposta orgânica a infecção (Figura 2). Raony *et al.* (2020) descreve muito esta ação fisiológica que se dá sumariamente por mudanças no eixo HPA, levando à alterações neuroendócrinas de defesa como uma resposta inflamatória exacerbada, no SNC por meio da expressão de receptores de ACE2 em neurônios e células gliais ou por meio dos nervos olfativos, teorias discutidas amplamente por Brito e Silva (2020). Esta resposta inflamatória induz a expressão de altas concentrações de citocinas, interleucinas e glicocorticoides capazes de mudar o metabolismo dos neurotransmissores e do cortisol, tornando o paciente mais susceptível a depressão, ansiedade, níveis de estresse elevados e desregulação do ciclo circadiano, além de fatores mais severos como psicoses e ideias suicidas.

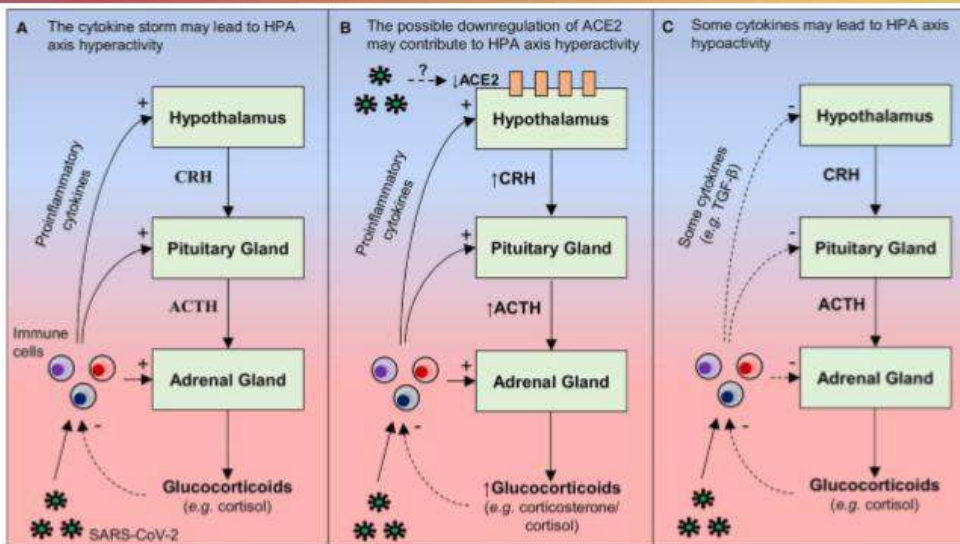


Figura 2. Desregulação do eixo HPA pelo SARS-CoV-2

Fonte: Raony et al. 2020

O segundo ponto relevante quanto aos aspectos psiquiátricos circunda a somatização da resposta fisiológica exacerbada com os fatores sociais os quais o indivíduo com diagnóstico de COVID-19 se sujeita. Silva *et al.* (2020) pontua em seu estudo que os fatores externos, a exemplo disso, o isolamento social, a pressão constante, assim como sentimentos negativos são também de grande importância no desenvolvimento psicopatológicos, uma vez que estes fatores interferem diretamente na qualidade do sono, que está totalmente relacionada com a imunidade, bem como a falta de interação social, que colabora imensamente para o agravamento de transtornos psiquiátricos já existentes ou torna o indivíduo propício a desenvolvê-los.

Fazendo uma relação psico-neuroendócrina entre os fatores fisiológicos e psicológicos que desencadeiam alterações psiquiátricas, podemos perceber claramente que ambos são fortes colaboradores para o processo de adoecimento psiquiátrico dos pacientes, tornando evidente a necessidade de um melhor manejo dessas condições a fim de não proporcionar comorbidades secundárias à infecção e por consequência agravar o processo de adoecimento do indivíduo.

4. CONCLUSÃO

A infecção pelo SARS-CoV-2 induz um processo inflamatório extenso, levando a danos severos na BHE e conseqüentemente, possibilitando a entrada do vírus no SNC. Danos psiquiátricos são visualizados devido a desregulações de cascatas bioquímicas, as quais interferem diretamente na homeostasia cerebral. A neuroinvasão pela COVID-19 contribui fortemente para o adoecimento psicológico via alterações neuro-humorais induzidas pelo vírus. Fatores externos a exemplo disso, o isolamento social, a pressão constante, assim como sentimentos negativos são também de grande importância no desenvolvimento psicopatológicos. Em suma, a tríade psico-neuroendócrino-social, é algo que requer atenção e uma dedicação maior em estudos clínicos voltados para essa área. Entender melhor o mecanismo patogênico do vírus no SNC pode ser decisivo no processo de adoecimento e cura de pacientes infectados pela COVID-19.



5. REFERÊNCIAS

- WGF, D.; JPDO, S. Impactos neuropatológicos do COVID-19. *Braz. J. Hea. Rev.*, v. 3, p. 4227-4235, 2020.
- D, B. *et al.* Dealing with immune-mediate neuropathies during COVID-19 outbreak: practical recommendations from the task force of the Italian Society of Neurology (SIN), the Italian Society of Clinical Neurophysiology (SINC) and the Italian Peripheral Nervous System Assosiation (ASNP). *Neurol SCI.*, v. 41, p. 1345 – 1348, 2020.
- F, G, F. *et al.* Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and the Central Nervous System. *Trends in Neurosciences.*, v. 43, p. 355 – 357, 2020.
- F, C.*et al.* An Italian multicenter retrospective-prospective observational study on neurological manifestation of COVID-19 (NEUROCOVID). *Neurol Sci.*, v. 41, p. 1355 – 1359, 2020.
- I, R. *et al.* Psycho-neuroendocrine-Immune Interactions in COVID-19: Potencial Impacts on Mental Health. *Frontiers in Immunology.*, v. 11, p. 1 – 15, 2020.
- X, K. *et al.* Prevalence and Factors Associated with Depression and Anxiety of Hospitalized Patients with COVID-19. *medRxiv preprint.*, 2020.
- J, K, S. *et al.* A relação entre a infecção por coronavírus e a susceptibilidade a transtornos mentais e o risco de suicídio: o que a literatura tem evidenciado? *J. Health Biol Sci.*, v. 8, p. 1 – 7, 2020.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Vigilância e Epidemiologia em Saúde

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E EPIDEMIOLÓGICAS DE PACIENTES COM COVID-19 EM PERNAMBUCO

C. T. A. DA SILVA¹, R. P. G. MENDES¹, J. J. F. DE MAGALHÃES^{1,2,3}, S. J. R. DA SILVA¹,
K. M. G. GUARINES¹ e L. J. PENA^{1*}

¹ Instituto Aggeu Magalhães (IAM), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Departamento de Virologia;

² Laboratório Central do Estado de Pernambuco (LACEN/PE), Departamento de Virologia;

³ Universidade de Pernambuco (UPE), Campus Serra Talhada.

E-mail para contato: carolinetargino.as@gmail.com

RESUMO – Apesar da América do Sul ser o atual epicentro da pandemia de COVID-19, com destaque para o Brasil, segundo país mais afetado do mundo, as características epidemiológicas e clínicas da doença ainda não foram descritas no país. Neste estudo, descrevemos os dados epidemiológicos e clínicos de 557 pacientes positivos para SARS-CoV-2 em Pernambuco. A idade dos pacientes infectados variou de 27 dias a 97 anos, com mediana de 47 anos. O sintoma mais comum foi tosse (n = 415, 74,51%), seguido de febre (n = 372, 66,79%), dispnéia (n = 312, 56,01%), dor de garganta (n = 157, 28,19%) e saturação de O₂ <95% (N = 136, 24,42%). A proporção de homens para mulheres no grupo infectado com SARS-CoV-2 foi de 0,83: 1. Entre os casos letais, 51 dos 59 (86,44%) eram pacientes com idade superior a 51 anos. O tempo médio desde o início da doença até o diagnóstico foi de 4 dias, com intervalo de 0 a 39 dias. Pacientes graves diagnosticados após 14 dias do início dos sintomas apresentaram maior carga viral que pacientes com doença leve. Nosso estudo fornece informações importantes sobre dados demográficos, clínicos e epidemiologia do COVID-19 no Pernambuco e pode auxiliar profissionais da saúde no enfrentamento do SARS-CoV-2 que segue alastrando-se pela população.

Palavras-chave: SARS-CoV-2; epidemiologia; vírus respiratório; pandemia.

ABSTRACT – Although South America is the current epicenter of the COVID-19 pandemic, with an emphasis on Brazil, the second most affected country in the world, the epidemiological and clinical characteristics of the disease have not yet been described in the country. In this study, we describe the clinical and epidemiological data of 557 patients positive for SARS-CoV-2 residing in Pernambuco. The age of infected patients ranged from 27 days to 97 years, with a median of 47 years. The most common symptom was cough (n = 415, 74.51%), followed by fever (n = 372, 66, 79%), dyspnea (n = 312, 56.01%), sore throat (n = 157, 28.19%) and O₂ saturation <95% (N = 136, 24.42%). The proportion of men to women in the group infected with SARS-CoV-2 was 0.83: 1. Among the lethal cases, 51 of the 59 (86.44%) were patients older than 51 years. The average



time from the beginning of the disease until the diagnosis was 4 days, with an interval from 0 to 39 days. Serious patients diagnosed 14 days after the onset of symptoms had a higher viral load than patients with mild disease. Our study provides important information on the clinical and epidemiological data of COVID-19 in Pernambuco and can assist health professionals to face SARS-CoV-2, which continues to spread throughout the population.

Keywords: SARS-CoV-2; epidemiology; respiratory virus; pandemic.

1. INTRODUÇÃO

A rápida disseminação do SARS-CoV-2 em todo o mundo fez com que a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarasse COVID-19 como uma pandemia em 11 de março de 2020 (WHO, 2020). A China foi o primeiro epicentro da pandemia, seguido pela Europa, EUA e agora América do Sul. Em 26 de fevereiro de 2020, o Brasil relatou o primeiro caso na América Latina em um paciente de São Paulo voltando para casa após uma viagem de trabalho à Itália, de 9 a 21 de fevereiro. O paciente apresentava uma doença respiratória leve caracterizada por coriza, tosse seca e dor de garganta (PAHO, 2020). Desde então, o número de casos de COVID-19 no Brasil aumentou constantemente e o país se tornou o segundo mais afetado no mundo depois dos EUA. Devido a escassez de testes de diagnóstico nos países em desenvolvimento, a incidência real de COVID-19 no Brasil é fortemente subestimada. Enquanto nos EUA por exemplo, foram realizados 97.362 testes por milhão de habitantes, o Brasil realizou apenas 13.766 testes / milhão de pessoas (WHO, 2020). Em 21 de julho de 2020, o Brasil confirmou 2,166 milhões de casos de COVID-19 e 81.597 mortes (WHO, 2020) sendo Pernambuco um dos estados mais afetados, com 80.441 casos e 6.089 óbitos (SAÚDE, 2020).

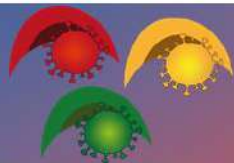
O surgimento do SARS-CoV-2 causou uma profunda mudança no cenário global e recrutou autoridades de saúde pública e grupos de pesquisa de diversas partes do mundo para preencher lacunas de conhecimento na biologia e na patogênese desse patógeno. Embora a apresentação epidemiológica e clínica do COVID-19 tenha sido bem documentada em vários países do Hemisfério Norte, as informações sobre os aspectos clínicos do COVID-19 na América Latina, especialmente no Brasil, permanecem limitadas. Assim, uma análise atualizada dos casos poderia ajudar a melhorar significativamente nosso conhecimento e, conseqüentemente, fornecer insights sobre o COVID-19 na nossa região (Lancet, 2020).

Neste trabalho, descrevemos as características clínicas e epidemiológicas dos primeiros 557 casos de COVID-19 confirmados em laboratório no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil, diagnosticados entre 12 de março e 22 de abril de 2020.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 DESENHO DO ESTUDO E COLETA DE DADOS

557 pacientes residentes no estado de Pernambuco com teste positivo para ácido nucleico de SARS-CoV-2 foi incluído no presente estudo. Pacientes com pelo menos um teste RT-qPCR positivo para SARS-CoV-2 foram considerados positivos para a infecção por COVID-19. Informações epidemiológicas dos pacientes e características clínicas foram obtidas dos prontuários eletrônicos do Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco (LACEN) e analisadas. Os dados foram obtidos de 12 de março a 22 de abril de 2020, a data final do acompanhamento. Este



estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da UPE sob o protocolo CAAE: 27607619.0.0000.5207 e foi realizado de acordo com as diretrizes e regulamentos relevantes, incluindo a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). As informações de identificação do paciente foram mantidas em sigilo.

2.2 CONFIRMAÇÃO LABORATORIAL

Todos os pacientes com COVID-19 incluídos neste estudo foram diagnosticados de acordo com as orientações provisórias da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2020). A confirmação laboratorial foi realizada no LACEN de Pernambuco. Foi realizada a coleta das amostras através de swabs nasofaríngeos e orofaríngeos, seguida da extração do RNA viral utilizando o Kit ReliaPrep Viral TNA Miniprep System (Promega, Madison, WI, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi utilizado para RT-qPCR seguindo o protocolo para detecção de SARS-CoV-2 estabelecida por Corman e equipe (Corman *et al.*, 2020).

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O Microsoft Office Excel (versão 2010) foi usado para criar um banco de dados com as informações dos pacientes. O processo e a análise dos dados foram feitos no GraphPad Prism versão 6.0 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). As variáveis contínuas foram expressas em medianas e intervalos interquartis, conforme apropriado. As variáveis categóricas foram resumidas em contagens e porcentagens. O teste do qui-quadrado foi utilizado para investigar o nível de associação entre as variáveis. Diferenças estatisticamente significantes foram definidas como $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 NÚMERO DE CASOS

A Figura 1A apresenta o número acumulado de casos COVID-19 registrados semanalmente. O primeiro caso positivo de SARS-CoV-2 no estado de Pernambuco foi notificado em 12 de março de 2020. Durante a primeira semana, 29 (5,20%) casos e 2 (3,38%) óbitos foram registrados. A quarta semana (de 7 a 14 de abril) registrou o maior aumento no número de casos e óbitos. No período, foram registrados 354 (63,55%) casos e 29 (49,15%) óbitos, o que correspondeu a 501 (89,94 %) casos positivos acumulados e 58 (98,30%) óbitos.

3.2 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS

Conforme demonstrado na Figura 1B, a idade dos pacientes infectados com SARS-CoV-2 variou de 27 dias a 97 anos, com média de 48,57 anos e mediana de 47 (intervalo interquartil [IQR], 32 a 68). A proporção de homens para mulheres no grupo infectado com SARS-CoV-2 foi de 0,83: 1 (45,42% homens/54,58% mulheres; teste qui-quadrado, $p = 0,46$), mostrando uma incidência ligeiramente maior em mulheres do que homens. O maior número de casos ocorreu em pacientes com idade entre 31 e 40 anos ($n = 128$, 22,98%), seguido pela faixa etária de 41 a 50 anos ($n = 121$, 21,72%) e o grupo com pacientes entre 51 e 60 anos ($n = 101$, 18,13%). Durante o período do estudo, ocorreram 59 mortes. Entre estes, 51 (86,44%) eram pacientes com idade superior a 51 anos. Apesar da maior incidência no sexo feminino, o número de óbitos foi maior no



sexo masculino (55,93% versus 44,06%), apesar da diferença não ter atingido significância estatística (teste do qui-quadrado, $p = 0,87$). A idade média dos pacientes falecidos foi de 66,06 anos e a mediana foi de 65 anos (intervalo interquartil, 51,5 - 82,5). A maior taxa de mortalidade foi observada em pacientes na faixa etária de 61 a 70 anos ($n = 18$, 30,50%), seguida pela faixa etária de 51 a 60 anos ($n = 11$, 18,64%).

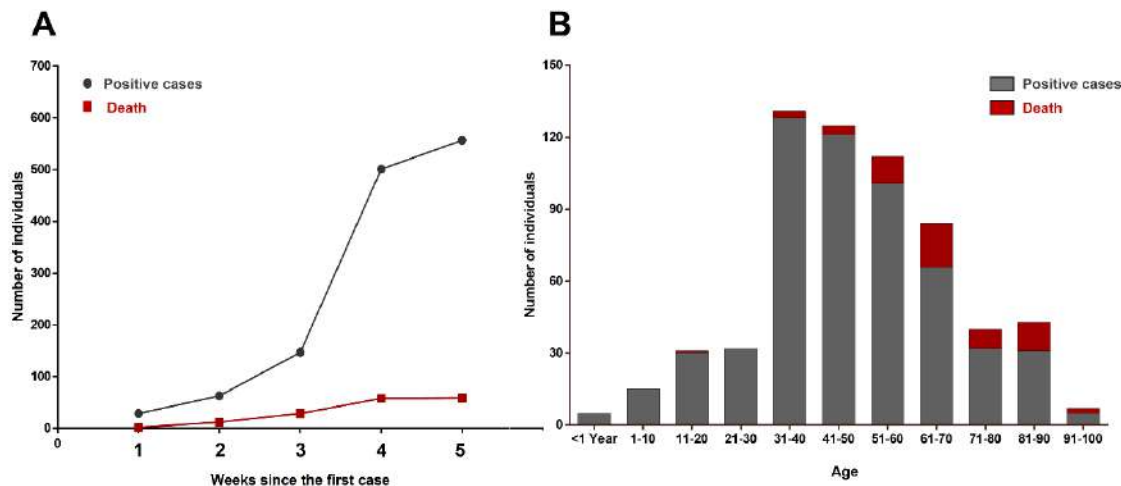


Figura 1 - Características epidemiológicas de pacientes com COVID-19 ($n = 557$) em Pernambuco, Brasil. A) Número acumulado de pacientes infectados e falecidos com COVID-19 registrados semanalmente desde o primeiro diagnóstico. B) Distribuição etária nos casos letais e não letais do COVID-19.

3.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Conforme demonstrado na Figura 2A, o sintoma mais comum no momento da notificação do paciente foi tosse ($n = 415$, 74,51%), seguido de febre ($n = 372$, 66,79%), dispnéia ($n = 312$, 56,01%), dor de garganta ($n = 157$, 28,19%) e saturação de O₂ <95% ($N = 136$, 24,42%). Alguns pacientes também apresentaram mialgia ($n = 28$, 5,03%), dor de cabeça ($n = 24$, 4,31%), coriza ($n = 20$, 3,59%), diarreia ($n = 17$, 3,05%) e vômitos ($n = 9$, 1,62%). A Figura 2B mostra os sintomas de acordo com a faixa etária.

Os sintomas mais prevalentes em pacientes com menos de 20 anos foram febre, tosse e dispnéia. Além desses sintomas, dor de garganta, mialgia, dor de cabeça, diarreia, vômito e coriza eram mais comuns em pessoas com mais de 20 anos de idade. A maior taxa de pacientes com saturação <95% foi encontrada em indivíduos acima de 61 anos. O tempo médio desde o início dos sintomas até a data da notificação foi de 4,85 dias, enquanto nos pacientes falecidos esse número foi de 4,52 dias.

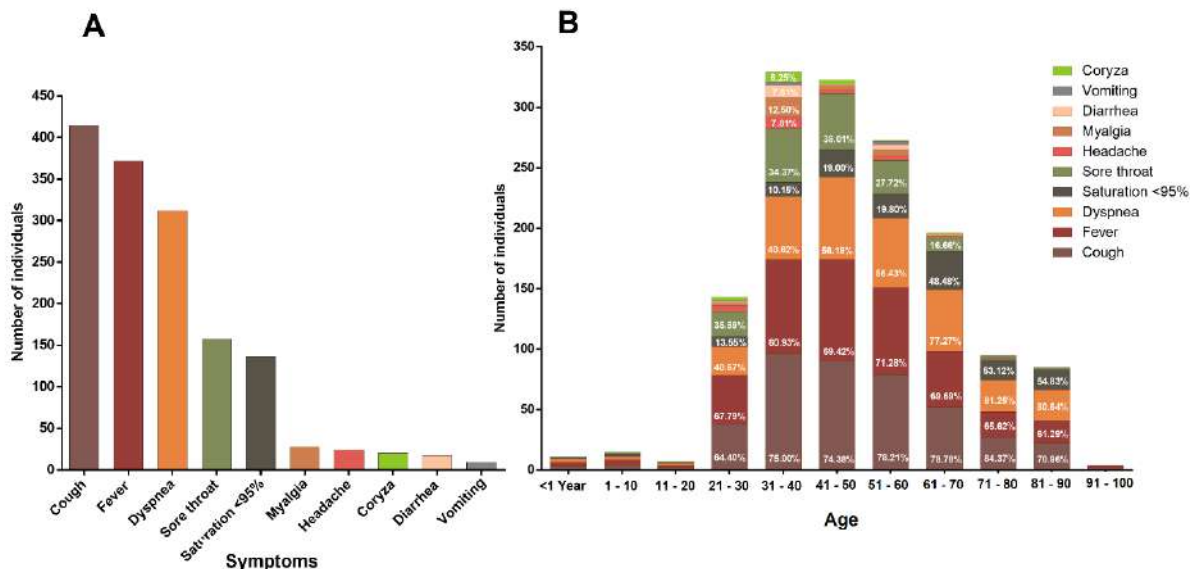


Figura 2 – Características clínicas dos pacientes com COVID-19 (n = 557) em Pernambuco, Brasil. A) Principais sintomas apresentados no momento da notificação do paciente. B) Distribuição dos sintomas de acordo com a faixa etária.

3.4 COMORBIDADES ASSOCIADAS

Informações sobre comorbidades estavam disponíveis para 116 pacientes. 72,27% dos pacientes relataram comorbidades. A comorbidade mais prevalente foi hipertensão arterial (26,72%), seguida de diabetes mellitus (16,38%), doenças cardiovasculares (13,79%), asma (6,89%), doença pulmonar (4,31%), obesidade (2,59%) e doença renal (0,87%) conforme demonstrado na figura 3.

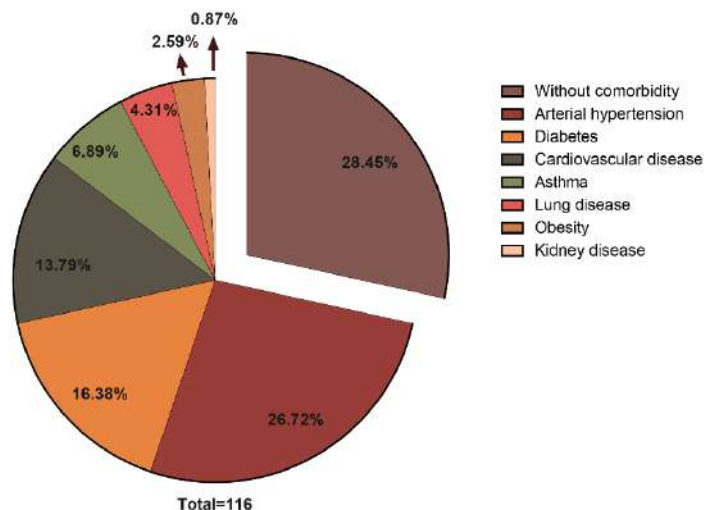


Figura 3 – Comorbidades clínicas em pacientes com COVID-19.



4. CONCLUSÃO

O SARS-CoV-2 continua se alastrando no Brasil, causando desafios ao sistema de saúde do país. Nosso estudo forneceu informações importantes sobre clínica e epidemiologia do COVID-19 no estado e ajudará os profissionais a enfrentar a atual pandemia e a estarem melhor preparados para possíveis pandemias futuras.

5. REFERÊNCIAS

CORMAN, V. M.; LANDT, O.; KAISER, M., et al. *Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR*. Euro Surveill. 2020.

LANCET T. COVID-19 in Brazil: "So what?". Lancet. 2020;395(10235):1461.

PAHO. *Brasil confirma primeiro caso de infecção pelo novo coronavírus*. In:2020.

SAÚDE. *Boletim Covid-19 - Secretaria de Saúde de Pernambuco*. In:2020.

WHO. *Clinical management of severe acute respiratory infection when COVID-19 is suspected*. 2020. [https://www.who.int/publications-detail/clinical-management-of-severe-acute-respiratory-infection-when-novel-coronavirus-\(ncov\)-infection-is-suspected](https://www.who.int/publications-detail/clinical-management-of-severe-acute-respiratory-infection-when-novel-coronavirus-(ncov)-infection-is-suspected).

WHO. *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) - Situation Report - 51*. 2020.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos órgãos de fomento CAPES e Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo suporte financeiro, ao Instituto Aggeu Magalhães - Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e Laboratório Central do Estado de Pernambuco (LACEN/PE) pelo suporte e dados clínicos fornecidos.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Vigilância e Epidemiologia em Saúde

COINFEÇÃO TUBERCULOSE-HIV EM PERNAMBUCO: PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE 2015 A 2019

D. L. CORIOLANO¹, E. V. BUENO², J. B. SOUZA³ e F. H. P. C. OLIVEIRA³.

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências;

² Faculdades de Enfermagem Nova Esperança;

³ Centro Universitário São Miguel.

E-mail para contato: davi.coriolano@ufpe.br

RESUMO – *O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um retrovírus de grande importância clínica que desestabiliza o sistema imunológico pela depleção de linfócitos T CD4+, afetando a imunidade e aumentando a propensão a infecções oportunistas, como a Tuberculose (TB). O presente estudo objetiva avaliar o perfil epidemiológico da coinfeção TB-HIV no estado de Pernambuco-Brasil no período de 2015-2019. Trata-se de um estudo transversal retrospectivo descritivo do perfil epidemiológico da coinfeção TB-HIV em Pernambuco, baseado em dados secundários obtidos de fichas de notificação epidemiológica disponíveis no DataSUS, na plataforma do Sistema Nacional de Agravos (SINAN). Entre os anos de 2015-2019, foram confirmados 3378 casos de coinfeção TB-HIV. Entre os coinfectados, prevaleceu os indivíduos do sexo masculino, representando 71,2% (2405) dos casos. Em relação à faixa etária, 1910 casos foram de pacientes entre 20-39 anos, sendo esta com maior incidência de casos. Entre os casos de coinfeção, 2829 (83,7%) pessoas tinham desenvolvido a AIDS, ou seja, a maioria. Ainda foi constatado que mais de 500 desses pacientes não faziam uso da terapia antirretroviral. Evidenciamos a adesão estadual da testagem de sorologia dos pacientes acometidos com HIV e TB, inferindo melhorias relacionadas ao conhecimento técnico a respeito da importância da sua realização, sendo de extrema importância, uma vez que indivíduos infectados são fontes em potencial de disseminação.*

Palavras-chave: Epidemiologia; *Mycobacterium tuberculosis*; Sorologia da AIDS.

ABSTRACT – *The human immunodeficiency virus (HIV) is a retrovirus of great clinical importance that destabilizes the immune system and depletes CD4 + T lymphocytes, affecting immunity and increasing the propensity to opportunistic diseases, such as tuberculosis (TB). This study aims to evaluate the epidemiological profile of TB-HIV co-infection in the state of Pernambuco-Brazil in the period of 2015-2019. This is a retrospective cross-sectional descriptive study of the epidemiological profile of TB-HIV coinfection in Pernambuco, based on secondary data, collected from epidemiological notification forms available at DataSUS, on the National Health System platform (SINAN). Between 2015 and 2019, 3378 cases of TB-HIV co-infection were confirmed. Among those co-infected, the male gender prevailed, representing 71.2% (2405) of the cases. In relation to age group, 1910 cases were of patients between 20-39 years, being this with the highest incidence of cases. Among the cases of coinfection, 2829 (83.7%) people had developed AIDS, or in other words, the majority. It was also found that more than 500 of these patients were not using antiretroviral therapy. We evidence the state-wide adherence to HIV and TB serology testing of affected patients, inferring improvements related to technical knowledge regarding the importance of its realization, being of extreme importance, since infected individuals are potential sources of dissemination.*



of the cases. Regarding the age group, 1910 cases of patients were from the 20-39 years group, this being the group with the highest incidence of cases. Among the cases of coinfection, 2829 (83.7%) people developed AIDS, that is, the majority. It was also found that more than 500 of these patients did not use antiretroviral therapy. Therefore, we show Pernambuco's adherence on serology testing of patients with HIV and TB, inferring changes related to technical knowledge and respect for the importance of its performance, being extremely important, since they are infected by potential sources of dissemination.

KEYWORDS: *Epidemiology; Mycobacterium tuberculosis; AIDS serology.*

1. INTRODUÇÃO

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um retrovírus de grande importância clínica que desestabiliza o sistema imunológico, principalmente pela depleção de linfócitos T CD4+, afetando a imunidade e aumentando a propensão a infecções oportunistas, como a Tuberculose (TB), cujo agente etiológico é o *Mycobacterium tuberculosis* (Diedrich; Flynn, 2011). Estima-se que as chances de um indivíduo HIV positivo desenvolver TB são de 15-22 vezes mais altas quando comparadas a indivíduos soronegativos, uma vez que a imunodepressão pode facilitar a ativação de uma TB latente ou, ainda, facilitar uma nova infecção (WHO, 2019). Esses microrganismos conseguem atuar em sinergia, a tentativa do organismo de combater a tuberculose resulta no aumento da replicação do HIV, levando a um quadro de imunossupressão durante o período lítico do ciclo do HIV, assim facilitando a disseminação da micobactéria no organismo e agravando o caso clínico do paciente (Pawlowski *et al.*, 2012).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, apenas em 2018, a coinfeção TB-HIV desencadeou 251 mil óbitos mundialmente, evidenciando os altos índices de morbimortalidade e estabelecendo essa coinfeção como um grande problema de saúde pública. Entre esses óbitos, a prevalência de pessoas do gênero masculino, adultas e pertencentes a países em desenvolvimento foi maior (WHO, 2019).

No Brasil, a promoção e incentivo para a prevenção e realização de teste rápido tanto para HIV como TB, configura-se como baixa. A Região Nordeste do país, principalmente, nos últimos anos vem apresentando diversos casos de coinfeções, favorecendo a incidência, mortalidade e exposição da população a estes microrganismos, bem como, representando um problema grave de saúde, visto que pessoas contaminadas pela coinfeção TB-HIV são potentes fontes de disseminação da doença, necessitando imediatamente iniciar o tratamento e intervenções adequadas, visto que são indivíduos mais suscetíveis em desenvolver condições clínicas grave, necessitando de assistência hospitalar (Oliveira *et al.*, 2018).

Diante da dimensão do impacto que a coinfeção TB-HIV configura para a saúde pública, faz-se necessário pesquisas que divulguem o perfil epidemiológico de pacientes coinfectados, para que possa haver o planejamento de ações e estratégias voltadas às políticas públicas de controle da coinfeção (Santos *et al.* 2009). Logo o presente estudo tem como objetivo avaliar o perfil epidemiológico da coinfeção TB-HIV no estado de Pernambuco-Brasil no período de 2015-2019.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo transversal retrospectivo descritivo do perfil epidemiológico da coinfeção TB-HIV em Pernambuco, baseado em dados secundários obtidos de fichas de notificação epidemiológica disponíveis no DataSUS, na plataforma do Sistema Nacional de Agravos (SINAN). As variáveis estudadas foram idade, gênero e desenvolvimento da síndrome da



Imunodeficiência Adquirida (AIDS) entre os pacientes coinfectados, sendo todos referentes aos casos notificados nos anos de 2015-2019. Todas as informações foram coletadas entre os dias 10/07/2020 e 14/07/2020.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre os anos de 2015-2019, foram confirmados 29239 novos casos de TB no estado de Pernambuco, sendo 3378 (~11,65%) casos de coinfeção TB-HIV. No ano de 2016, houve o maior índice de coinfeções, sendo 691 casos (~20,45%), enquanto no ano de 2015, observou-se o número de casos (649, ~19,21%).

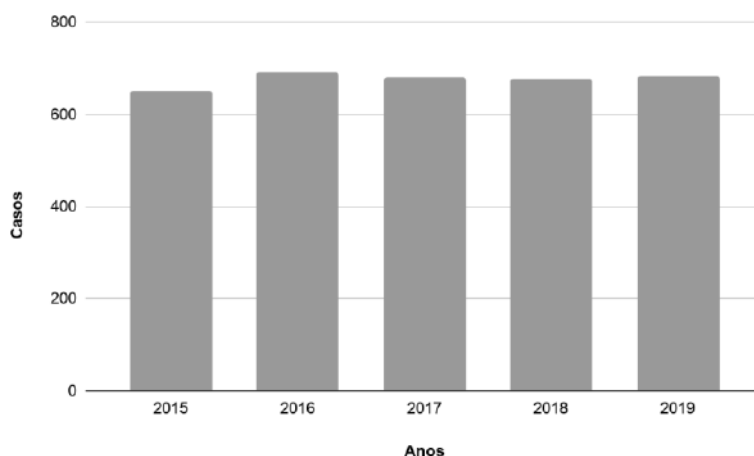


Figura 1- Panorama epidemiológico de casos de coinfeção TB-HIV em Pernambuco durante os anos de 2015-2019.

Em relação à faixa etária, 48 casos foram de pacientes com idade entre 0-14 anos; 62 pacientes diagnosticados tinham idades entre 15-19 anos; 1910 casos foram de pacientes entre 20-39 anos, sendo essa a faixa etária com maior incidência de casos; 1224 casos foram de pacientes que tinham entre 40-59 anos; 134 pacientes tinham 60 anos ou mais. A partir desses dados é constatado que a maioria dos casos estão concentrados entre a população de 20 a 59, uma vez que estão sexualmente mais ativos e na maioria das vezes não possuem educação sexual, assim tendo maior possibilidade de entrar em contato com os microrganismos causadores dessa coinfeção, o que é preocupante, uma vez que indivíduos dessa faixa etária são economicamente mais ativos, pois estão inseridos no mercado de trabalho (Barbosa; Costa, 2014; Do Prado *et al.*, 2014).

Entre os coinfectados, prevaleceu os indivíduos do sexo masculino, representando 71,2% (2405) dos casos, contra 28,7% (971) casos de pacientes do sexo feminino e 0,1% (2) pacientes tiveram seu sexo ignorado (Figura 2). O motivo pelo qual o índice de casos de coinfeção entre homens é desproporcionalmente maior, não está totalmente claro. Entretanto o estilo de vida, os cuidados com a saúde, o fato de homens levarem mais tempo para procurar serviços de saúde e a maior dificuldade de indivíduos do sexo masculino de verbalizar suas necessidades de saúde podem está relacionadas (Hino *et al.*, 2012).

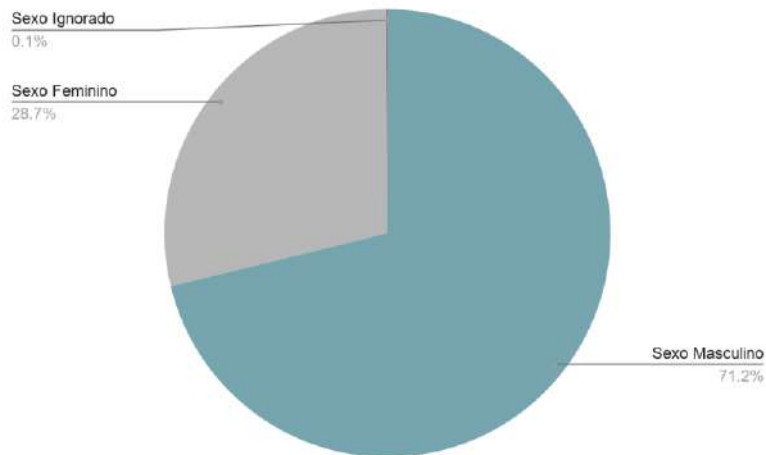


Figura 2 - Panorama epidemiológico de casos de coinfectados por sexo.

Entre os casos de coinfeção, 2829 (83,7%) pessoas tinham desenvolvido a AIDS, ou seja, a maioria. Ainda foi constatado que mais de 500 desses pacientes não faziam uso da terapia antirretroviral.

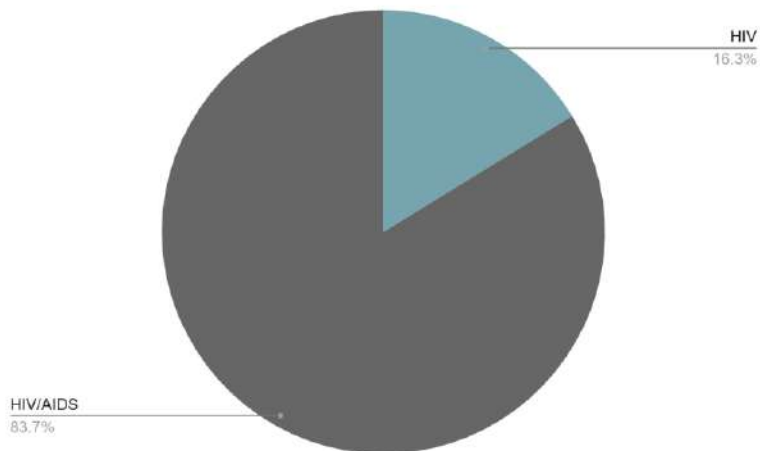


Figura 3 - Panorama epidemiológico de coinfectados que desenvolveram a AIDS.

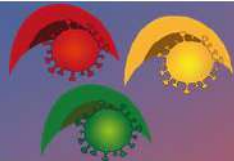
4. CONCLUSÃO

O presente estudo evidencia a adesão estadual da testagem de sorologia dos pacientes acometidos com HIV e TB, inferindo melhorias relacionadas ao conhecimento técnico a respeito da importância da sua realização. Acredita-se que os dados registrados nos últimos anos sejam mais fidedignos ao panorama atual, mesmo considerando as dificuldades de registros e a subnotificação. Apesar disso, é de extrema importância a implementação de testes rápidos que objetivem detectar de forma mais efetiva os casos dessa coinfeção, uma vez que indivíduos infectados são fontes em potencial de disseminação, e para que possa haver o planejamento de estratégias de controle dessa coinfeção.



5. REFERÊNCIAS

- BARBOSA, I. R.; COSTA, I. D. C. C. Estudo epidemiológico da coinfeção Tuberculose-HIV no nordeste do Brasil. *Rev. Patol. Trop.*, v. 43, n. 1, p. 27-38, 2014.
- DIEDRICH, C. R.; FLYNN, J. L. HIV-1/mycobacterium tuberculosis coinfection immunology: how does HIV-1 exacerbate tuberculosis?. *Infect. immun.*, v. 79, n. 4, p. 1407-1417, 2011.
- DO PRADO, T. N.; MIRANDA, A. E.; DE SOUZA, F. M.; DIAS, E. S.; SOUSA, L. K. F.; ARAKAKI-SANCHEZ, D.; SANCHEZ, M. N.; GOLUB, J. E.; MACIEL, E. L. Factors associated with tuberculosis by HIV status in the Brazilian national surveillance system: a cross sectional study. *BMC infect. dis.*, v. 14, n. 1, p. 415, 2014.
- HINO, P.; TAKAHASHI, R. F.; BERTOLOZZI, M. R.; EGRY, E. Y. Coinfeção de TB/HIV em um distrito administrativo do município de São Paulo. *Acta Paul. Enferm.*, v. 25, n. 5, p. 755-761, 2012.
- PAWLOWSKI, A.; JANSSON, M.; SKÖLD, M.; ROTTENBERG, M. E.; KÄLLENIUS, G. Tuberculosis and HIV co-infection. *Plos pathog*, v. 8, n. 2, p. e1002464, 2012.
- OLIVEIRA, L.B.; COSTAR, C.R.B.; QUEIROZ, A.A.F.L.N.; ARAÚJO, T.M.E.; SOUSA, K.A.A.; REIS, R.K. Análise epidemiológica da coinfeção Tuberculose/HIV. *Cogitare Enferm*, v. 23, n. 1, p. e51016, 2018.
- SANTOS, M. D. L. S. G.; PONCE, M. A. Z.; VENDRAMINI, S. H. F.; VILLA, T. C. S.; DOS SANTOS, N. S. G. M.; WYSOCKI, A. D.; KUYUMIJIAN, F. G.; GAZETTA, C. E. A dimensão epidemiológica da coinfeção TB/HIV. *Rev. Latino-am. Enferm*, v. 17, n. 5, 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Report 2019. Geneva. WHO; 2019.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Vigilância e Epidemiologia em Saúde

ESTUDOS E ENSAIOS CLÍNICOS SOBRE CLOROQUINA, IVERMECTINA E AZITROMICINA NO TRATAMENTO DA COVID-19

D. R. C. TEIXEIRA¹, L. P. LIMA², M. G. R. PITTA¹ e I. R. PITTA¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos;

² Universidade Católica de Pernambuco, Faculdade de Medicina;

E-mail para contato: cravo.diego@gmail.com

RESUMO – A COVID-19 (*Coronavirus disease-19*) é causado pelo SARS-COV2 e representa um agente causador de uma doença potencialmente fatal que é um grande problema de saúde pública global. Até o momento, nenhum medicamento antiviral específico foi aprovado, e o tratamento da doença depende principalmente de medicamentos que tratam sintomas e cuidados de suporte. Tratamentos efetivos e seguros para a COVID-19 são urgentemente necessários. Uma abordagem para identificar a terapêutica é redirecionar o desenvolvimento de medicamentos já aprovados para outras finalidades, o que é um avanço, pois aproveita-se as informações detalhadas já existentes sobre farmacologia humana e toxicologia, para permitir rápidos ensaios clínicos e revisão regulatória. Nesse sentido, foi feita uma pesquisa quantitativa e qualitativa sobre os fármacos Azitromicina, Cloroquina e Ivermectina utilizando-se das ferramentas Google Scholar e clinicaltrials.gov para a coleta de dados sobre artigos publicados e levantamento de ensaios clínicos. Através dos resultados observou-se um aumento da quantidade de artigos sobre os três fármacos no ano de 2020, além de uma maior densidade de estudos clínicos em fase II e III utilizando-se das três medicações citadas anteriormente para tratamento da COVID-19.

Palavras chaves: Covid-19, Reposicionamento de Medicamentos, Ensaio Clínicos

ABSTRACT – Coronavirus disease (COVID-19) is caused by SARS-COV2 and represents the causative agent of a potentially fatal disease that is of great global public health concern. To date no specific antiviral drug has been approved, and the treatment of the disease mainly relies on medicines treating symptoms and supportive care. Effective and safe treatments for COVID-19 are urgently needed. One approach to identifying therapeutics is to repurpose approved drugs developed for other uses, which takes advantage of existing detailed information on human pharmacology and toxicology to enable rapid clinical trials and regulatory review. Thus, a quantitative and qualitative research was carried out on the drugs Azithromycin, Chloroquine and



Ivermectin using the tools Google Scholar and clinicaltrials.gov to collect data on published articles and survey clinical trials. Through the results, an increase in the number of articles on the three drugs was observed in the year 2020, in addition to a greater density of clinical studies in phase II and III using the three medications previously mentioned for the treatment of COVID-19.

Keywords: Covid-19, Drug Repurposing, Clinical Trials

1. INTRODUÇÃO

A COVID-19 (*Coronavirus Disease-19*) é causada pelo SARS-COV2 e constitui uma ameaça global de saúde, tendo sido declarada uma pandemia, pela Organização Mundial de Saúde em 11 de março de 2020. A sustentada transmissão entre seres humanos, somada à ausência de um tratamento específico e padronizado, reforçam a importância em buscar meios de combater a doença para além dos cuidados sintomáticos atuais (Zhao *et al.*, 2020), demandando a prospecção de novos insumos farmacêuticos ativos (IFAs).

Os sintomas da infecção por COVID-19 aparecem após um período de incubação de aproximadamente 5,2 dias. Os sintomas mais comuns no início da doença são febre, tosse e fadiga, enquanto outros sintomas incluem produção de escarro, dor de cabeça, hemoptise, diarreia, dispneia e linfopenia. A transmissão pessoa a pessoa dessa infecção levou ao isolamento de pacientes que receberam uma variedade de tratamentos. No entanto, atualmente, não existem medicamentos antivirais específicos ou vacina contra a infecção por COVID-19 para terapia potencial em seres humanos. Sendo visível, portanto, a urgente necessidade de mais pesquisas para identificar novos fármacos quimioterapêuticos para o tratamento de infecções por COVID-19 (Rothan & Byrareddy, 2020).

A estratégia do redirecionamento de medicamentos oferece várias vantagens sobre o desenvolvimento de um medicamento totalmente novo para uma determinada indicação (Ashbur e Thor, 2004). Primeiro, e talvez o mais importante, o risco de falha é menor. O medicamento reaproveitado já foi considerado suficientemente seguro em modelos pré-clínicos e humanos se os ensaios em estágio inicial foram concluídos. Portanto, é menos provável que falhe pelo menos do ponto de vista de segurança nos ensaios de eficácia subsequentes. Segundo, o prazo para o desenvolvimento de medicamentos pode ser reduzido, porque a maioria dos testes pré-clínicos, avaliação de segurança e, em alguns casos, o desenvolvimento de formulações já foram concluídos. Terceiro, é necessário menos investimento, embora isso varie bastante, dependendo do estágio e do processo de desenvolvimento do candidato a reaproveitamento (Breckenridge e Jacob, 2018).

Os custos regulatórios e da fase III podem permanecer os mesmos para um medicamento reaproveitado e para um novo medicamento na mesma indicação, mas ainda pode haver uma economia substancial nos custos pré-clínicos e nas fases I e II. Juntas, essas vantagens têm o potencial de resultar em um retorno do investimento menos arriscado e mais rápido no desenvolvimento de medicamentos reaproveitados, com custos associados médios mais baixos. Fármacos reaproveitados também podem revelar novos alvos e caminhos que podem ser mais explorados.

Normalmente, uma estratégia de reaproveitamento de medicamentos consiste em três etapas antes de levar o medicamento candidato ainda mais através do pipeline de desenvolvimento: identificação de uma molécula candidata para uma determinada indicação; avaliação mecanicista

do efeito do medicamento em modelos pré-clínicos; e avaliação da eficácia em ensaios clínicos de fase II (assumindo que existem dados de segurança suficientes dos estudos de fase I realizados como parte da indicação original) (Pushpakom *et al.*, 2018).

Azitromicina, Cloroquina e Ivermectina são os três medicamentos revisados no presente trabalho (Figura 1). A Azitromicina é um antibiótico usado no tratamento de várias infecções bacterianas. Entre as indicações mais comuns estão o tratamento de otite média, faringite estreptocócica, pneumonia, diarreia do viajante e outras infecções intestinais. Pode também ser usada no tratamento de várias infecções sexualmente transmissíveis, incluindo clamídia e gonorreia. Em associação com outros fármacos, pode também ser usada no tratamento de malária. Pode ser administrada por via oral ou intravenosa (Entringer, S. 2019).

A Cloroquina é um medicamento usado no tratamento e profilaxia de malária em regiões onde a malária é susceptível ao seu efeito. Em alguns tipos de malária, estirpes resistentes e casos complicados geralmente é necessário administrar outros medicamentos. A cloroquina é ocasionalmente usada no tratamento de amebíase extraintestinal, artrite reumatoide e lúpus eritematoso (Drugs.com, 2015).

A Ivermectina, por sua vez, foi aprovado pela FDA em 1998 como antiparasitário, e atualmente é indicado para o tratamento de estrogiloidíase intestinal, oncocercose, filariose, ascaridíase, escabiose, pediculose. Esse fármaco oferece efeitos potenciais para tratar uma variedade de doenças, com suas propriedades antimicrobianas, antivirais e anticâncer (Heidary & Gharebaghi, 2020).

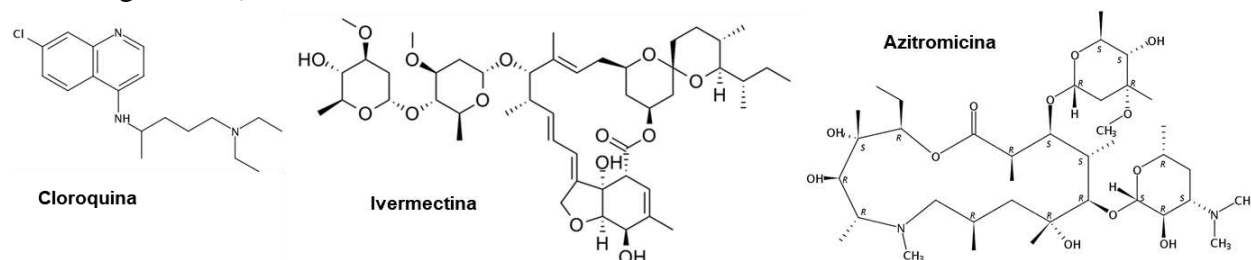


Figura 1 – Cloroquina, Ivermectina e Azitromicina

Apesar de existirem na literatura uma ampla gama de efeitos antivirais em estudos *in vitro* e/ou *in vivo* de modelos animais desses fármacos, são necessários ensaios clínicos para avaliar a eficácia potencial contra o COVID-19 no contexto clínico. Assim como para confirmar a segurança e eficácia para uso humano para descobrir janela preventiva ou terapêutica (Heidary & Gharebaghi, 2020).

Os ensaios clínicos são um tipo de pesquisa que estuda novos testes e tratamentos e avalia seus efeitos nos resultados de saúde humana. Os ensaios clínicos são cuidadosamente projetados, revisados e precisam ser aprovados antes que possam começar. Existem 4 fases de ensaios clínicos biomédicos: Os estudos da fase I geralmente testam novos medicamentos pela primeira vez em um pequeno grupo de pessoas para avaliar uma faixa de dosagem segura e identificar os efeitos colaterais. A Fase II estuda tratamentos que foram considerados seguros na fase I, mas agora precisam de um grupo maior de indivíduos humanos para monitorar quaisquer efeitos adversos. Os estudos de fase III são realizados em populações maiores e em diferentes regiões e países, e geralmente são o passo logo antes da aprovação de um novo tratamento. Os estudos de fase IV ocorrem após a aprovação do país e é necessário realizar mais testes em uma ampla população durante um período mais longo (WHO, 2020). Existe também a fase I inicial, que corresponde a



fase da pesquisa usada para descrever ensaios exploratórios conduzidos antes dos ensaios tradicionais da fase I para investigar como ou se um medicamento afeta o corpo. Elas envolvem exposição humana muito limitada à droga e não têm objetivos terapêuticos ou de diagnóstico (por exemplo, estudos de triagem, estudos de microdose) (FDA, 2006). Nesse sentido, este trabalho visou fazer um levantamento sobre a quantidade dos artigos científicos publicados sobre os fármacos *Azitromicina*, *Cloroquina* e *Ivermectina* no período de 2015 a 2020. Da mesma forma, foi feito um levantamento sobre os estudos em ensaios clínicos das três medicações relacionadas ao tratamento do COVID-19.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

As informações sobre os estudos de ensaios clínicos foram obtidas no site clinicaltrials.gov (pesquisa realizada no dia 22 de Julho de 2020), que é um site de registro de ensaios clínicos. Para realizar a pesquisa, é possível preencher três campos simultaneamente, o status, a condição ou doença e outros termos (onde pode ser adicionada o nome da droga). Na pesquisa, no campo *status* foi selecionado “All studies”, na *Condition ou disease* foi marcado “COVID-19” e em *Others terms* foi escrito o nome do fármaco. Foi feita uma pesquisa para cada fármaco “Azithromycin”, “Chloroquine” e “Ivermectin”. O Clinical Trials é administrado pela Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos no National Institutes of Health e é o maior banco de dados de ensaios clínicos com registros de mais de 329.000 estudos de 209 países.

Os artigos científicos coletados foram publicados no período de 2015 até 22 de Julho de 2020. A base de dados utilizada foi o Google Scholar que é uma ferramenta de pesquisa do Google que permite pesquisar em trabalhos acadêmicos, literatura escolar, jornais de universidades e artigos variados. Para a busca dos dados sobre a quantidade de artigos publicados foram utilizados os termos “Azithromycin”, “Chloroquine” e “Ivermectin” isoladamente, para cada ano de 2015 a 2020.

Neste estudo foi feito uma pesquisa quantitativa e qualitativa. A pesquisa quantitativa é a pesquisa científica na qual os resultados podem ser quantificados, diferindo da pesquisa qualitativa. A pesquisa quantitativa recorre a linguagem matemática para descrever as causas de um fenômeno, relações entre variáveis, e outras aplicações. Centrada na objetividade, foca na análise de dados brutos, adotando instrumentos padronizados e neutros na recolha dos dados, sendo geralmente constituída por amostras grandes e representativas da população, e por isso os resultados são encarados como um retrato real de toda a população alvo da pesquisa (Fonseca, 2002).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ENSAIOS CLÍNICOS

A partir dos dados sobre ensaios clínicos obtidos no site clinicaltrials.org, é possível observar as fases em que cada medicamento está para o tratamento da COVID-19. Azitromicina possui 105 ensaios clínicos, a Cloroquina possui 84 ensaios clínicos e a Ivermectina possui 36 ensaios clínicos. Do total desses ensaios clínicos, podemos subdividir eles em fase I inicial, fase I, fase II, fase III e fase IV (Tabela 1). A maioria dos três medicamentos estão nas fases II e III dos ensaios clínicos. A Azitromicina é o medicamento com maior número de ensaios clínicos voltados para a COVID-19, seguido pela Cloroquina e Ivermectina, respectivamente.



Tabela 1 – Ensaios Clínicos da Azitromicina, Cloroquina e Ivermectina

Ensaios	Azitromicina	Cloroquina	Ivermectina
Fase I Inicial	2	1	0
Fase I	6	3	2
Fase II	37	28	16
Fase III	42	33	11
Fase IV	5	12	1
Outros	13	7	6
Total	105	84	36

Dentre os estudos mais abordados nos ensaios clínicos pode-se citar a utilização de diferentes terapias de combinação de fármacos, onde compara-se a diferença dos efeitos da utilização do fármaco isolado e em associação a outros; estudos de segurança, eficácia e tolerância em pacientes hospitalizados; a utilização da medicação em condições específicas (gravidez, câncer, dentre outros grupos de risco); diferença da resposta à medicação quando em casos severos e moderados.

3.2 ARTIGOS CIENTÍFICOS

Azitromicina, Cloroquina e Ivermectina são alguns dos medicamentos que estão sendo estudados para um possível reposicionamento, para o tratamento do COVID-19. Como observado no gráfico de série temporal (Figura 2), de 2015 até 2020, vemos um aumento substancial na quantidade de artigos publicados sobre cloroquina no ano de 2020 em relação aos anos anteriores. No ano de 2020, dos 510 artigos encontrados sobre a Cloroquina, 259 estavam relacionados ao COVID-19. No mesmo ano, dos 364 artigos relacionados a Azitromicina, 127 tratavam da temática COVID-19, e dos 173 artigos da Ivermectina, 34 relacionavam-se ao COVID-19. Os artigos publicados sobre a Azitromicina e a Ivermectina no ano de 2020 ainda está abaixo da média dos anos anteriores, porém como estes dados foram colhidos em julho de 2020, a tendência é que ao final do mesmo ano os artigos publicados estejam com números maiores em relação aos números dos anos anteriores.

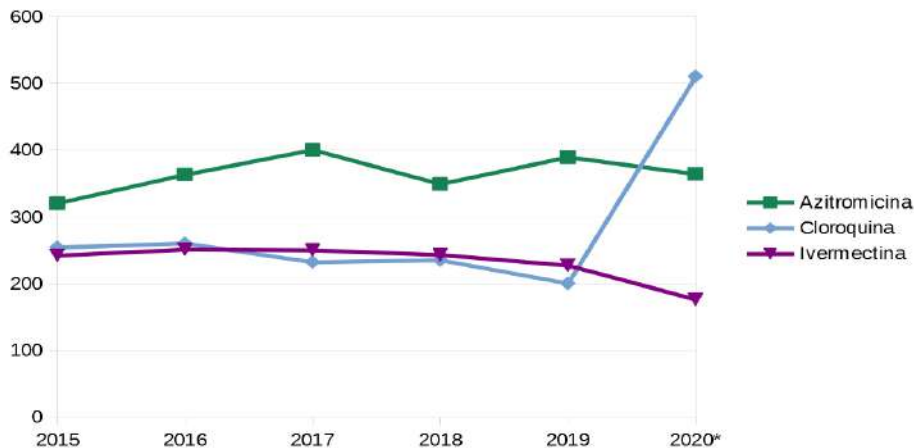
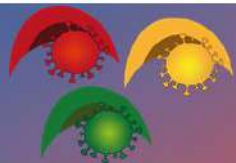


Figura 2 - Série temporal da quantidade dos artigos publicados sobre Azitromicina, Cloroquina e Ivermectina. Fonte: Google Scholar (2015 a 2020).

4. CONCLUSÃO

Considerando o fato de até o momento não haver vacinas ou medicamentos específicos para a COVID-19, várias pesquisas científicas tem se voltado para a busca de alternativas terapêuticas para a combater a doença. Neste trabalho foi observado um grande aumento na quantidade de artigos científicos publicados e estudos de ensaios clínicos sobre Azitromicina, Cloroquina e Ivermectina, o que indica uma tentativa de reposicionamento destes medicamentos para o combate da COVID-19. Particularmente para as três medicações candidatas ao reposicionamento, Azitromicina, Cloroquina e Ivermectina, foi encontrada uma maior densidade de estudos clínicos em fase II e III.

Com o objetivo de obter-se um tratamento eficaz, seguro e confiável para uma determinada patologia, é importante que todos os medicamentos sejam testados e aprovados em ensaios pré-clínicos e clínicos. O reposicionamento de fármacos já existentes é um dos caminhos possíveis para a descoberta do tratamento da COVID-19, tendo como vantagens a redução do custo e tempo da pesquisa, visto que os compostos já passaram por testes anteriormente, inclusive testes de segurança.

5. REFERÊNCIAS

ASHBURN, T. T. & THOR, K. B. Drug repositioning: Identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*. 3, 673–683, 2004.

BRECKENRIDGE, A. & JACOB, R. Overcoming the legal and regulatory barriers to drug repurposing. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2018.

DRUGS.COM. Chloroquine, 2015. Disponível em <https://www.drugs.com/mtm/chloroquine.html>. Acesso em 21 de julho de 2020.

ENTRINGER, S. Azithromycin. Drugs.com, 2019. Disponível em <https://www.drugs.com/azithromycin.html>. Acesso em 21 de julho de 2020.



FONSECA, J. J. S. Apostila de metodologia da pesquisa científica. Fortaleza: UEC, p. 20, 2002.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Exploratory IND Studies, 2006.

PUSHPAKOM ET AL. Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2018.

ROTHAN, H. A., BYRAREDDY, S. N. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *Journal of Autoimmunity*, v. 109, p. 1-4, 2020.

HEIDARY, F.; GHAREBAGHI, R. Ivermectin: a systematic review from antiviral effects to COVID-19 complementary regimen. *The Journal of Antibiotics*, v. x, p. 1-10, 2020.

World Health Organization. Clinical trials. 2020. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/clinical-trials/#tab=tab_1 Acesso em 21 de julho de 2020.

ZHAO, D.; YAO, F.; WANG, L.; ZHENG, L.; GAO, Y.; YE, J.; GUO, F.; ZHAO, H.; GAO, R. A. A comparative study on the clinical features of COVID-19 pneumonia to other pneumonias. *Infectious Diseases Society of America*, v. x, p.1-6, 2020.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CAIS/ISG (Centro Avançado para Inovações em Saúde), ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), à FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco), ao INCT_if (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica) e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo suporte.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Vigilância e Epidemiologia em Saúde

ANÁLISE TEMPORAL DA EVOLUÇÃO DE NOTIFICAÇÕES DE HEPATITES VIRAIS NO BRASIL

E. P. FONTENELE¹; E. C. HOLANDA¹ e S. M. de ANDRADE²

¹ Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia;

² Centro Universitário Santo Agostinho, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia.

E-mail para contato: eriicarla@hotmail.com

RESUMO - *Introdução: As hepatites virais são doenças provocadas por diferentes agentes etiológicos, com tropismo primário pelo tecido hepático, apresentando características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais distintas. Desse modo, o presente estudo, objetivou promover uma análise temporal das notificações de hepatites virais no Brasil de 2010 a 2018. Metodologia: Trata-se de um estudo observacional descritivo retrospectivo, analisando o perfil epidemiológico dos casos de notificados de Hepatites virais no Brasil de 2010 a 2018, por meio de informações contidas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Resultado e Discussão: Observou-se uma maior prevalência no período de 2013(n=45.327) e 2014(n=44.523). O ano de 2018 houve menor taxa(n=28.087). A Hepatite C houve índice crescente. Enquanto a Hepatites B, C e D apresentam tendência de queda. Conclusão: Estes dados permitem orientar decisões de saúde pública, contribuindo para o planejamento, gestão e avaliação de intervenções para o controle e prevenção de hepatites no Brasil.*

Palavras-chave – Perfil de Saúde; Epidemiologia; Incidência; vigilância em saúde.

ABSTRACT - *Introduction: Viral hepatitis are diseases caused by different etiologic agents, with primary tropism for the hepatic tissue, presenting different epidemiological, clinical and laboratory characteristics. Thus, the present study aimed to promote a temporal analysis of notifications of viral hepatitis in Brazil from 2010 to 2018. Methodology: This is a retrospective, descriptive observational study, analyzing the epidemiological profile of the cases of reported viral hepatitis in Brazil from 2010 to 2018, through information contained in the Notifiable Diseases Information System (SINAN). Result and Discussion: A higher prevalence was observed in the period of 2013 (n = 45,327) and 2014 (n = 44,523). There was a lower rate in 2018 (n = 28,087). Hepatitis C showed an increasing rate, while Hepatitis B, C and D show a downward trend. Conclusion: These data allow guiding public health decisions, contributing to the planning, management and evaluation of interventions for the control and prevention of hepatitis in Brazil.*

Keywords –Health profile; Epidemiology; Incidence, health surveillance.



1. INTRODUÇÃO

As infecções pelos vírus das hepatites são causadas por agentes hepatotrópicos primários, que podem evoluir de forma aguda (até mesmo fulminante) ou crônica, de forma sintomática ou assintomática, dependendo do agente viral envolvido e de fatores imunogenéticos do paciente. Atualmente, são conhecidos cinco vírus responsáveis pelas diferentes hepatites humanas: os vírus das hepatites A (VHA), B (VHB), C (VHC), D (VHD) e E (VHE), que pertencem, respectivamente, às famílias *Picornaviridae*, *Hepadnaviridae*, *Flaviviridae*, *Deltaviridae* e *Hepeviridae* (NUNES et al.,2017). Esses agentes etiológicos apresentam similaridades do ponto de vista clínico e laboratorial, havendo, porém, peculiaridades epidemiológicas e prognósticas, ou seja, atinentes à sua evolução clínica (CRUZ et al.,2018).

As hepatites virais são ainda doenças infecciosas de transmissibilidade inter-humana, que por sua alta morbidade universal constituem importante problema de saúde pública (OLIVEIRA et al.,2020). Acredita-se que 57% dos casos de cirrose hepática e 78% dos casos de câncer hepático estão diretamente relacionados aos vírus de Hepatite B e C. Por fim são estimados 1,5 milhões de mortes relacionadas às Hepatites Virais. (OMS, 2017). No Brasil, desde a década de 1980, as hepatites virais vêm sendo objeto de preocupação das autoridades sanitárias, assim torna-se indispensável uma correta avaliação epidemiológica para o planejamento de ações de prevenção primária na população (OLIVEIRA et al.,2020). Desse modo, o presente estudo, objetivou promover uma análise temporal da evolução das notificações de hepatites virais no Brasil de 2010 a 2018.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo descritivo, quantitativo e de base populacional, utilizando-se dados secundários, no qual foi realizada uma pesquisa epidemiológica dos casos por Hepatites virais notificados no Brasil entre os anos de 2010 a 2018. Os dados foram coletados no site do Data SUS, a partir do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Devido ao estudo ter utilizado somente dados secundários de domínio público disponibilizados pelo Ministério da Saúde através do DataSUS não houve necessidade de submeter essa pesquisa ao Comitê de Ética de acordo com a Resolução CNS 466/12. As informações estão na seção de informação de saúde (TABNET), na opção epidemiologia e morbidades. As variáveis estudadas foram às seguintes: ano de Diagnóstico, hepatite A B, C e D na taxa de incidência (por 100.000 habitantes) por ano no Brasil. Os dados foram expostos em tabelas e gráficos e calculados através de frequências absolutas e percentuais, sendo processados nos programas Microsoft Office e Microsoft Excel 2019 e Tab para Windows (TabWin) versão 4.14.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

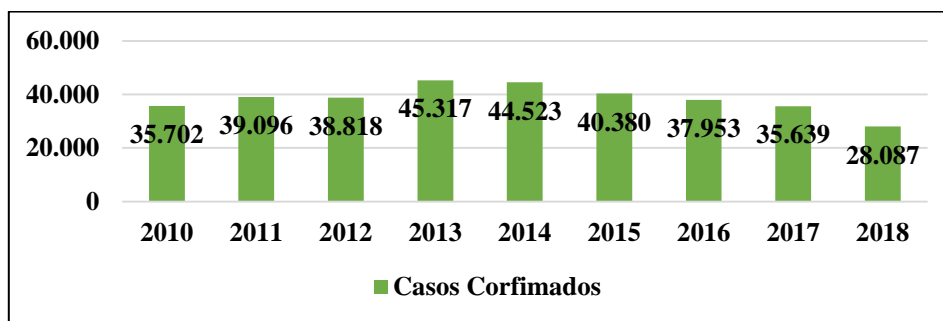




Gráfico 01: Casos confirmados de Hepatites virais segundo Ano no período de 2010-2018.
Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos e Notificação - SINAN Net.
Dados exportados em julho de 2020, sujeito às alterações.

Ao analisar o Gráfico 1, percebe-se que o ano que apresentou o maior número de casos foi o de 2013(n=45.317), seguido de 2014 (n=44;523). Porém, houve uma tendência decrescente de hepatites virais no Brasil a partir de 2013. Dentre as possíveis motivações para essa ocorrência tem-se o desenvolvimento de campanha que contribuem para a prevenção, maior autocuidado e conhecimento da doença por parte da população, além do diagnóstico e tratamento precoce contribuindo assim, para a quebra da cadeia de transmissão no País (OLIVEIRA et al.,2020).

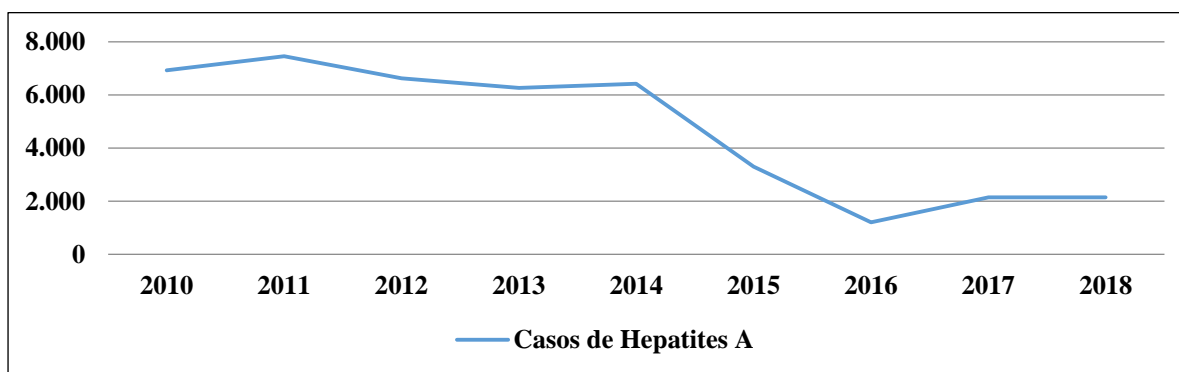


Gráfico 2- Casos de hepatite A pela taxa de incidência (por 100.000 habitantes) por ano de notificação, 2010-2018.
Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos e Notificação - SINAN Net.
Dados exportados em julho de 2020, sujeito às alterações.

As hepatites de maior importância para a saúde pública estatisticamente são as causadas pelo VHB e pelo VHC, devido ao alto número de indivíduos infectados por esses vírus e pelo elevado potencial de codificação das mesmas (BANDEIRA et al.,2018). Fato este que corrobora com o estudo conforme gráfico 3 e 4.

A vacina contra Hepatite B é a medida preventiva mais efetiva em populações adultas com fatores de risco (NUNES et al.,2017). Assim, a adoção de programas de imunização universal tem promovido redução na prevalência da infecção pelo VHB (SANTOS et al.,2018), revelando que medidas de controle da infecção vêm sendo desenvolvidas, mas que é preciso intensificar a vacinação contra a hepatite B nos municípios (NUNES et al.,2017), já que observa-se alta prevalência de HBV no Brasil(Gráfico 3).

Segundo Brasil (2017) a doença é típica de adolescentes e adultos jovens, com predominância das transmissões sexual e parenteral, como em usuários de drogas injetáveis, pelo transplante de órgãos ou tecidos, por lesões de pele ou por picadas de agulha. No contexto geral, o Brasil é considerado um país de baixa prevalência de infecção pelo HBV, contudo os estados do Acre, Amazonas e Rondônia são considerados como regiões geográficas de alta prevalência (CRUZ et al.,2018).

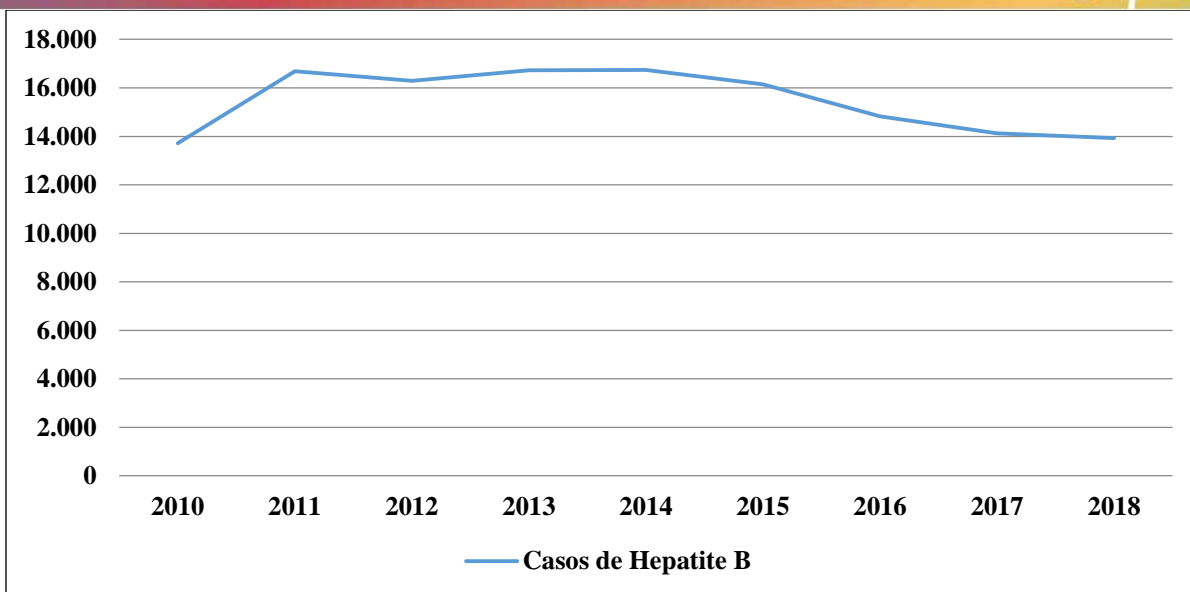


Gráfico 3- Casos de hepatite B pela taxa de incidência (por 100.000 habitantes) por ano de notificação, 2010-2018.

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos e Notificação - SINAN Net. Dados exportados em julho de 2020, sujeito às alterações.

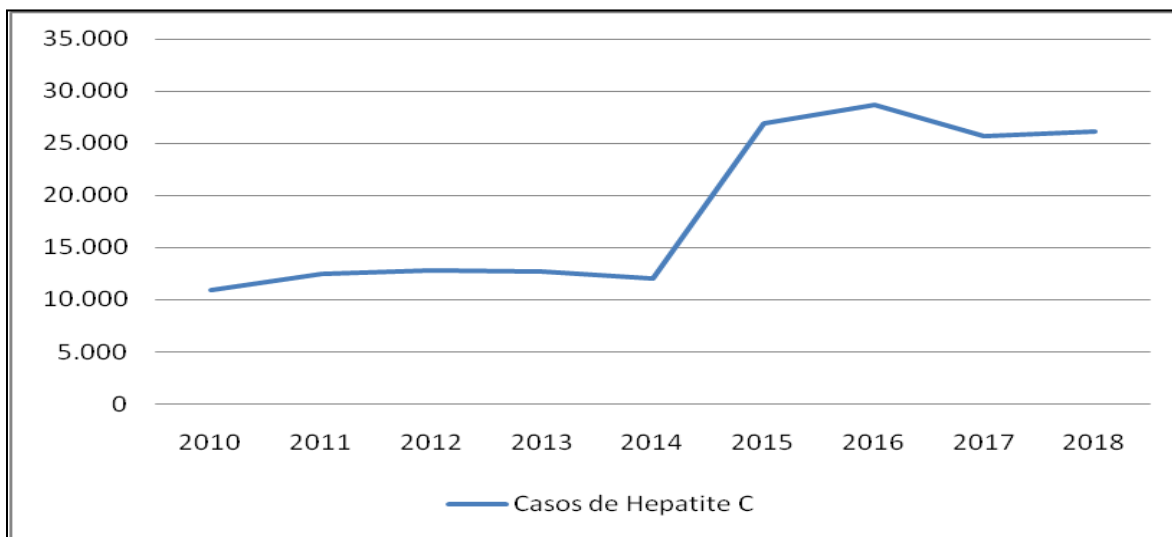


Gráfico 4- Casos de hepatite C pela taxa de incidência (por 100.000 habitantes) por ano de notificação, 2010-2018.

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos e Notificação - SINAN Net. Dados exportados em julho de 2020, sujeito às alterações.

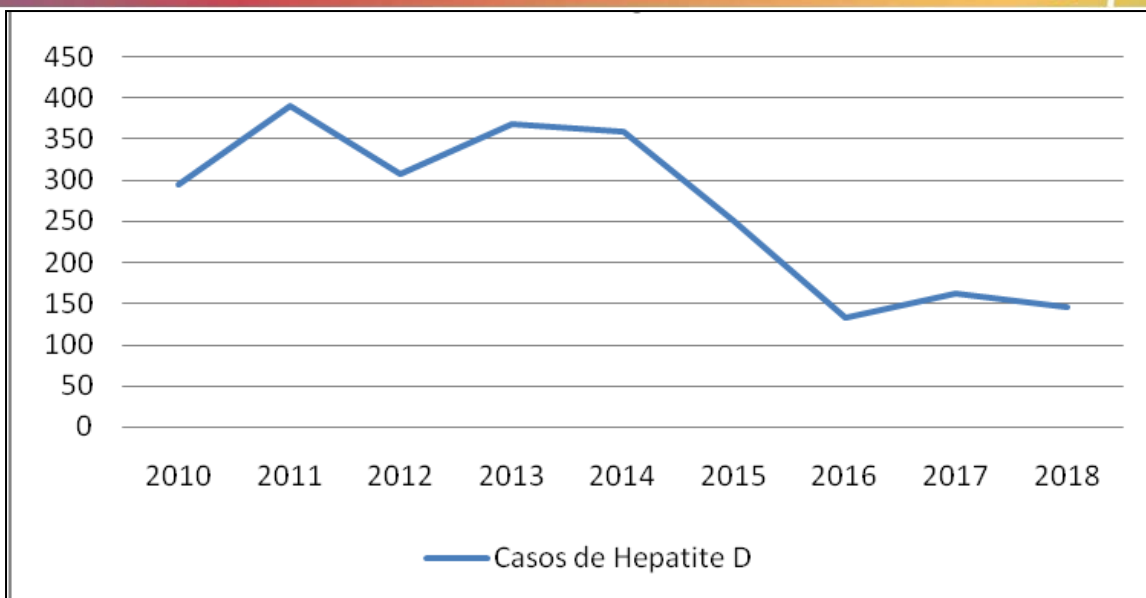


Gráfico 5- Casos de hepatite D pela taxa de incidência (por 100.000 habitantes) por ano de notificação, 2010-2018.

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos e Notificação - SINAN Net. Dados exportados em julho de 2020, sujeito às alterações.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2017), o Brasil é ainda considerado um País de endemicidade intermediária para hepatite C, com prevalência situada entre 2,5 e 10%. Estima-se ainda no País que existirem cerca de três milhões de portadores da doença que, em sua maioria, desconhecem seu estado, o que ajuda a perpetuar o ciclo de transmissão dessa infecção viral. Apesar da grande magnitude, disseminação e gravidade em termos de saúde pública, a hepatite C evoluiu como uma epidemia silenciosa (OLIVEIRA et al., 2020). Em virtude da detecção de infectados e portadores do VHC elevado nesse estudo, conforme visto no gráfico 4, está associada à inexistência de medidas de prevenção, como a vacina ou a imunoglobulina, testagem de indivíduos em situação de risco, tratamento dos infectados, atividades educativas e aprimoramento de medidas de prevenção da propagação da infecção (NUNES et al., 2017).

4. CONCLUSÃO

Assim, evidenciou-se a alta prevalência da hepatite C e D no Brasil no ano de 2010 a 2018. Neste sentido, este estudo contribui para alertar as autoridades de saúde sobre a importância do agravo e da necessidade de implementação de estratégias de enfrentamento, ao mesmo tempo em que estimula a realização de outros estudos para melhor compreensão da situação de hepatites no Brasil. Desse modo, espera-se que seja intensificada a educação permanente, principalmente com relação à intensificação de ações preventivas.

5. REFERÊNCIAS

- BANDEIRA, L. L. et al. Epidemiologia das hepatites virais por classificação etiológica. Rev.Soc.Bras.Clín. Med. out-dez;16(4):227-31,2018.
- BRASIL.GUIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE.Ministério da Saúde.Secretaria de vigilância em saúde.Brasília,2(1):2017.



CRUZ, A. S.; COPPINI, T. S. N.; CARLOTTO, M. S. Levantamento de dados entre o período de 2010 a 2016 de hepatite B no município de Rolim de Moura. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR*. 24(3):46-50, Set., Nov, 2018.

NUNES, H.M. et al. As hepatites virais: aspectos epidemiológicos, clínicos e de prevenção em municípios da Microrregião de Parauapebas, sudeste do estado do Pará, Brasil. *Rev. Pan-Amaz Saude*; 8(2):31-37, 2017.

OLIVEIRA, E, H et al, Aspectos clínicos e epidemiológicos dos casos de hepatite C no Estado do Maranhão, Brasil. *Research, Society and Development*, 9(7): e120973720, 2020.

OMS. Cúpula Mundial de Hepatites. Relatório Global sobre Hepatites, 2017: Declaração de São Paulo Sobre Hepatites, 2017.

SANTO, J. M. J. OLIVEIRA, F. M.; SANTOS, L. A. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde* 22(3):221-230 · April 2018.

QUEIROZ, D. A.; QUEIROZ, E. T.; QUEIROZ, M. C. T. Prevalência da Hepatite “A” nos Pacientes Atendidos no Laboratório de Análises Clínica do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal- Paraíba, de Janeiro à Julho de 2011. *Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento*. 07 (7): 142-178, Jul., 2018. ISSN:2448-0959.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Vigilância e Epidemiologia em Saúde

INDICADORES DE INTOXICAÇÕES POR MEDICAMENTOS: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS DOS CASOS NOTIFICADOS NA CIDADE DE TERESINA-PI

S. M. de ANDRADE¹, E. C. HOLANDA², E. P.FONTENELE² e W.O da COSTA³

¹ Faculdade Santo Agostinho, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia

² Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia;

³ Faculdade CHRISFAPI, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Enfermagem.

E-mail para contato: samia.andrade27@hotmail.com

RESUMO - *Introdução: Os medicamentos são ferramentas indispensáveis para prevenção, tratamento ou cura. No entanto, as intoxicações medicamentosas representam um grave problema de saúde pública. O objetivo deste estudo constituiu em avaliar as intoxicações por medicamentos na cidade de Teresina-PI de 2010 a 2017. Metodologia: Trata-se de um estudo descritivo, quantitativo e de base populacional, utilizando-se dados secundários, no qual foi realizada uma pesquisa epidemiológica dos casos por intoxicação por medicamentos notificados na cidade de Teresina-PI, entre os anos de 2010 a 2017, obtidos no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). As informações coletadas foram organizadas utilizando-se o programa Tabnet, os quais em seguida foram exportados e analisados no programa Microsoft Office e Excel 2019. Resultados e discussão: No período analisado foram notificados 1.732 casos, sendo prevalente a etnia parda (n=802; 46,3%), escolaridade com ensino médio completo (n=177; 10,2%) e 5º a 8º ano do ensino fundamental (n=189; 10,9%), faixa etária de 20-39 (41,6%; n=721) e sexo feminino (n=1227; 70,8%). Em relação à evolução clínica a aguda-crônica foram 1.072 casos (61,9%), e o critério de confirmação foi clínico (n=1125; 65%). A circunstância predominante foi tentativa de suicídio (n=1.131; 65,3%) e a evolução clínica foi cura sem sequelas (n=1.295; 74,7%). Notou-se um crescimento proporcional da notificação por agente tóxico/ano na micro região de saúde de Teresina correspondente a 45,1% (n=1.732). Conclusão: Constatou-se que na cidade de Teresina-PI ocorreu um aumento das notificações durante o período do estudo, esse fato pode ser atribuído ao crescente uso irracional e indiscriminado de medicamentos. Assim, diante dos dados apresentados fica clara a necessidade de intervenções educativas com a finalidade de informar sobre os riscos do uso indevido de medicamentos.*

Palavras-chave: Saúde pública; Epidemiologia; Envenenamento.

ABSTRACT - *Introduction: Medicines are indispensable tools for prevention, treatment or cure. However, drug intoxications represent a serious public health problem. The objective of this study*



was to evaluate drug intoxication in the city of Teresina-PI from 2010 to 2017. Methodology: This is a descriptive, quantitative and population-based study, using secondary data, in which a research was carried out epidemiological analysis of cases of drug poisoning reported in the city of Teresina-PI, between 2010 and 2017, obtained from the Notifiable Diseases Information System (SINAN). The information collected was organized using the Tabnet program, which then they were exported and analyzed using Microsoft Office and Excel 2019. Results and discussion: 1,732 cases were notified in the analyzed period, with brown ethnicity (n = 802; 46.3%), education with complete high school (n = 177; 10.2%) and 5th to 8th grade of elementary school (n = 189; 10.9%), age group 20-39 (41.6%; n = 721) and female (n = 1227; 70.8%). In relation to clinical evolution, acute-chronic were 1,072 cases (61.9%), and the confirmation criterion was clinical (n = 1125; 65%). The predominant circumstance was suicide attempt (n = 1,131; 65.3%) and the clinical evolution was cure without sequelae (n = 1,295; 74.7%). There was a proportional increase in the notification by toxic agent / year in the micro health region of Teresina corresponding to 45.1% (n = 1,732). Conclusion: It was found that in the city of Teresina-PI there was an increase in notifications during the study period, this fact can be attributed to the increasing irrational and indiscriminate use of medicines. in order to inform about the risks of drug misuse.

Keywords: Public health; Epidemiology; Poisoning.

1. INTRODUÇÃO

Medicamento é o produto farmacêutico preparado com finalidade profilática, curativa, paliativa, até mesmo para fins de diagnóstico. Entretanto, citam o medicamento como um dos principais agentes de intoxicações atendidos nas emergências médicas (GONÇALVES et al.,2017). As intoxicações medicamentosas ocorrem quando um medicamento é usado em doses acima daquelas preconizadas para profilaxia, diagnóstico, tratamento ou modificação de funções fisiológicas, de modo intencional ou não (MAIOR et al.,2017). Constitui-se por uma série de sintomas causados pela substância ingerida, inalada, injetada ou em contato com a pele, olhos ou membranas mucosas em doses acima das terapêuticas. Podem ser classificadas em agudas ou crônicas, onde cada droga apresenta suas particularidades num quadro de sinais e sintomas diferentes (GONÇALVES et al.,2017). Fato este que expõe os a uma das principais causas de morbidade e mortalidade (LEITE;MONTEIRO,2018).

O processo de intoxicação humana têm-se transformado num dos mais graves problemas de saúde pública devido à falta de controlo e prevenção associados à facilidade de acesso da população a um número crescente de substâncias com alto grau de toxicidade (AUGOSTO, 2010). No Brasil, estão disponíveis Centros de Informação e Assistência Toxicológica (CIATox) para orientar profissionais de saúde a assistir pessoas expostas ou intoxicadas. As informações recebidas pelos CIATox são compiladas pelo Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (Sinitox), de modo a compor uma base nacional sobre intoxicações (MAIOR et al.,2017). Dados do Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX) de 2009 mostram que 27,86% das intoxicações registradas no Brasil foram por medicamentos, contra 4,92% por agrotóxico doméstico. Em relação aos óbitos de intoxicação humana, verificou-se que os mais altos índices foram 41,22% por agrotóxicos de uso agrícola e 18,28% por medicamentos (LEITE; MONTEIRO, 2018). Já em 2013, 34,3% das notificações de intoxicações medicamentosas envolveram crianças menores de cinco anos, fazendo dessa faixa etária a mais envolvida em intoxicações (MAIOR et al.,2017).



Desta forma, a intoxicação ocasionada por medicamentos é considerada um problema de saúde pública (LEITE; MONTEIRO, 2018). Assim, a análise temporal dos dados secundários disponíveis e dos fatores associados aos eventos, pode vir a contribuir para o planejamento de programas e estratégias de intervenção, que visem à redução da morbidade e mortalidade por causas evitáveis. Em vista disso, o objetivo deste estudo constituiu em avaliar os níveis de intoxicação por medicamentos na cidade de Teresina-PI de 2010 a 2017.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo descritivo, quantitativo e de base populacional, utilizando-se dados secundários, no qual foi realizada uma pesquisa epidemiológica dos casos por intoxicação por medicamentos notificados na cidade de Teresina-PI, entre os anos de 2010 a 2017. Os dados foram coletados no site do DataSUS, a partir do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). As informações estão na seção de informação de saúde (TABNET), na opção epidemiologia e morbidades. Devido ao estudo ter utilizado somente dados secundários de domínio público disponibilizados pelo Ministério da Saúde através do DataSUS não houve necessidade de submeter essa pesquisa ao Comitê de Ética de acordo com a Resolução CNS 466/12. As variáveis estudadas foram às seguintes: sexo, etnia, escolaridade, faixa etária, evolução clínica, classificação final, circunstância, critério de confirmação e o município de residência no estado do Piauí. Os dados foram expostos em tabelas e gráficos e calculados através de frequências absolutas e percentuais, sendo processados nos programas Microsoft Office e Microsoft Excel 2019 e Tab para Windows (TabWin) versão 4.14.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

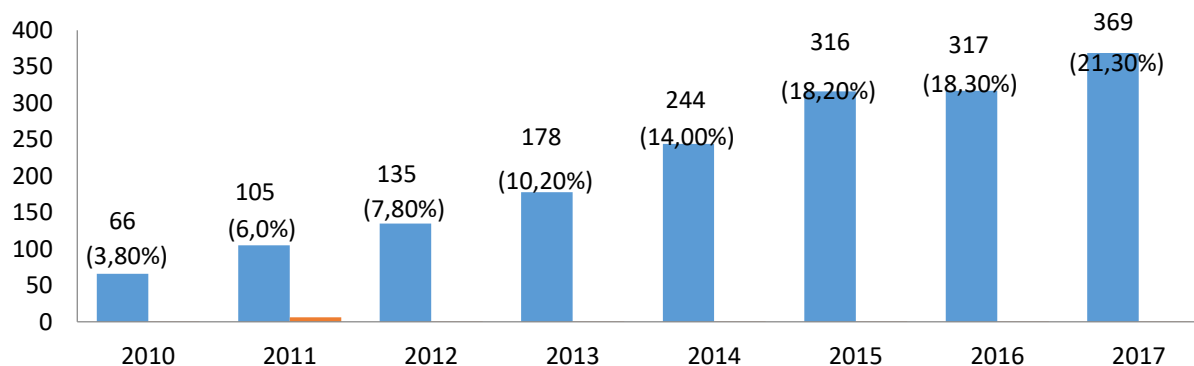


Figura 1- Notificações por Agente Tóxico-medicamento segundo Ano 1º Sintoma (s), no período de 2010-2017, na cidade de Teresina-Piauí.

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos e Notificação - SINAN Net. Dados exportados em julho de 2020, sujeito às alterações

O crescente processo de intoxicação humana têm se constituído em um dos mais graves problemas de saúde, devido à falta de estratégias de controle e prevenção das intoxicações, ao fácil acesso da população a um número elevado de substâncias com alto grau de toxicidade (LEITE; MONTEIRO, 2018). Cita-se também as técnicas de propaganda e marketing mais atraentes



estimulando a automedicação e o uso indiscriminado e inadequado de medicamentos prescritos e não prescritos. Com esse número crescente de casos há uma necessidade maior de fiscalização, programas de educação em saúde e de medidas preventivas (GONÇALVES et al.,2017).

Tabela 1- Distribuição das variáveis epidemiológicas referente ao Agente Tóxico-medicamento segundo Ano 1º Sintoma (s), no período de 2010-2017, na cidade de Teresina-Piauí

Variáveis	N	%
Gênero		
Masculino	505	29,2
Feminino	1227	70,8
Faixa etária		
Branco/Ignorado		
< de 1 ano	11	0,64
1-4	224	12,9
5-9	100	5,8
10-14	118	6,8
15-19	255	14,7
20-39	721	41,6
40-59	239	13,9
60-64	26	1,5
65-69	10	0,57
70-79	17	0,93
A partir de 80 anos	11	0,64
Escolaridade		
Ignorado/ Branco	587	33,8
Analfabeto	33	1,9
1ª a 4ª serie incompleto do EF	106	6,12
4ª serie completa do EF	32	1,8
5ª a 8ª serie incompleta do EF	189	10,9
Ensino fundamental completo	65	3,7
Ensino médio incompleto	141	8,1
Ensino médio completo	177	10,2
Educação superior incompleto	86	5,0
Educação superior completo	40	2,3
Não se aplica	285	16,5
Critério de confirmação		
Ignorado/Branco	48	2,77
Clinico - Laboratorial	22	1,27
Clinico- Epidemiológico	537	31,0
Clínico	1125	65,0

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos e Notificação - SINAN Net. Dados exportados em julho de 2020, sujeito às alterações

De acordo com a Tabela 1, resultados semelhantes foram obtidos por Leite; Monteiro (2018) no estudo da análise das intoxicações medicamentosas no estado da Paraíba no ano de 2017 com 383 casos de intoxicação por medicamentos, sendo mais da metade do gênero feminino (66%) e a população dos intoxicados foi constituída em sua maioria por adultos jovens (44%) com idade de 20-29 anos.

Neste estudo à escolaridade foi prevalente no ensino médio completo (n=177; 10,2%). De acordo com o IBGE (2014), ao avaliar os Indicadores e Dados Básicos (IDB) para a saúde, cerca de 13,1 % da população de Teresina-PI com 15 ou mais anos eram analfabetos. Inserido nessa realidade os resultados de intoxicação por medicamentos na população jovem do Rio Grande do Sul, 25,98% tinham o ensino fundamental incompleto e 21,7% Ensino médio completo (KLINGER



et al.,2016). Desse modo, deve-se destacar que a desinformação e o desconhecimento por parte da população sobre o uso correto de medicamentos pode acarretar risco de intoxicações relacionadas a medicamentos (OLIVEIRA; SUCHARA,2014).

Tendo como base os indicadores operacionais de vigilância, pôde-se observar ainda na Tabela 01 que no critério de confirmação 65% (n=1125) foram de diagnosticado clínico. Destaca-se, neste estudo, o baixo percentual de diagnóstico laboratorial (1,27%; n=22). Segundo Maestre et al.,(2016), o diagnóstico laboratorial, se faz necessário principalmente para se determinar o tratamento adequado e administração dos antídotos específicos, pois, uma intoxicação é um processo que ocorre após a exposição do indivíduo a um agente tóxico, que é evidenciado por dados laboratoriais (BRASIL,2018).

Tabela 02- Notificações de casos confirmados por agente tóxico-medicamento Ano 1º Sintoma (s), de evolução clínica dos pacientes(s) segundo tipo de exposição no período de 2010-2017, na cidade de Teresina-Piauí

Tipo de exposição	Ign/Branco	Aguda-única	Aguda-repetida	Crônica	Aguda sobre Crônica	Total
Evolução clínica	n	n	n	n	n	n(%)
Ignorado/Branco	133	196	49	2	8	388(22,4%)
Cura sem seqüela	238	857	195	5	0	1295(74,7%)
Cura com seqüela	4	1	3	0	0	8(0,46%)
Óbito por intoxicação exógena	5	11	2	0	1	19(1,09%)
Perda de seguimento	6	7	5	2	0	22(1,27%)
Total	388(22,4%)	1072(61,8%)	254(14,6%)	9(0,51%)	9(0,51%)	1732(100%)

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos e Notificação - SINAN Net. Dados exportados em julho de 2020, sujeito às alterações

Na Tabela 2, a cura sem seqüela destaca-se por representar a maioria de casos de intoxicações por medicamentos, com 1295 (74,7%). Estes dados corroboram com estudo realizado por Andrade et al., (2020) em que a cura sem seqüela representou o tipo de evolução das intoxicações mais frequentes, com 84,9%. Esse percentual evidencia de forma geral que os atendimentos hospitalares estão correspondendo às ocorrências adequadamente.

Brasil (2018) em estudo das intoxicações exógenas relacionadas ao trabalho no País, nos anos de 2007-2016, demonstrou que os principais tipos de exposição encontrados foram à exposição aguda- única (32.824; 76,7%) e a exposição aguda repetida (5.113 casos; 12,0% do



total). Assim, de acordo com a Tabela 2, quanto ao tipo de exposição, a maioria dos atendimentos decorreu de exposições aguda- única com 61,8%(n=1072) e aguda- repetida 14,6% (n=254). Isto é sinais e sintomas ocorrem em menos de 24 horas da exposição (MEDEIROS et al.,2014).

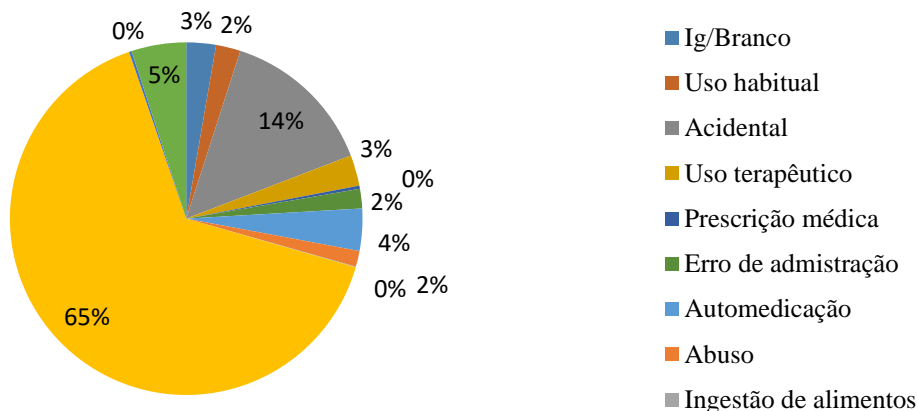


Figura 2- Notificações por agente tóxico-medicamento em relação a Circunstância no período de 2010-2017, na cidade de Teresina-Piauí
Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos e Notificação - SINAN Net. Dados exportados em julho de 2020, sujeito às alterações.

O suicídio, dentre os fatores, se destacou como a principal causa das intoxicações medicamentosas. Justificada pelo uso em altas doses e pelo uso irracional de medicamentos (GONÇALVES et al.,2017). Dados de 2014, do Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (Sinitox) da Fiocruz, vão de encontro com o desse estudo, onde registrou 7.509 tentativas de suicídio e 41 óbitos com uso de medicamentos (SILVA ,2019). Segundo Augusto (2010) os medicamentos que atuam no Sistema Nervoso Central representam a parcela mais significativa no total geral das intoxicações medicamentosas por suicídio assim, as situações mais frequentes ocorrem com ansiolíticos, sedativos e hipnóticos, sendo o sub-grupo de maior realce as benzodiazepinas, seguidos dos antidepressores e antipsicóticos.

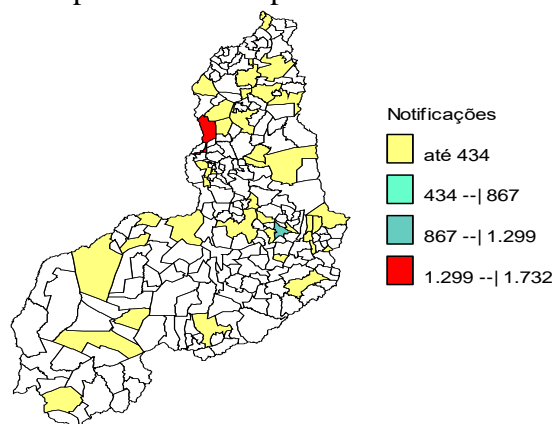


Figura 3- Casos notificados por Município de residência por intoxicações medicamentosa nos anos 2010 a 2017 na cidade de Teresina- Piauí. Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos e Notificação - SINAN Net. Dados exportados em julho de 2020, sujeito às alterações



Através da análise espacial georreferenciada o maior número de notificações ocorreu na cidade de Teresina (n=1731; 45,1%), seguido de Picos (n=931; 24,3%) e Parnaíba (n=392; 10,2%) (Figura 3). Nesse sentido, a alta taxa de prevalência nas grandes cidades no estado é um grande problema, que se deve pelo baixo nível de prevenção de estratégias para o controle e maior a prática de polifarmácia, na comunidade (SILVA; ALVAREZ; 2019). Enquanto que para Ribeiro; Spalding (2017) está associado ao escasso conhecimento da população aos efeitos colaterais, às interações medicamentosas, à posologia e à toxicidade dos fármacos, o que aumenta de forma significativa a incidência de intoxicações medicamentosas.

4. CONCLUSÃO

As intoxicações por medicamentos revelam-se um crescente problema à saúde pública como resultado do uso irracional e indiscriminado de 2010 a 2017. De acordo com o levantamento observou-se que os casos de intoxicação medicamentosa na cidade de Teresina-PI são maiores em mulheres jovens adultas de baixa escolaridade, com tentativa de suicídio, com evolução clínica a cura, com o critério de confirmação clínico e maior incidência na cidade de Teresina no estado do Piauí. Diante dos dados apresentado fica claro a necessidade de intervenções educativas com a finalidade de informar sobre os riscos do uso indevido de qualquer medicação. Os profissionais farmacêuticos têm um papel fundamental nesse processo, garantindo que os pacientes tenham informações relevantes quanto ao uso correto e seguro, riscos de reações adversas e dos perigos do consumo demasiado de qualquer medicamento.

5. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, S. M., CUNHA, M.A, HOLANDA, E. C., COUTINHO, G. S. L., VERDE, R. M. C. L. & OLIVEIRA, E. H. Characterization of the profile of drug intoxications by self-medication in Brazil, from 2010 to 2017. *Research, Society and Development*, 9(7):1-16, e236973952, 2020.
- AUGUSTO, S.S. D. Intoxicação medicamentosa: caracterização dos casos mortais. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Mar, 2010.
- BRASIL. Intoxicações exógenas relacionadas ao trabalho no Brasil, 2007-2016. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. *Boletim Epidemiológico*. 49 (58): Dez., 2018
- GONÇALVES, C. A.; SANTOS, V. A.; SARTURI, L.; JUNIOR, A. T. T.. Intoxicação medicamentosa: relacionada ao uso indiscriminado de medicamentos. *Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente*, 8 (1): 135-143, jan.-jun., 2017.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades@: Teresina [Internet]. Rio de Janeiro: IBGE; 2010. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pi/teresina/pesquisa/23/25124>. Acesso em: 15 de junho de 2020.
- KLINGER, E. I.; SCHMIDT, D.C.; LEMOS, D. B.; PASA, L.; POSSUELO, L. G. , VALIM, A. R. M.; Intoxicação exógena por medicamentos na população jovem do Rio Grande do Sul. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção*. 6 :2016.
- LEITE, M. M. S.; MONTEIRO, A. B. Análise das intoxicações medicamentosas no estado da Paraíba-Brasil em 2017. *Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management*, 14(2): abr/jun2018. ISSN 1983-4209.
- MAIOR, M. C. L. S., CASTRO, C. G. S. O., ANDRADE, C. L. T., Interações por intoxicações medicamentosas em crianças menores de cinco anos no Brasil, 2003-2012. *Epidemiol. Serv. Saude*, Brasília, 26(4): 771-782, out. - dez. 2017.



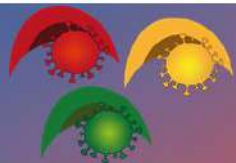
MEDEIROS, M. N. C.; MEDEIROS, M. C.; SILVA, M. B. A. Intoxicação aguda por agrotóxicos anticolinesterásicos na cidade do Recife, Pernambuco, 2007-2010. *Epidemiol. Serv. Saúde*, Brasília, 23(3): 509-518, jul-set 2014.

OLIVEIRA, F. F. S.; SUCHARA, A. E. Perfil epidemiológico das intoxicações exógenas em crianças e adolescentes em município do Mato Grosso. *Rev. paul. pediatr.* 32 (4): São Paulo Dec. 2014.

RIBEIRO, J. F., SPALDING, S. M. Estudo da intoxicação medicamentosa no Brasil: Panorama obtido a partir da plataforma SINITOX. Tese (TCC). Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2017.

SILVA, J. S. Intoxicação medicamentosa por motivação suicida no Brasil: um desafio da saúde pública. *Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento*. 04(07) :163-174. Set., 2019. ISSN: 2448-0959.

SILVA, E. R., ÁLVARES, A. C. M. Intoxicação medicamentosa relacionada à tentativa de autoextermínio. *Rev Inic Cient Ext.*, 2(2): 102-8, 2019.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Vigilância e Epidemiologia em Saúde

MONITORAMENTO DO PERFIL DE PROFILAXIA PÓS-EXPOSIÇÃO (PEP) - HIV NO BRASIL

E. P. FONTENELE¹; E. C. HOLANDA¹ e S. M. de ANDRADE²

¹ Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia;

² Centro Universitário Santo Agostinho, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia.

E-mail para contato: eriicarla@hotmail.com

RESUMO - Introdução: O surgimento de novos métodos preventivos eficazes revigora a prevenção da infecção pelo HIV e potencializa a atenção a diversas situações de vulnerabilidade e risco que as pessoas vivenciam. Assim, a profilaxia pós-exposição sexual (PEP) tem sido considerada estratégica e promissora no controle da epidemia de HIV globalmente. Esse trabalho tem como objetivo monitoramento da profilaxia pós-exposição (PEP) -HIV no Brasil. **Metodologia:** Trata-se de um estudo observacional descritivo retrospectivo, analisando a profilaxia pós-exposição (PEP) -HIV no Brasil, no período de 2009 a 2019, por meio de informações contidas no Ministério da Saúde, no departamento de Doenças de Condições Crônicas e de Infecções Sexualmente Transmissível. **Resultados e Discussão:** Durante o período do estudo foram registrados 603499 casos PEP-HIV no Brasil. Em 2010, foi registrado o menor número de casos novos (2,5%; 15540), e em 2019, o maior (23%; 138019) e apontam um crescente na frequência de casos de 2009 até 2019. A maioria eram mulheres trans (21%) e homens hétero (18%). Na faixa etária predominante de 25 a 39 anos (52%) e de 15 a 24 anos (27%). Houve um aumento no PEP sexual consentida e uma diminuição de acidente ocupacional. **Conclusões:** Há a necessidade de fortalecer a oferta de ações de prevenção do HIV no Brasil que procuram atenção à saúde na vigência do diagnóstico dessa doença.

Palavras-chave: Infecções por HIV; Doenças Sexualmente Transmissíveis; Prevenção de doenças; Vulnerabilidade.

ABSTRACT- Introduction: The emergence of new effective preventive methods invigorates the prevention of HIV infection and enhances the attention to various situations of vulnerability and risk that people experience. Thus, post-sexual exposure prophylaxis (PEP) has been considered strategic and promising in the control of the HIV epidemic globally. This work aims to monitor post-exposure prophylaxis (PEP) -HIV in Brazil. **Methodology:** This is a retrospective descriptive observational study, analyzing post-exposure prophylaxis (PEP) -HIV in Brazil, in the period from 2009 to 2019, through information contained in the Ministry of Health, in the Department of Diseases of Chronic Conditions and Sexually Transmitted Infections. **Results and Discussion:**



During the study period, 603499 PEP-HIV cases were registered in Brazil. In 2010, the lowest number of new cases was recorded (2.5%; 15540), and in 2019, the highest (23%; 138019) and point to an increase in the frequency of cases from 2009 to 2019. The majority were trans women (21%) and straight men (18%), in the predominant age group of 25 to 39 years old (52%) and 15 to 24 years old (27%). There was an increase in the consenting sexual PEP and a decrease in occupational accidents. Conclusions: There is a need to strengthen the offer of HIV prevention actions in Brazil that seek health care during the diagnosis of this disease.

Keywords: HIV infections, Sexually Transmitted Diseases; Prevention of diseases; Vulnerability.

1. INTRODUÇÃO

Segundo Carvalho; Fé (2019) existe hoje no Brasil cerca de 630 mil pessoas vivendo com o HIV, e que dentre estas, cerca de 255 mil nunca teriam feito um teste de diagnóstico e, por isso, não conhecem sua sorologia. Diante disso, a profilaxia pós-exposição sexual (PEP) está no centro do debate sobre as novas possibilidades de prevenção do HIV, aumentando o otimismo acerca do controle da doença (ZUCCHI et al., 2018). A profilaxia pós-exposição sexual (PEP), visa à proteção à pessoa que acidentalmente obteve contato com o vírus, para que seja efetivo, faz-se necessário à adesão ao tratamento por vinte e oito dias, tão logo iniciar a terapêutica (CARVALHO; FÉ, 2019).

Assim, um PEP deve ser iniciado o mais precocemente possível, idealmente nas primeiras duas horas após exposição e, no máximo, até 72 horas. As primeiras medidas a serem tomadas incluir a determinação do status sorológico da pessoa potencialmente exposta (SCHECHTER, 2016). Fato que essa estratégia se mostrou eficaz e segura em pessoas com risco aumentado de adquirir a infecção (BRASIL, 2018). No entanto, apesar da disponibilidade da terapia, o tratamento ainda apresenta um grande desafio (CARVALHO; FÉ, 2019). Diante disso, este trabalho teve o objetivo de monitorar a profilaxia pós-exposição (PEP) HIV no Brasil de 2009-2019.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo descritivo, quantitativo e de base populacional, utilizando-se dados secundários, no qual foi realizada uma pesquisa epidemiológica dos casos de profilaxia pós-exposição (PEP) por HIV no Brasil notificados entre os anos de 2009 a 2019. Os dados foram coletados no site do Ministério da Saúde, a partir do Departamento de Doenças de Condições Crônicas e de Infecções Sexualmente Transmissíveis. As informações estão na seção do Painel PEP. Devido ao estudo ter utilizado somente dados secundários de domínio público disponibilizados pelo Ministério da Saúde através do DataSUS não houve necessidade de submeter essa pesquisa ao Comitê de Ética de acordo com a Resolução CNS 466/12.

A pesquisa bibliográfica foi realizada em bases de dados do Scientific Electronic Library Online (SCIELO), na Literatura Latino Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS) e através do Portal de Pesquisa da BVS, somente entre os anos de 2010 e 2020. Como descritores foram utilizados: Infecções por HIV; Doenças Sexualmente Transmissíveis e PEP-HIV.

As variáveis estudadas foram às seguintes: dispensações por ano, faixa-etária, populações e tipo de exposição. Os dados foram expostos em tabelas e gráficos e calculados através de frequências absolutas e percentuais, sendo processados nos programas Microsoft Office e Microsoft Excel 2019 e Tab para Windows (TabWin) versão 4.14.



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

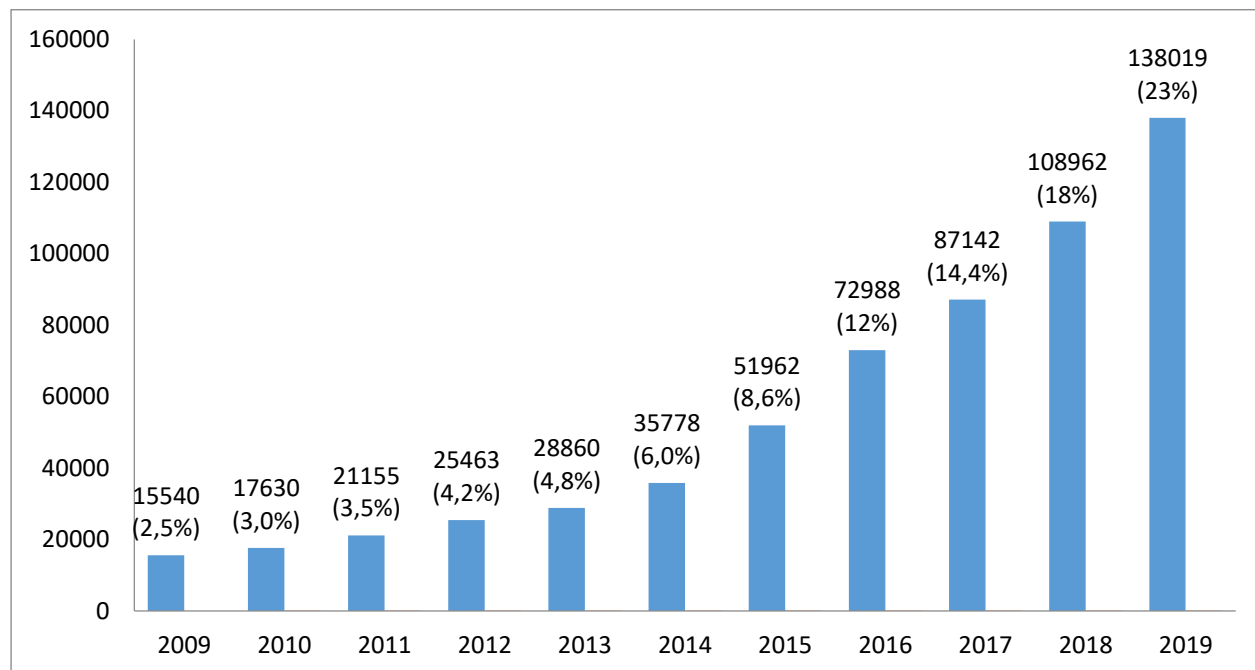


Figura 1: Distribuição por ano das dispensações de Profilaxia Pós-Exposição (PEP) no Brasil de 2009-2019

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravose Notificação - SINAN Net. Dados exportados em julho de 2020, sujeito à alteração.

Nota-se na Figura 1 que houve um aumento proporcional do número de casos notificados de PEP-HIV no Brasil no período de 2009 a 2019. Esses resultados acompanham a tendência mundial. Globalmente os casos dessa doença eram de 36,7 milhões em 2016. E a cada ano esse número vem crescendo um total de 1,8 milhões de novos casos a cada ano e as mortes relacionadas à AIDS passam de 1,0 milhão (CARVALHO; FÉ, 2019). Entretanto, segundo Schechter (2016) em nível populacional, usuários de PEP-HIV tendem a relatar comportamentos continuados de risco com mais frequência, sendo, portanto, potenciais candidatos ao uso de profilaxia pós-exposição (PEP), além de aconselhamento de outras intervenções comportamentais. Desse modo, esses dados são preocupantes e remete a procurar soluções para tentar diminuir esses números que só tem a crescer (CARVALHO; FÉ, 2019).

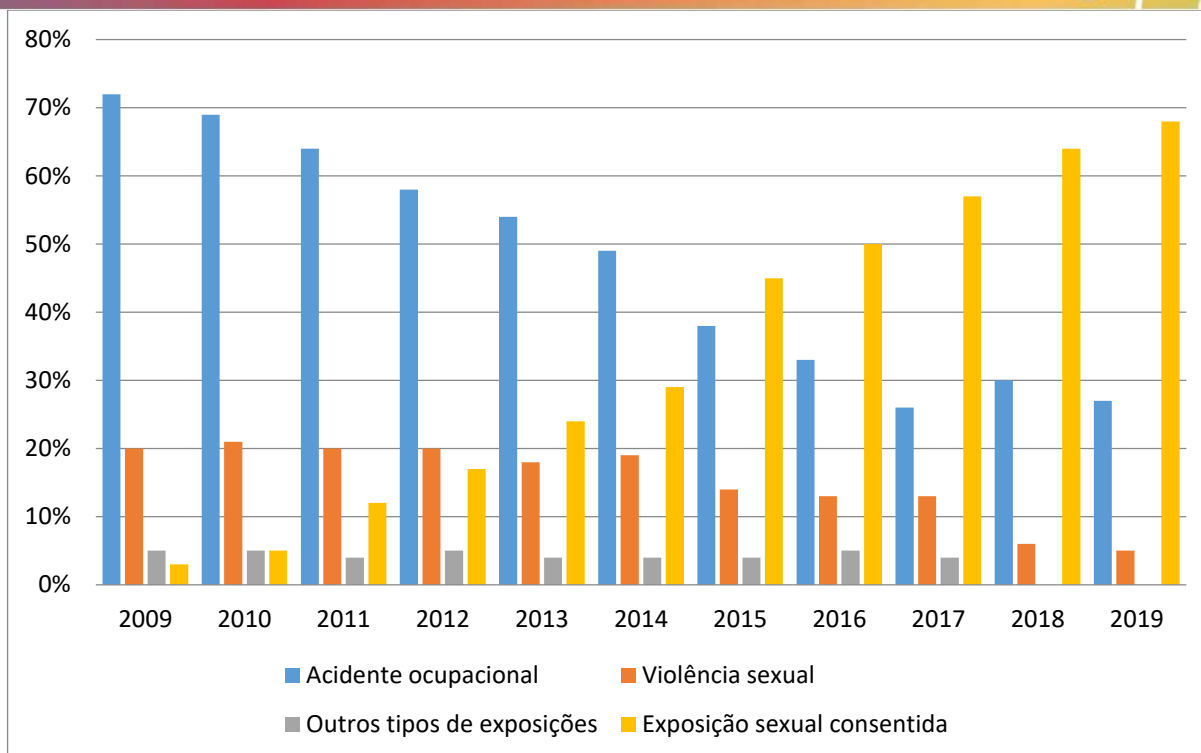


Figura 2: Distribuição por ano das dispensações de Profilaxia Pós-Exposição segundo o tipo de exposição no Brasil de 2009-2019.

Fonte: Ministério da Saúde/SVS -Sistema de Informação de Agravos e Notificação -SINAN Net. Dados exportados em julho de 2020, sujeito à alteração.

O principal motivo pela procura da PEP sexual consentida está associado ao rompimento, soltura ou outras falhas no uso do preservativo e da relação sexual desprotegida. Portanto, o tempo decorrido de até o limite de 72 horas da exposição até a busca pelo serviço, sinalizam para um possível conhecimento quanto ao prazo máximo de 72 horas pelas pessoas que buscam este tipo de atendimento e até mesmo quanto à importância da precocidade da iniciação da PEP sexual consentida (LIZA,2019).

O HIV/AIDS é um grave problema de saúde pública custando a vida de muitas pessoas, incluindo a saúde de cuidadores. Globalmente, são 194 possíveis casos de infectados com HIV ocupacionalmente e o risco estimado de transmissão é de 0,3% após lesão por picada de agulha e 0,09% após exposição à membrana mucosa a esse grupo. Porém, nesse estudo, observou-se uma redução gradual das notificações por acidentes ocupacionais no Brasil. Para Merchant et al., (2004) o uso de zidovudina há uma redução de 81% nas chances de risco de soroconversão do HIV entre os profissionais de saúde que sofreram infecção acidental (LAMICHANNE et al.,2012).



■ 60 ou mais ■ 40 a 59 ■ 25 a 39 ■ 15 a 24 ■ 0 a 14

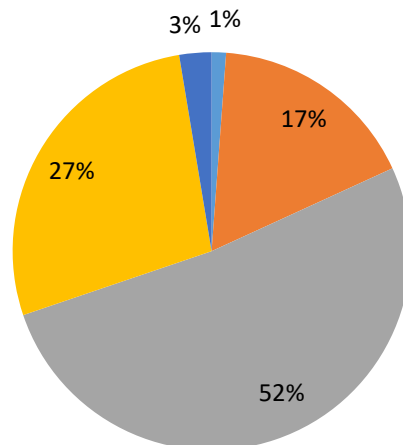


Figura 3: Distribuição das dispensações de Profilaxia Pós-Exposição segundo a faixa etária no Brasil de 2009-2019.

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos e Notificação - SINAN Net. Dados exportados em julho de 2020, sujeito à alteração.

■ Branco ■ Mulheres cis ■ Homem cis hetero ■ Gays e outros HSH ■ Mulher Tras ■ Homem Trans ■ Travesti

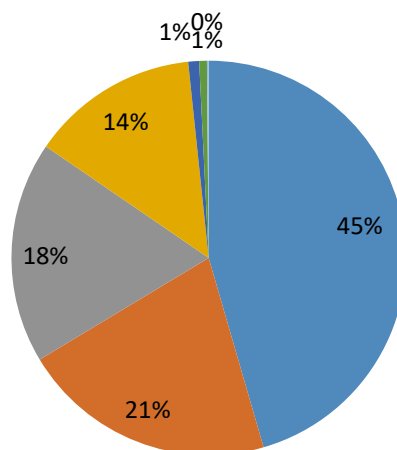


Figura 4: Distribuição das dispensações de Profilaxia Pós-Exposição segundo populações no Brasil de 2009-2019.

Legenda: HSH- homens que fazem sexo com homens.

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos e Notificação - SINAN Net. Dados exportados em julho de 2020, sujeito à alteração.

No Brasil, a prevalência da infecção pelo HIV, na população geral, encontra-se em 0,4%, enquanto alguns segmentos populacionais demonstram prevalências de HIV mais elevadas



(BRASIL,2018. Esses subgrupos populacionais são nesse estudo mulheres trans (21%), homens hétero (18%) gays e outros HSH (14%) e na faixa etária predominante de 25 a 39 anos(52%) e de 15 a 24 anos(27%),conforme a Figura 3 e 4.Estes segmentos populacionais, devido a vulnerabilidades específicas, estão sob maior risco de se infectar pelo HIV, em diferentes contextos sociais e tipos de epidemia. Essas populações, por estarem sob maior risco, devem ser alvo prioritário para o uso de PEP(BRASIL,2018).

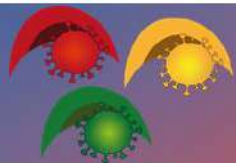
Conforme Liza(2019) os adolescentes estão em risco de HIV soroconversão porque se deve a agregações sexuais.Resultados semelhantes ao que ocorre nos Estados Unidos que cerca de 25% das agressões sexuais relatadasocorrem em adolescentes com menos de 18 anos de idade (MERCHANT et al.,2004). Enquanto que em mulheres cis a maioria da assistência profilática pela PEP está associada à maior ocorrência de exposições por violência sexual. A procura pela profilaxia, neste caso, pode estar associada a um risco explícito e, portanto, mais fácil de ser reconhecido e justificado pelas mulheres, em detrimento a uma possível vulnerabilidade por relações sexuais consentidas (LIZA, 2019).

4. CONCLUSÃO

Os resultados desta investigação apontam para a necessidade de fortalecer a oferta de ações de prevenção do HIV no Brasil que procuram atenção à saúde na vigência do diagnóstico dessa doença. As diversas estratégias de prevenção disponíveis devem ser ofertadas de acordo com as exposições e vulnerabilidades da população, de forma articulada. Entre essas estratégias, destacam-se as comportamentais (distribuição de preservativos), educacionais (aconselhamento) e biomédicas (terapia com antirretrovirais pré [PrEP] e pós-exposição [PEP] ao HIV).

5. REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Profilaxia Pré-Exposição (PrEP) de Risco à Infecção pelo HIV. Brasília, 2018.
- CARVALHO, I. SOUZA; MOURA FÉ, L. A. M. Projeto de intervenção para ampliar o acesso da população a profilaxia pós-exposição - PEP ao HIV em município do Piauí. Disponível em: <https://ares.unasus.gov.br/acervo/handle/ARES/13832>. Acessado em 05/07 de 2020.
- LAMICHANNE, J. et al. Knowledge of Nurses on Post Exposure Prophylaxis of HIV in Medical Colleges of Chitwan District, Nepal. JPBA, 3(6): nov. - Dec., 2012.
- LIZA, P. H. Profilaxia Pós-exposição sexual para HIV: uma análise retrospectiva sobre a adesão e seguimento das pessoas assistidas. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação da Escola de Enfermagem. UFMG. Belo Horizonte, 2019.
- MERCHANT, R. C.; KESHAVARZ, C. L. HIV post-exposure prophylaxis provided at an urban paediatric emergency department to female adolescents after sexual assault. Emerg Med J., 21:449-451,2004.
- ZUCCHI, E. M., et al., Da evidência à ação: desafios do Sistema Único de Saúde para ofertar a profilaxia pré-exposição sexual (PrEP) ao HIV às pessoas em maior vulnerabilidade. Cad. Saúde Pública; 34(7): e00206617,2018.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Vigilância Epidemiológica em Saúde

PANORAMA ATUAL DA SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (AIDS) NO BRASIL: ESTUDO DO PERFIL EPIDEMIOLÓGICO E NOVAS TENDÊNCIAS NA TERAPIA ANTIRRETROVIRAL

B. K. L. de PAULA¹, G. de A. SOUZA¹ e C. H. da S. MENDES¹

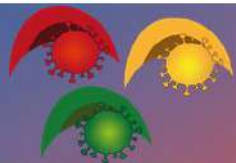
¹ Centro Universitário Joaquim Nabuco- *Campus* Paulista;

E-mail para contato: brunakristyer@gmail.com

RESUMO – Atualmente estima-se que existam 866 mil portadores do HIV no Brasil e uma média anual de 39 mil novos casos nos últimos cinco anos. Mesmo com avanços na prevenção, diagnóstico e terapia, a AIDS continua sendo um desafio global. Esse estudo visa analisar os casos notificados de AIDS no Brasil em 2018 para melhor esclarecimento do perfil epidemiológico, além de apresentar novas tendências na terapia antirretroviral. As buscas de artigos científicos foram realizadas no ScienceDirect e Google Acadêmico. Para a análise do perfil epidemiológico, dados quantitativos foram obtidos por meio da plataforma de dados do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde. O gênero mais acometido foi o masculino (70.04%) e a faixa etária foi a de 30 a 39 anos (29.83%). Na categoria de exposição, os heterossexuais se sobressaíram (50.95%). A região Sudeste (37.78%) e o estado de São Paulo (18,40%) alcançaram o maior número de notificações de casos. Cerca de 29,54% dos casos registrados evoluíram para morte, sendo a maioria na região Sudeste. Apesar de haver um grande avanço nas pesquisas, ainda não se encontrou um medicamento eficaz para tratar o HIV de forma a reduzir completamente a carga viral. É de extrema importância o desenvolvimento de ações de conscientização e divulgação e sistematização de dados referentes ao HIV, com o intuito de alertar a sociedade para a seriedade que essa enfermidade possui e, dessa forma, minimizar o número de casos dessa doença.

Palavras-chave: *Viroses; Epidemiologia, Antivirais.*

ABSTRACT – Currently, it is estimated that there are 866 thousand HIV carriers in Brazil and an annual average of 39 thousand new cases in the last five years. Despite advances in prevention, diagnosis, and therapy, AIDS remains a global challenge. This study aims to analyze the notified cases of AIDS in Brazil in 2018 to better clarify the epidemiological profile, in addition to presenting new trends in antiretroviral therapy. Searches for scientific articles were conducted on ScienceDirect and Google Scholar. For the analysis of the epidemiological profile, quantitative data were obtained through the data platform of the Department of Informatics of the Unified Health System. The most affected gender was male (70.04%) and the age group was 30 to 39 years



old (29.83%). In the exposure category, heterosexuals stood out (50.95%). The Southeast region (37.78%) and the state of São Paulo (18.40%) reached the highest number of case reports. Approximately 29.54% of registered cases evolved to death, most of them in the Southeast region. Although there has been a breakthrough in research, an effective drug to treat HIV has not yet been found to completely reduce viral load. It is extremely important to develop actions to raise awareness and disseminate and systematize data related to HIV, to alert society to the seriousness that this disease has and, thus, minimize the number of cases of this disease.

Keywords - Viruses; Epidemiology; Antivirals.

1. INTRODUÇÃO

Nos dias atuais, a epidemia da AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) no Brasil é considerada estabilizada. Estima-se que existam 866 mil portadores do vírus HIV no Brasil (Brasil, 2019 a). Em 2017 foram diagnosticados 42.420 novos casos de pessoas portadoras do HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) e 37.791 casos de pessoas portadoras do HIV que desenvolveram a AIDS. A taxa de detecção dessa síndrome vem diminuindo no Brasil nos últimos tempos, com redução de 9,4% entre 2007 e 2017, passando de 20,2 casos/100 mil habitantes para 18,3 casos/100 mil habitantes no período (Brasil, 2019 a).

O país tem registrado, anualmente, uma média de 39 mil novos casos da doença nos últimos cinco anos. O número passou a reduzir desde 2013, quando atingiu 42.934 casos; em 2018, foram registrados 37.161 (Brasil, 2019 b). Entretanto, estatísticas da UNAIDS (2019) apontam que mundialmente, cerca de 6.000 jovens mulheres entre 15 e 24 anos são infectadas pelo HIV semanalmente e estima que serão necessários investir US\$ 26,2 bilhões para a resposta à AIDS em 2020.

É evidente que o binômio HIV/AIDS, mesmo após avanços nas medidas de prevenção primária e secundária, criação dos Centros de Testagem e Aconselhamento (CTA) para diagnóstico precoce da infecção e terapia antirretroviral sendo fornecida gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS), permanece sendo uma relevante preocupação para a saúde pública numa escala mundial (Trindade et al., 2019).

À vista disso, o objetivo deste estudo é analisar sistematicamente os novos casos notificados de HIV/AIDS no Brasil durante o ano de 2018, para um melhor esclarecimento do perfil epidemiológico da síndrome à nível nacional, além de apresentar as novas tendências no tratamento. O trabalho em questão servirá como um grande subsídio para profissionais da área de saúde, podendo contribuir fortemente no desenvolvimento de novas estratégias de ações e políticas públicas para promoção e prevenção de saúde, tendo um papel importante na diminuição de estatísticas referentes a essa problemática.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Realizou-se um estudo exploratório/descritivo utilizando como bases de dados o ScienceDirect e Google Acadêmico onde foram realizadas buscas por artigos na língua portuguesa e inglesa, com o propósito de encontrar na literatura atual, pesquisas referentes aos tratamentos modernos do HIV/AIDS. Para a análise do perfil epidemiológico da AIDS no Brasil, dados quantitativos foram obtidos por meio de consulta às seguintes bases de dados: SINAN (Sistema de Informações de Agravos de Notificação), SISCEL (Sistema de Controle de Exames Laboratoriais da Rede Nacional de Contagem Linfócitos CD4+/CD8 e Carga Viral), SIM (Sistema de



Informações de Mortalidade) e boletim epidemiológico disponibilizados pelo Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), vinculado ao Ministério da Saúde. Para evitar erros de retardo de notificação, optou-se por analisar os dados do período de 2018, último ano em que constavam os dados completos. Avaliando-se as seguintes variáveis: Sexo, Região de residência, UF de residência, Faixa etária, Categoria de exposição hierarquizada e Óbitos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das pesquisas, foram encontrados um total de 37.161 novos casos de AIDS no Brasil durante o período de 2018. Considerando o gênero como maior número de notificações, o masculino correspondeu a 70.04% dos casos registrados e o feminino 29.95% conforme mostra a Figura 1. De acordo com Brasil (2019 b) em 2018, a detecção de AIDS entre homens foi de 25,2 casos a cada 100.000 habitantes, enquanto entre as mulheres 10,5 casos a cada 100.000 habitantes, com relação às mulheres, constatou-se uma tendência de queda dessa taxa nos últimos dez anos, representando uma redução de 38,2%.

Casos de HIV por sexo (2018)

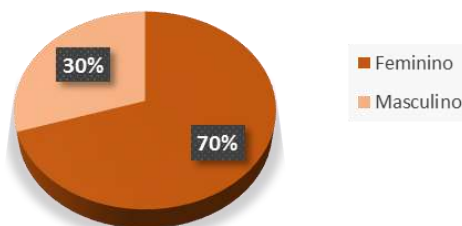


Figura 1 – Número de casos de AIDS notificados no Sinan, declarados no SIM e registrados no Siscel por sexo, segundo ano de diagnóstico. Brasil, 2018.

A faixa etária que mais obteve destaque foi de 30 a 39 anos, que representou 29.83%, seguida 20 a 29 anos (25.32%) e 40 a 49 anos (22.28%), os indivíduos de <5 a 12 anos corresponderam a minoria dos casos (1.09%), seguida os de 13 a 19 anos (2.19%) e 50 anos ou mais (12.95%) como mostra a Figura 2. Segundo o estudo de Menezes et al., (2018) Verificou-se uma predominância em infectados do sexo masculino com 46,0% dos casos, a respeito à faixa etária, as infecções predominaram entre indivíduos com 30 a 39 anos de idade, sendo expresso em 26,4% casos.

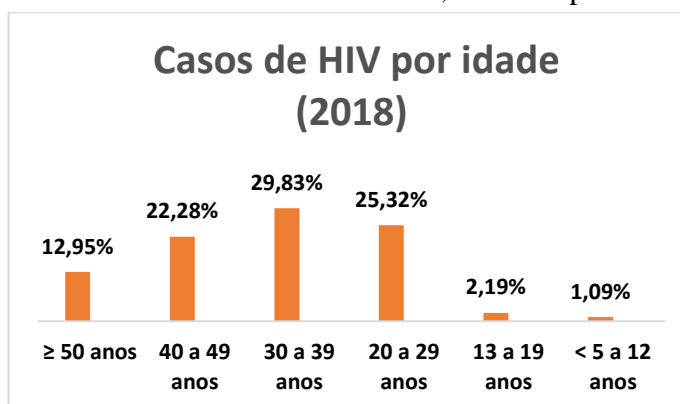




Figura 2 – Número de casos de AIDS notificados no Sinan, declarados no SIM e registrados no Siscel, segundo faixa etária por ano de diagnóstico. Brasil, 2018.

Sistematizando os casos por região do Brasil, as regiões com o maior número de residentes portadores da síndrome foram: Sudeste (37.78%); Nordeste (24.18%); Sul (18.15%); Norte (12,28%) e Centro-Oeste (7.49%). Quanto aos estados que mais se sobressaíram: São Paulo (18.40%); Rio de Janeiro (11.04%); Rio Grande do Sul (8.29%) e Minas Gerais (6.56%) e os que alcançaram os menores números foram: Acre (0.285); Amapá (0.60%); Tocantins (0.62%) e Roraima (0.63%) esses resultados são apresentados na tabela 1.

Em Brasil (2019 b) foi exposto que nos últimos quatro anos (2014 a 2018), a região Norte apresentou uma média de 4,4 mil casos ao ano; o Nordeste, 8,9 mil; o Sudeste, 15,4 mil; o Sul, 7,7 mil; e o Centro-Oeste, 2,8 mil. Observou-se também um declínio na taxa de detecção de AIDS entre os anos de 2008 e 2018 em 11 UFs: Rio Grande do Sul (39,3%), Paraná (36,6%), São Paulo (34,8%), Santa Catarina (29,1%), Distrito Federal (25,8%), Minas Gerais (25,2%), Espírito Santo (24,0%), Rio de Janeiro (23,9%), Rondônia (6,1%), Mato Grosso (6,1%) e Mato Grosso do Sul (3,8%).

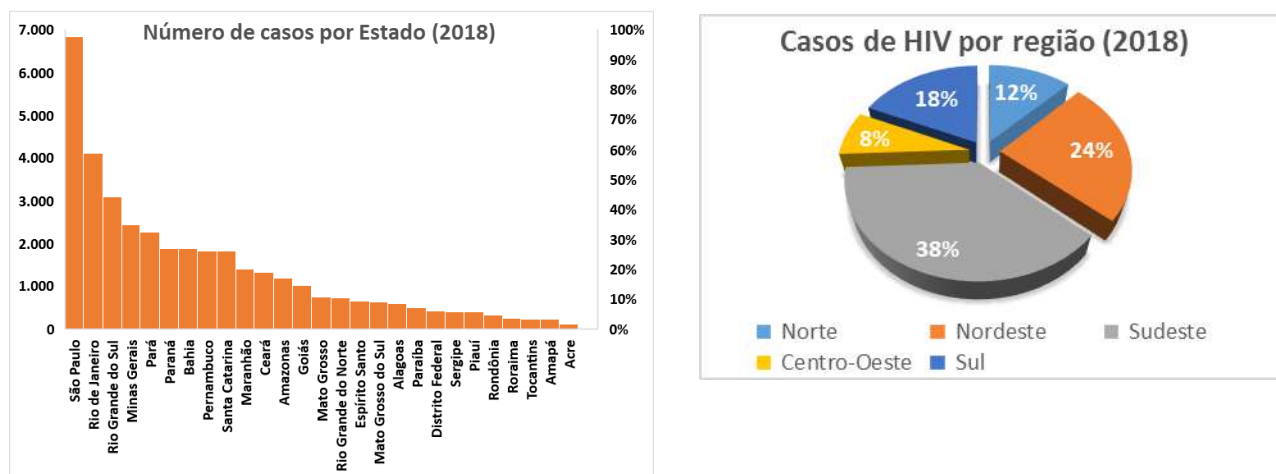


Figura 3 - Casos de AIDS notificados no Sinan, declarados no SIM e registrados no Siscel, segundo UF e região de residência por ano de diagnóstico, Brasil 2018

Os dados evidenciados na tabela 1, que apresenta as categorias de exposição hierarquizada, revelam que dos 19.940 casos analisados, os indivíduos heterossexuais foram os que possuíram uma maior eminência nos casos, representando 50.95%, em seguida os homossexuais (23.90%). Acidentes com material biológico (0.01%) e transfusão (0.03%) conseguiram a menor porcentagem de contaminação. Os trabalhos de Trindade *et al.*, (2019) mostraram em seu estudo que a modalidade de exposição mais acometida foi do tipo heterossexual, com total de 253 casos, em menor número, os usuários de drogas injetáveis com (4,4%) e por transmissão vertical com (2,5%).

Cerca de 29.54% dos casos de AIDS registrados no ano de 2018 evoluíram para óbito, sendo a região Sudeste (41.09%) região Nordeste (21.97%); região Sul (19.07%); região Norte (11.01%) e região Centro-Oeste (6.84%) indicado na tabela 3. De acordo com Brasil (2019b) desde o início



da epidemia de aids (1980) até 31 de dezembro de 2018, 338.905 óbitos tendo o HIV/aids como causa básica foram notificados no país, os maiores destaques desses óbitos ocorreu na região Sudeste (58,3%), seguida das regiões Sul (17,7%), Nordeste (13,6%), Centro-Oeste (5,3%) e Norte (5,1%).

Com a criação e progresso dos antirretrovirais para tratar o HIV, o que antes era uma infecção quase sempre fatal se tornou uma condição crônica controlável, embora ainda incurável (GALVEZ et al, 2020).

Tabela 1 - Número de casos de AIDS notificados no Sinan, segundo categoria de exposição hierarquizada, por ano de diagnóstico, Brasil 2018

Cat. Exposição Hierárquica	Frequência
Homossexual	4.766
Bissexual	1.119
Heterossexual	10.161
UDI	495
Hemofílico	7
Transfusão	6
Acidente com material biológico	2
Transmissão vertical	290
Ignorado	3.173
TOTAL	19.940

A falta de sucesso dos fármacos modernos no que diz respeito à remissão total da carga viral, está associado ao fato da formação de reservatórios virais de difícil acesso os medicamentos onde uma pequena quantidade de vírus continua a infectar as células T CD4 e podem voltar a se replicar, caso haja a interrupção da Terapia Antirretroviral (Finzi et al., 1999). Nesse contexto, se faz necessário o desenvolvimento e aprimoramento das terapias antirretrovirais e principalmente galgar em busca da cura efetiva para os portadores do vírus.

Atualmente, existem 21 medicamentos em 37 apresentações farmacêuticas (Brasil, 2020). Sendo o Dolutegravir, o fármaco de primeira escolha recomendado pelo Ministério da Saúde para a substituição de terapias antirretrovirais em situações que haja vantagens relativas a eventos adversos atenuados, melhoria da adesão da pessoa, diminuição de interações medicamentosas ou possibilidade de uso em determinadas comorbidades em relação ao seu esquema atual de Terapia antirretroviral (Brasil, 2018).

Vários pesquisadores têm demandado esforços de forma a melhorar a TARV atual ou até mesmo melhorar as combinações de forma a reduzir a quantidade de medicamentos ou dosagens dos indivíduos portadores do HIV. Segundo Oliveira *et al.*, (2018) em um estudo de simplificação da TARV HIV para a terapia dupla Lamivudina + Darunavir/Ritonavir como estratégia para evitar a toxicidade, mostrou-se 100% efetiva em manter a carga viral do HIV indetectável,



demonstrando uma potencial diminuição na toxicidade e os riscos de alguns inibidores da transcriptase reversa.

Além dos alvos convencionais, como a enzima transcriptase reversa, integrase e protease, alguns trabalhos recentes na literatura têm sido propostos visando atingir outros alvos biológicos, como os capsídeos do vírus e assim verificando a eficácia e segurança de algumas novas moléculas. Wang et al. (2020) desenvolverem uma série de moléculas peptídeo miméticas visando a interação com o capsídeo do HIV tipo-1. Já as pesquisas publicadas por SUN et al. (2020), apresentaram uma série de tiazóis com potencial atividade inibitória dos capsídeos do HIV-1.

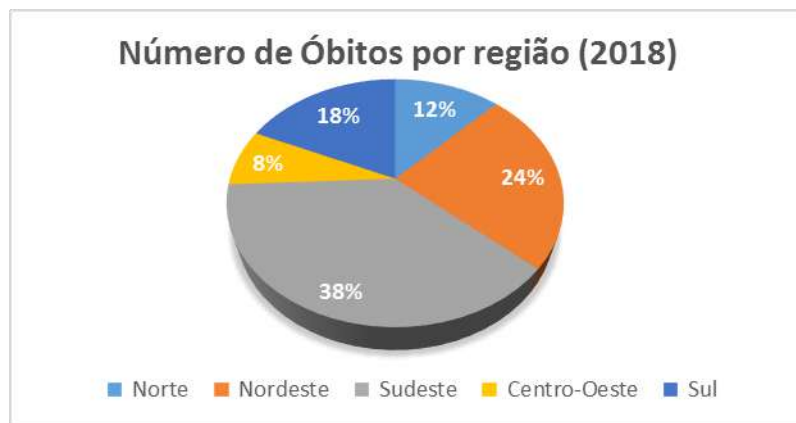
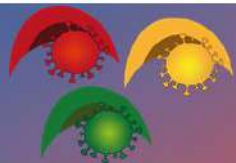


Figura 5 - Número de óbitos por causa básica AIDS, segundo região de residência por ano do óbito, Brasil 2018, dados preliminares do SIM.

Para além do desenvolvimento de moléculas candidatas à fármacos, existe uma constante busca ao desenvolvimento de vacinas eficazes contra o HIV. Alguns estudos promissores estão sendo realizados utilizando-se o Adenovírus tipo 5 como vetor (WILSON et al., 2006; BUCHBINDER et al., 2008), imunoterapia com células dendríticas (JACOBSON et al., 2016) e mais recentemente SNELLER et al. (2017) Apresentaram resultados positivos em indivíduos no processo inicial da infecção ao utilizar uma vacina de DNA contendo genes que codificam algumas proteínas do HIV, seguida de um reforço da vacina utilizando o vetor viral o vírus de estomatite vesicular recombinante.

4. CONCLUSÃO

Diante dos dados levantados, pode-se observar que o perfil epidemiológico do HIV no Brasil nos anos recentes indica que o gênero masculino (70.04%), a faixa etária que mais obteve destaque foi a de 30 a 39 anos (29.83%). Na categoria de exposição, os heterossexuais receberam maior destaque (50.95%), a região Sudeste (37.78%) e o estado de São Paulo (18,40%) alcançaram o maior número de notificações de casos durante período analisado. Cerca de 29,54% dos casos registrados evoluíram para morte, sendo 41.09% na região Sudeste. Atualmente houve uma grande evolução no desenvolvimento de novas combinações de medicamentos na terapia antirretroviral, mas ainda não há um medicamento eficaz para a diminuição total da carga viral do HIV. Novas vacinas promissoras com o uso de outros vírus como vetores encontram-se em testes clínicos. A sistematização e organização desses dados na forma de revisão gera um material que pode subsidiar outros estudos no campo de pesquisa das terapias antirretrovirais. Por fim, é de extrema



importância o desenvolvimento de ações de conscientização e divulgação de dados referentes ao HIV/AIDS e suas possíveis complicações com o intuito de alertar a sociedade para a seriedade que essa enfermidade possui e, dessa forma, minimizar as transmissões desse Vírus.

5. REFERÊNCIAS

BUCHBINDER, S.P. MEHROTRA, D.V., DUERR, A., FITZGERALD, D.W., MOGG, R., LI, D., GILBERT, P.B., LAMA, J.R., MARMOR, M., DEL RIO, C., MCEL RATH, M.J., CASIMIRO, D.R., GOTTESDIENER, K.M., CHODAKEWITZ, J.A., COREY, L., ROBERTSON, M.N. Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *Lanc.*, v. 372, p. 1881-1893, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Tratamento para o HIV. Brasília, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Conheça os novos critérios para a substituição de esquemas de TARV para o uso do Dolutegravir. Brasília, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Panorama atual da AIDS no Brasil. Brasília, 2019a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Boletim Epidemiológico HIV/AIDS. 2019b.

FINZI, D., BLANKSON, J., SILICIANO, J., MARGOLICK, J., CHADWICK, K., PIERSON, T., SMITH, K., LISZIEWICZ, J., LORI, F., FLEXNER, C., QUINN, T., CHAISSON, R., ROSENBERG, E., WALKER, B., GANGE, S., GALLANT, J., SILCIANO, R.F. Latent infection of CD4⁺T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat. Med.* v. 5, p. 512-517, 1999.

GALVEZ, C., URREA, V., DALMAU, J., JIMENEZ, J., CLOTET, B., MONCEAUX, V., HUOT, N., LEAL, L., GONZALEZ-SOLER, V., GONZALEZ-CAO, M., MULLER-TRUTWIN, M., SAEZ-CIRION, A., GARCIA, F., BLANCO, J., MARTINEZ-PICADO, J., SALGADO, M.. Extremely low viral reservoir in treated chronically HIV-1-infected individuals. *Ebio.* v.57, 2020.
JACOBSON, J., ROUTY, J., WELLES, S., DEBENEDETTE, M., TCHEREPANOVA, I., ANGEL, J.B., ASMUTH, D.M., STEIN, D.K., BARIL, J., MCKELLAR, M., MARGOLIS, D.M., TROTTIER, B., WOOD, K., NICOLETTE, C. Dendritic cell immunotherapy for HIV-1 infection using autologous HIV-1 RNA: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J. Acquir. Im. Def. Syndr.*, v. 72, p. 31- 38, 2016.

MENEZES, A., ALMEIDA, K., NASCIMENTO, A.K., DIAS, G.C., NASCIMENTO, J.C. Perfil Epidemiológico das pessoas soropositivas para HIV/AIDS. *Rev. enferm. UFPE on line.*, v. 12, n 5, 2018.



OLIVEIRA, F. A. L.; ANDREOTTI, P.; BARBOSA, A.N. Simplificação da TARV/HIV para terapia dupla Lamivudina+Darunavir/Ritonavir como estratégia para evitar toxicidade: Resultados de 100% de efetividade de uma coorte brasileira de sete anos. *Braz J Infect Dis.*, v. 22, p. 12-13, 2018.

SNELLER, M., JUSTEMENT, J., GITTENS, K., PETRONE, M., CLARRIDGE, K., PROSCHAN, M., KWAN, R., SHI, V., BLAZKOVA, J., REFSLAND, E., MORRIS, D., COHEN, K., MCELRACTH, M., XU, R., EGAN, M., ELDRIDGE, J., BENKO, E., KOVACS, C., MOIR, S., CHUN, T., FAUCI, A. A randomized controlled safety/efficacy trial of therapeutic vaccination in HIV-infected individuals who initiated antiretroviral therapy early in infection. *Sci. Transl. Med.* v. 9, 2017.

SUN, L., HUANG, T., DICK, A., MEUSER, M., ZALLOUM, W., CHEN, C., DING, X., GAO, P., COCKLIN, S., LEE, K., ZHAN, P., LIU, X. et al. Design, synthesis and structure-activity relationships of 4-phenyl-1H-1,2,3-triazole phenylalanine derivatives as novel HIV-1 capsid inhibitors with promising antiviral activities. *Eur. J. of Med Chem.* v.190, 112085, 2020.

TRINDADE, F., FERNANDES, G., NASCIMENTO, R., JABBUR, I., CARDORO, A.M. Perfil epidemiológico e análise de tendência do HIV/AIDS. *J. Health NPEPS.*, v. 4, n. 1, 2019.

UNAIDS. Joint United Nations Program on HIV/AIDS. Estatísticas globais. 2019.

WANG, L., CASEY, M., VERNEKAR, S., DO, H., SAHANI, R., KIRBY, K., DU, H., HACHIYA, A., ZHANG, H., TEDBURY, P., XIE, J., SARAFIANOS, S., WNAG, Z. et al. Chemical profiling of HIV-1 capsid-targeting antiviral PF74. *Eur. J. of Med Chem.* v.200, 112427, 2020.

WILSON, N., REED, J., NAPOE, G., PIASKOWSKI, S., SZYMANSKI, A., FURLLOT, J., GONZALEZ, E., YANT, L., MANESS, N., MAY, G., SOMA, T., REYNOLDS, M., RAKASZ, E., RUDESORF, R., MCDEMOTT, A., O'CONNOR, D., FRIEDRICK, G., FAN, J., CITRON, M., HORTON, M., WANG, F., LIANG, X., SHIVER, J., CASIMIRO, D., WATKINS, D. Vaccine-induced cellular immune responses reduce plasma viral concentrations after repeated low-dose challenge with pathogenic simian immunodeficiency virus SIVmac239. *J. Virol.* v. 80, 5875-5885, 2006.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Vigilância e Epidemiologia em Saúde

RELAÇÃO ENTRE O SISTEMA DE RECOMPENSA E A DEPENDÊNCIA QUÍMICA: UMA REVISÃO DE LITERATURA

S. M. X. CRUZ¹, V. M. M. A. SILVA², V. S. NUNES³

¹ Licenciatura em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Recife - Pernambuco.

² Licenciatura em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Recife - Pernambuco.

³ Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Recife - Pernambuco.

E-mail para contato: saraxaviercruz@gmail.com

RESUMO – Introdução: *O cérebro humano ao receber estímulos prazerosos ativa o sistema de recompensa e promove a sensação de satisfação desencadeada pela ação estímulos ambientais. Substâncias químicas ampliam em centenas de vezes essa atividade provocando sensações de contentamento e euforia muito intensas que estimulam a repetição exacerbada do seu consumo.*
Objetivos: *Compreender a relação entre as possíveis alterações no sistema de recompensa causadas pelo abuso de drogas e a dependência química.*
Metodologia: *Dopamina e dependência química foram os descritores utilizados, na base de dados PubMed 540 artigos encontrados; 91 deles foram selecionados pelo título, após avaliação do abstract 12 foram incluídos na síntese.*
Desenvolvimento: *Administração aguda de drogas de abuso causam um curto circuito que ativa neurônios dopaminérgicos e aumenta a liberação da dopamina provocando uma ilusão química de prazer que induz o indivíduo a repetir este comportamento compulsivamente. Quando crônica pode levar a mudanças fisiológicas resultantes na desregulação da via e conseqüente disfunção cerebral, pois o sistema de motivação é reorientado para os picos de dopamina provocados pela droga e seus gatilhos antecipatórios.*
Conclusão: *Apesar de agirem de formas diferentes no corpo humano, substâncias psicoativas podem causar modificações estruturais e fisiológicas que organizam o funcionamento do sistema nervoso e pervertem o sistema de recompensa, ocasionalmente causando a dependência química.*

Palavras chave: Dopamina, Substâncias psicoativas, drogas.

ABSTRACT - Introduction: *The human brain when receiving pleasant stimuli activates the reward system and promotes the feeling of satisfaction triggered by environmental stimuli. Chemical substances amplify this activity hundreds of times, causing very intense feelings of*



*contentment and euphoria that stimulate the exacerbated repetition of its consumption. **Objectives:** understand the relationship between possible changes in the reward system caused by drug abuse and chemical dependency. **Methodology:** Dopamine and drug addiction were the descriptors used in the PubMed database was 540 articles found; 91 of them was selected by title, after evaluation of abstract 12 was included in the synthesis. **Development:** Acute administration of abuse drugs causes a short circuit in the ventral striatum that activates dopamine neurons and increases the release of dopamine causing a chemical delusion of pleasure that induces the individual to repeat this behavior compulsively. When chronic, it can lead to resulting physiological changes in the deregulation of the pathway thus reflecting a brain dysfunction, because the reward and motivation systems are redirected to the dopamine peaks caused by the drug and its anticipatory triggers. **Conclusion:** Although they act in different ways in the human body, psychoactive substances can cause structural and physiological changes that reorganize the functioning of the nervous system and pervert the reward system, occasionally causing chemical dependence.*

Keywords: dopamine, Psychoactive substances, drugs.

1. INTRODUÇÃO

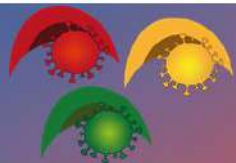
O cérebro humano ao receber estímulos prazerosos, emite sinais que ativam o sistema de recompensa, circuito composto pelas principais regiões sintetizadoras da dopamina (DA) (Volkow et al. 1999). Esta excitação promove uma cascata de reações que resulta na liberação deste neurotransmissor no núcleo accumbens, área central do sistema de recompensa, e tem como consequência a sensação de plena satisfação, onde o indivíduo sente-se recompensado e motivado a reforçar o comportamento que induziu a estimulação dopaminérgica (Vallone et al. 2000). Além disso os receptores de dopamina D2 estão envolvidos em inúmeras outras funções como a mediação de diferenças individuais na impulsividade e influência na locomoção, aprendizagem baseada em recompensas e processamento motivacional (Wise, 2004; Johnson and Kenny, 2010).

Os estímulos desencadeadores desta reação podem ser alimentos saborosos, ambientes agradáveis ou mesmo relações sexuais, eles são considerados naturais, pois a liberação da dopamina é interrompida pela saciedade (Melis et al. 2005).

As substâncias psicoativas também são capazes de excitar o sistema de recompensa, entretanto diferentemente dos estímulos naturais elas desenvolvem curtos circuitos que bloqueiam a saciedade e promovem o aumento dos níveis de dopamina sináptica no estriado ventral, dessa forma, as drogas ampliam em centenas de vezes a atividade da via mesolímbica e a partir dos seus picos de efeitos recompensadores, formam associações relacionadas ao ressarcimento (Wise, 2004; Hyman et al, 2006).

Esta sensação de contentamento e euforia provocada pela ação das substâncias psicoativas são muito intensas e estimulam a repetição exacerbada do seu consumo, que quando crônico, torna os neurônios do sistema de recompensa cada vez mais insensíveis à ação farmacológica da droga em questão, causando assim tolerância a dose utilizada de forma regular e redução do grau de entusiasmo experimentado no passado (Johnson and Kenny, 2010).

Esta ação resulta no aumento progressivo das doses, e conseqüentemente suscetibilidade do indivíduo tornar-se dependente pois os sistemas de recompensa e motivação são reorientados para os picos de dopamina provocados pela droga em questão e seus gatilhos antecipatórios de forma que as sensações de contentamento e euforia muito intensas resultantes estimulam a repetição exacerbada do seu consumo (Melis et al. 2005).



Tendo em vista a importância de estudos sobre a problemática apresentada, o objetivo deste estudo é compreender a relação entre as possíveis alterações no sistema de recompensa causadas pelo abuso de drogas e a dependência química, relacionando as alterações do sistema de recompensa com o uso crônico de substâncias psicoativas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

De acordo com os critérios de avaliação estipulados pelo autor, seriam incluídos na síntese apenas ensaios clínicos com pacientes humanos sem distinção na data de publicação. Os descritores utilizados foram dopamina e dependência química, a base de dados PubMed apresentou 540 artigos relacionados aos descritores, 91 deles foram selecionados pelo título e após avaliação do abstract e a leitura dos artigos, 12 artigos escolhidos foram incluídos na síntese.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sistema de recompensa inicia na área tegumentar ventral dopaminérgica e projeta-se para o estriado ventral que compreende predominantemente o núcleo accumbens. As principais responsáveis pela neurotransmissão da dopamina (DA) são as proteínas neuroreceptoras específicas conhecidas como transportadoras de dopamina, (DAT) que estão localizadas principalmente nas membranas pré-sinápticas de neurônios dopaminérgicos e modulam a recaptção da dopamina na fenda sináptica, ação intimamente e consistentemente ligada a comportamentos impulsivos pela busca de recompensa (Pessiglione et al. 2006; Buckholtz et al. 2010). A característica fundamental de todas as drogas que causam dependência é a capacidade de aumentar em centenas de vezes os níveis de dopamina sináptica no estriado ventral, um mecanismo especificamente envolvido em efeitos motivadores e associados à saciedade (Wise, 2004; Hyman et al, 2006).

Dados pré-clínicos fornecem evidências de que administração de substâncias psicoativas causa uma espécie de curto-circuito que induz a ativação do sistema de recompensa envolvendo o aumento exacerbado tanto do disparo de neurônios dopaminérgicos na área tegumentar ventral do mesencéfalo (Gessa et al, 1985) quanto o aumento subsequente de dopamina liberada no estriado, especificamente no núcleo accumbens (Di Chiara et al, 1988) que provoca uma ilusão química de prazer (Di Chiara et al, 1988; Wise et al. 1995).

Acredita-se que uso crônico de drogas de abuso leva a uma série de anormalidades biológicas documentadas através de métodos comportamentais, eletrofisiológicos, bioquímicos e morfológicos, que apontam para uma fisiologia cerebral alterada (Kish et al. 2001). A principal delas é a downregulation de transportadores e receptores de dopamina que resulta na desregulação das funções dessas proteínas (Shi et al. 2008), diminuição da atividade espontânea (Rasmussen e Czachura, 1995; Diana et al., 1992a) e sensibilização dos neurônios (Brodie, 2002).

A maioria das substâncias psicoativas como etanol morfina e canabinóides aumenta a atividade neurológica (Diana et al., 1998a; Gessa et al., 1985; Gysling e Wang, 1983; Matthews e German, 1984; Melis et al., 2000; Mereu et al., 1987). Psicoestimulantes, como a cocaína e as anfetaminas através da inibição dos receptores de DA, diminuem a atividade neuronal, e bloqueiam a recaptção da dopamina, aumentando assim sua liberação e ativando mecanismos de feedback que atuam como um sinal prazeroso ao cérebro (Einhorn et al., 1988; Shi et al., 2000). As anfetaminas são preferencialmente liberadores de dopamina, entretanto podem bloquear e reverter as proteínas transportadoras como a cocaína, o que leva a um aumento da dopamina extracelular



que por sua vez, ativam os receptores D2 (Lacey et al, 1990b; Mercuri et al., 1992; Sonders et al. 1997), diferentemente das anteriores a nicotina ativa e dessensibiliza rapidamente os neurônios dopaminérgicos (Picciotto et al., 1998).

Esses resultados sugerem que, em humanos, a desregulação na transmissão da dopamina é semelhante em diferentes vícios, mas a correlação entre neuroquímica e comportamento de procura de drogas parece variar com a droga particular de abuso.

A redução dos terminais dopaminérgicos do estriado envolvidos nos processos de liberação e inibição (Picciotto et al., 1998), e consequente diminuição significativa da disponibilidade dos transportadores de dopamina causada por o uso crônico de estimulantes, como a heroína, metanfetamina e cocaína refletem as mudanças adaptativas e a disfunção grave dos neurônios dopaminérgicos (Fleckenstein et al. 2000; Volkow et al. 2001; Wilson et al. 1996; McCann et al. 2008).

A lesão do sistema de transmissão da DA pode ter implicações para a experiência de prazer e recompensa, levando a um estado de depressão ou ansiedade, que pode ser um fator de vulnerabilidade para o desenvolvimento da dependência e recaída (Gerra et al. 2000; Volkow et al. 2006; Zijlstra et al. 2008). Uma hipótese alternativa pressupõe que a estimulação dopaminérgica não promove o prazer em si ou o gosto de uma recompensa, mas sim media a falta dela sugerindo que a disfunção dopaminérgica está associada à incapacidade de ser motivada por estímulos considerados naturais que indicam recompensa (Kish et al. 2001).

Em relação às ações produzidas pelos psicoestimulantes, muita atenção tem focado no fato de que suas propriedades recompensadoras e reforçadoras ocorrem principalmente através da modulação da transmissão da dopamina através de uma interferência nos seus transportadores (Ritz et al, 1987; Seiden et al. 1993; Wise, 1996a; Wise, 1996b). Ao alterar a quantidade de entradas excitatórias e inibitórias do neurônio dopaminérgico, a substância psicoativa influencia a excitabilidade neuronal e, portanto, as ações comportamentais do próprio neurônio (Melis et al. 2005).

A retirada aguda de substâncias psicoativas após a administração prolongada provoca um profundo declínio na taxa de atividade dos neurônios dopaminérgicos da área tegumentar ventral conhecido como estado hipodopaminérgico (Diana et al., 1995a). Esta diminuição reflete alterações tanto na inibição quanto nas entradas excitatórias dos receptores dessas células (Diana et al., 1999) modificações que resultam na desregulação da liberação de moléculas fundamentais ao funcionamento do sistema de recompensa (Manzoni e Williams, 1999). Este estado hipodopaminérgico acompanhando de fases agudas de abstinência refletem alterações de propriedades intrínsecas de mecanismos regulatórios modificados por um regime crônico de drogas e divulgados pela retirada delas (Bonci and Williams, 1997; Manzoni e Williams, 1999; Diana Tepper, 2002; Pulvirenti e Diana, 2001).

A hipoatividade apresentada pelas células dopaminérgicas, observadas após interrupção abrupta de substâncias psicoativas administrada de forma crônica, correlaciona-se bem com uma redução dos níveis de dopamina extracelular no núcleo accumbens e pode representar a base neural da disforia, caracterizada pela ansiedade, depressão e inquietude (Fadda e Rossetti, 1998; Rossetti et al., 1992a). Curiosamente, o estado hipodopaminérgico supera os sinais físicos de abstinência (Bailey et al., 2001; Diana et al., 1996) e pode ser terminado pela administração da própria droga (Diana et al., 1993b) caracterizando-se assim como parte de um ciclo de dependência onde a administração crônica de determinada substância psicoativa causa uma espécie de curto-circuito que ativa os neurônios dopaminérgicos e aumenta a liberação da dopamina estriatal provocando uma ilusão química e induz o indivíduo a repetir o consumo da droga compulsivamente.



O sistema de recompensa reduz sua atividade sob circunstâncias que imitam a ânsia ou desejo pela substância psicoativa que o proporciona prazer e direciona o comportamento para a busca e obtenção da molécula desejada, perpetuando assim o ciclo da dependência (Melis et al. 2005).

4. CONCLUSÃO

A dependência de drogas é uma desordem cerebral causada pelo uso repetitivo de substâncias químicas que alteram o funcionamento do sistema nervoso central. Os efeitos recompensadores proporcionados pelas drogas de abuso estão associados a ativação do sistema mesolímbico e a liberação da dopamina no núcleo accumbens, entretanto a estimulação dopaminérgica não promove o prazer ou o gosto de recompensa, mas sim media a falta dela e sugere que a disfunção da via mesolímbica está associada à incapacidade de motivação através estímulos considerados naturais. Esta situação reflete uma disfunção no cérebro, pois os sistemas de recompensa e motivação apresentam reorientação à picos de dopamina provocados pela droga e seus gatilhos antecipatórios onde a atenção do indivíduo se volta apenas para o prazer imediato. A insipidez afetiva pode resultar da falta de resposta emocional em relação aos estímulos indicadores de recompensa, ou seja, pacientes com disfunção dopaminérgica não são incapazes de sentir prazer, mas podem falhar ao serem motivados por estímulos ambientais. Apesar de agirem de formas diferentes no corpo humano, as drogas diretamente ou não, causam modificações no funcionamento do sistema nervoso. Portanto, a dependência de drogas está associada a alterações na neurotransmissão cerebral e o abuso delas sejam lícitas ou não, pode causar alterações no sistema de liberação da dopamina e consequentemente perversão do sistema de recompensa, ocasionalmente causando a dependência química.

5. REFERÊNCIAS

- Bailey, C. P., O'Callaghan, M. J., Croft, A. P., Manley, S. J., and Little, H. J. (2001). *Alterations in mesolimbic dopamine function during the abstinence period following chronic ethanol consumption*. *Neuropharmacology* 41, 989–999.
- Bonci, A., and Williams, J. T. (1997). *Increased probability of GABA release during withdrawal from morphine*. *J. Neurosci.* 15, 796–803.
- Brodie, M. S. (2002). *Increased ethanol excitation of dopaminergic neurons of the ventral tegmental area after chronic ethanol treatment*. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 26, 1024–1030.
- Buckholtz JW, Treadway MT, Cowan RL, Woodward ND, Li R, Ansari MS, Baldwin RM, Schwartzman AN, Shelby ES, Smith CE et al. 2010. *Dopaminergic network differences in human impulsivity*. *Science.* 329:532.
- Diana, M., Gessa, G. L., and Rossetti, Z. L. (1992a). *Lack of tolerance to ethanol-induced stimulation of mesolimbic dopamine system*. *Alcohol* 27, 329–333.
- Diana, M., Pistis, M., Muntoni, A., and Gessa, G. (1996). *Mesolimbic dopaminergic reduction outlasts ethanol withdrawal syndrome: Evidence of protracted abstinence*. *Neuroscience* 71, 411–415.
- Diana, M., Melis, M., and Gessa, G. L. (1998a). *Increase in meso-prefrontal dopaminergic activity after stimulation of CB1 receptors by cannabinoids*. *Eur. J. Neurosci.* 10, 2825–2830



Diana, M., Pistis, M., Carboni, S., Gessa, G. L., and Rossetti, Z. L. (1993b). *Profound decrement of mesolimbic dopaminergic neuronal activity during ethanol withdrawal syndrome in rats: Electrophysiological and biochemical evidence*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1, 7966–7969.

Diana, M., Pistis, M., Muntoni, A. L., and Gessa, G. L. (1995a). *Ethanol withdrawal does not induce a reduction in the number of spontaneously active dopaminergic neurons in the mesolimbic system*. Brain Res. 5(1–2), 29–34.

Diana, M., Muntoni, A. L., Pistis, M., Melis, M., and Gessa, G. L. (1999). *Lasting reduction in mesolimbic dopamine neuronal activity after morphine withdrawal*. Eur. J. Neurosci. 11, 1037–1041

Diana, M., and Tepper, J. M. (2002). *Electrophysiological pharmacology of mesencephalic dopaminergic neurons*. In ‘*Handbook of Experimental Pharmacology*’ (G. Di Chiara, Ed.), 154=II. Springer-Verlag, Berlin.

Di Chiara G, Imperato A (1988): *Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats*. Proc Natl Acad Sci USA 85:5274 –5278.

Einhorn et al., 1988 - Einhorn, L. C., Johansen, P. A., and White, F. J. (1988). *Electrophysiological effects of cocaine in the mesoaccumbens dopamine system: Studies in the ventral tegmental area*. J. Neurosci. 8, 100–112.

Fleckenstein AE, Gibb JW, Hanson GR (2000) *Differential effects of stimulants on monoaminergic transporters: pharmacological consequences and implications for neurotoxicity*. Eur J Pharmacol 406:1–13

Fadda e Rossetti, 1998; Fadda, F., and Rossetti, Z. L. (1998). *Chronic ethanol consumption: From neuroadaptation to neurodegeneration*. Prog. Neurobiol. 56(4), 385–431.

Gessa GL, Muntoni F, Collu M, Vargiu L, Mereu G (1985): *Low doses of ethanol activate dopaminergic neurons in the ventral tegmental area*. Brain Res 348:201–203.

Gessa, G. L., Muntoni, F., Collu, M., Vargiu, L., and Mereu, G. (1985). *Low doses of ethanol activate dopaminergic neurons in the ventral tegmental area*. Brain Res. 25, 201–203.

Gessa, G. L., Melis, M., Muntoni, A. L., and Diana, M. (1998). *Cannabinoids activate mesolimbic dopamine neurons by an action on cannabinoid CB1 receptors*. Eur. J. Pharmacol. 2, 39–44.

Gysling, K., and Wang, R. Y. (1983). *Morphine-induced activation of A10 dopamine neurons in the rat*. Brain Res. 24, 119–127

Gerra G, Zaimovic A, Zambelli U, Delsignore R, Baroni MC, Laviola G, Macchia T, Brambilla F (2000) *Neuroendocrine correlates of depression in abstinent heroin-dependent subjects*. Psychiatry Res 96:221–234

Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ (2006). *Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory*. Annu Rev Neurosci 29: 565–598

Johnson PM, Kenny PJ. 2010. *Dopamine D2 receptors in addiction like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats*. Nat Neurosci. 13:635–641.



Lacey, M. G., Mercuri, N. B., and North, R. A. (1990b). *Actions of cocaine on rat dopaminergic neurones in vitro*. Br. J. Pharmacol. 99, 731–735.

Kish SJ, Kalasinsky KS, Derkach P, Schmunk GA, Guttman M, Ang L, Adams V, Furukawa Y, Haycock JW (2001) *Striatal dopaminergic and serotonergic markers in human heroin users*. Neuropsychopharmacol 24:561–567

Manzoni, O. J., and Williams, J. T. (1999). *Presynaptic regulation of glutamate release in the ventral tegmental area during morphine withdrawal*. J. Neurosci. 1, 6629–6636.

Matthews, R. T., and German, D. C. (1984). *Electrophysiological evidence for excitation of rat ventral tegmental area dopamine neurons by morphine*. Neuroscience 11, 617–625.

McCann UD, Kuwabara H, Kumar A, Palermo M, Abbey R, Brasic J, Ye W, Alexander M, Dannals RF, Wong DF, Ricaurte GA (2008) *Persistent cognitive and dopamine transporter deficits in abstinent methamphetamine users*. Synapse 62:91–100

Melis, M., Gessa, G. L., and Diana, M. (2000). *Divergent mechanisms for dopaminergic excitation induced by opiates and cannabinoids in the rat midbrain*. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 24, 993–1006.

Melis, M., Spiga, S., & Diana, M. (2005). *The Dopamine Hypothesis of Drug Addiction: Hypodopaminergic State*. International Review of Neurobiology, 101–154.

Mercuri, N. B., Calabresi, P., and Bernardi, G. (1992). *The electrophysiological actions of dopamine and dopaminergic drugs on neurons of the substantia nigra pars compacta and ventral tegmental area*. Life Sci. 51, 711–718.

Mereu, G., Yoon, K. W., Boi, V., Gessa, G. L., Naes, L., and Westfall, T. C. (1987). *Preferential stimulation of ventral tegmental area dopaminergic neurons by nicotine*. Eur. J. Pharmacol. 23, 395–399.

Pessiglione M, Seymour B, Flandin G, Dolan RJ, Frith CD. 2006. *Dopamine-dependent prediction errors underpin reward-seeking behaviour in humans*. Nature. 442:1042–1045.

Picciotto, M. R., Zoli, M., Rimondini, R., Lena, C., Marubio, L. M., Pich, E. M., Fuxe, K., and Changeux, J. P. (1998). *Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine*. Nature 8(6663), 173–177.

Pulvirenti e Diana, 2001 Pulvirenti, L., and Diana, M. (2001). *Drug dependence as a disorder of neural plasticity: Focus on dopamine and glutamate*. Rev. Neurosci. 12, 141–158.

Rasmussen, K., and Czachura, J. F. (1995). *Nicotine withdrawal leads to increased firing rates of midbrain dopamine neurons*. Neuroreport 29, 329–332.

Ritz et al., 1987 - Ritz, M. C., Lamb, R. J., Goldberg, S. R., and Kuhar, M. J. (1987). *Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine*. Science 4(4819), 1219–1223.

Rossetti, Z. L., Melis, F., Carboni, S., Diana, M., and Gessa, G. L. (1992a). *Alcohol withdrawal in rats is associated with a marked fall in extraneuronal dopamine*. Alcohol Clin. Exp. Res. 16, 529–532.



Seiden et al. 1993; Wise, R. A., and Munn, E. (1995). *Withdrawal from chronic amphetamine elevates baseline intracranial self-stimulation thresholds*. *Psychopharmacology (Berlin)* 117, 130–136.

Seiden e Sabol, 1996 - Seiden LS, Sabol KE (1996) *Methamphetamine and methylenedioxymethamphetamine neurotoxicity: possible mechanisms of cell destruction*. *NIDA Res Monogr* 163:251–276.

Shi et al., 2000 - Shi, W. X., Pun, C. L., Zhang, X. X., Jones, M. D., and Bunney, B. S. (2000). *Dual effects of amphetamine on dopamine neurons mediated by dopamine and nondopamine receptors*. *J. Neurosci.* 1, 3504–3511.

Shi et al. 2008 - Shi J, Zhao LY, Copersino ML, Fang YX, Chen Y, Tian A, Deng Y, Shuai Y, Jin J, Lu L (2008) *PET imaging of dopamine transporter and drug craving during methadone maintenance treatment and after prolonged abstinence in heroin users*. *Eur J Pharmacol* 579:160–166

Sonders, M. S., Zhu, S. J., Zahner, N. R., Kavanaugh, M. P., and Amara, S. G. (1997). *Multiple ionic conductances of the human dopamine transporter: The actions of dopamine and psychostimulants*. *J. Neurosci.* 1, 960–974.

Vallone D, Picetti R, Borrelli E. 2000. *Structure and function of dopamine receptors*. *Neurosci Biobehav Rev.* 24:125–132.

Volkow et al. 1999 - Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Logan J, Gatley SJ, Gifford A, et al. (1999): *Prediction of reinforcing responses to psychostimulants in humans by brain dopamine D2 receptor levels*. *Am J Psychiatry* 156:1440 – 1443.

Volkow ND, Wang G, Fowler JS, Logan J, Gerasimov M, Maynard L, et al. (2001): *Therapeutic doses of oral methylphenidate significantly increase extracellular dopamine in the human brain*. *J Neurosci* 21:RC121.

Volkow ND, Wang GJ, Telang F, Fowler JS, Logan J, Childress AR, Jayne M, Ma YM, Wong C (2006) *Cocaine cues and dopamine in dorsal striatum: mechanism of craving in cocaine addiction*. *J Neurosci* 26:6583–6588

Wilson JM, Kalasinsky KS, Levey AI, Bergeron C, Reiber G, Anthony RM, Schmunk GA, Shannak K, Haycock JW, Kish SJ (1996) *Striatal dopamine nerve terminal markers in human, chronic methamphetamine users*. *Nat Med* 2:699–703.

Wise, R. A., and Munn, E. (1995). *Withdrawal from chronic amphetamine elevates baseline intracranial self-stimulation thresholds*. *Psychopharmacology (Berlin)* 117, 130–136.

Wise, R. A. (1996a). *Addictive drugs and brain stimulation reward*. *Annu. Rev. Neurosci.* 19, 319–340.

Wise, R. A. (1996b). *Neurobiology of addiction*. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 243–251.

Wise RA (2004). *Dopamine, learning and motivation*. *Nat Rev Neurosci* 5: 483–494.

Zijlstra F, Booij J, van den Brink W, Franken IH (2008): *Striatal dopamine D2 receptor binding and dopamine release during cue-elicited craving in recently abstinent opiate-dependent males*. *Eur Neuropsychopharmacol* 18:262–270.



6. AGRADECIMENTOS

Agradecimento ao Núcleo de Estudos em Neurociência que pertence ao Departamento de Biofísica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco pelo apoio.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Vigilância e Epidemiologia em Saúde

EPIDEMIOLOGIA, INDICADORES E MEDIDAS DE PREVENÇÃO DA FEBRE AMARELA EM HUMANOS

M. D. SILVA¹, M. A. S. COSTA¹, G. H. F. GUEDES¹, M. L. F. OLIVEIRA¹, J. A. S. GOMES¹, J. M. CARVALHO¹, F. C. M. TENÓRIO¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Histologia e Embriologia;
E-mail para contato: mariaeduardaufpe@gmail.com

RESUMO – A febre Amarela é uma doença infecciosa, transmitida para os humanos através dos Aedes aegypti, nos casos grave da doença pode levar o ser humano a óbito, sendo assim, se faz necessário um artigo com os objetivos voltados a epidemiologia em busca do controle, além de indicadores da doença para alertar os profissionais da saúde e que aborde a prevenção para que a população consiga evitar a contaminação da doença. Para a realização do artigo foi necessária uma análise ecológica descritiva, utilizando informações de bancos de dados do Ministério da Saúde, Boletim Epidemiológico e Organização Mundial da Saúde (OMS). Conclui-se que os indicadores da doença, são a gravidade da doença além da quantidade de vírus em circulação no organismo, como também as taxas de neutrófilos presente no sangue. As medidas de prevenção que são mais eficazes para a doença são as campanhas de vacinas deixaram a imunização mais segura, sendo apenas uma dose o suficiente para imunização e os métodos para não se ter o contato com o mosquito transmissor.

Palavras-Chave: Febre Amarela, controle epidemiológico, vacina.

ABSTRACT - Yellow fever is an infectious disease, transmitted to humans through Aedes aegypti, in severe cases of the disease it can lead humans to death. Therefore, it is necessary an article with the objectives focused on epidemiology in search of control, in addition to disease indicators to alert health professionals and address prevention so that the population can avoid contamination of the disease. To carry out the article, a descriptive ecological analysis was necessary, using information from databases of the Ministry of Health, Epidemiological Bulletin and World Health Organization (WHO). It is concluded that the indicators of the disease are the severity of the disease in addition to the amount of viruses circulating in the body, as well as the levels of neutrophils present in the blood. The preventive measures that are most effective for the disease are vaccine campaigns that have made immunization safer, with just one dose sufficient for immunization and methods for not having contact with the transmitting mosquito.

Keywords: Yellow Fever, epidemiological control, vaccine.



1. INTRODUÇÃO

O vírus da febre amarela pertence ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae* (do latim *flavus* = amarelo). Ele pertence ao mesmo gênero e família de outros vírus responsáveis por doença no homem, entre os quais o Dengue, o West Nile, o Rocio e a encefalite de St. Louis. Embora apenas um sorotipo do vírus amarílico seja reconhecido, há pequenas alterações genéticas entre as cepas da América e da África que permitem atualmente caracterizar dois e cinco genotipos, respectivamente, não se sabendo se um é mais patogênico que o outro, segundo Vasconcelos PFC. (2000).

O vírus da febre amarela possui o genoma constituído de RNA de fita simples não segmentado, polaridade positiva, com cerca de 11 kilobases de comprimento. O genoma completo possui 10.862 nucleotídeos que codificam 3.411 aminoácidos, segundo Rouquayrol, N.A.F. (2003). Esse genoma possui uma única região codificante (ORF) com cerca de 10.233 nucleotídeos que vão codificar a formação das inúmeras proteínas virais e que é flanqueada por duas regiões não codificantes (NCR) de tamanho variável, sendo uma grande a 3'NCR com cerca de 511 nucleotídeos e uma pequena 5'NCR que possui 118 nucleotídeos. As regiões não codificantes, como indicativo, não codificam a formação de proteínas virais, mas são importantes para a regulação e expressão do vírus, segundo Vasconcelos PFC. (2000).

O vírus da febre amarela mantém-se em dois ciclos básicos: um ciclo urbano simples do tipo homem-mosquito onde o *Aedes aegypti* responsabiliza-se pela disseminação da doença e outro silvestre complexo, onde várias espécies de mosquitos responsáveis pela transmissão diferem: na África, os mosquitos *Aedes* e na América os mosquitos *Haemagogus* e *Sabethes* Strode GK. (1951)

A febre amarela é uma doença infecciosa não contagiosa que se mantém endêmica ou enzoótica nas florestas tropicais da América e África causando periodicamente surtos isolados ou epidemias de maior ou menor impacto em saúde pública, sendo transmitida ao homem mediante a picada de insetos hematófagos da família *Culicidae*, em especial dos gêneros *Aedes* e *Haemagogus*

A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica um terceiro ciclo de transmissão que até os dias atuais somente foi identificado na África, denominado de intermediário, ocorre nas savanas e semi-árido acometendo vilarejos isolados, tem como vetor os mosquitos semidomésticos, que infectam primatas e homens, segundo Organization, world health. Yellow fever, (2001).

Esta doença é um dos problemas que historicamente mais influenciou a política de saúde e saneamento em nosso país, desde a segunda metade do século XIX, em face de sua gravidade e aos problemas econômicos decorrentes das epidemias que ocorriam em importantes centros urbanos. Os grandes investimentos em infra-estrutura urbana desenvolvida nas primeiras décadas do século XX e as medidas de combate ao vetor, realizadas em função das epidemias de febre amarela urbana, reduziram drasticamente a ocorrência de casos, chegando a alcançar sua erradicação em 1942. A forma silvestre não pode ser erradicada e tem sido, desde então, objeto de intervenções visando seu controle, ao mesmo tempo a reintrodução do *Aedes aegypti* nas Américas exige medidas para impedir que ocorra sua reurbanização, segundo Tauil, P. L. (2005).

Importante ressaltar que os macacos não transmitem a febre amarela para o homem e NÃO são os responsáveis pela transmissão da febre amarela. Eles são as principais vítimas. Ao contrário, os primatas prestam um importante auxílio no controle da febre amarela. Por adoecerem primeiro, os primatas dão às autoridades informações valiosas sobre a circulação do vírus. O achado de macacos mortos serve de alerta para que os órgãos de saúde pública iniciem campanhas de vacinação, segundo Brasil, Ministério da Saúde, (2013).



As facilidades de locomoção e o elevado número de pessoas que deslocam de e para áreas de risco fazem com que a possibilidade de reintrodução e introdução da febre amarela no Brasil. Segundo Figueiredo, L.T.M, (2006). Para que a proliferação seja evitada é necessário uma vigilância epidemiológica que tem como objetivo principal é fornecer orientação técnica permanente para os profissionais de saúde, que têm a responsabilidade de decidir sobre a execução de ações de controle de doenças e agravos, tornando disponíveis, para esse fim, informações atualizadas sobre a ocorrência dessas doenças e agravos, bem como dos fatores que a condicionam, numa área geográfica ou população definida. Esperamos que o presente artigo venha atender às necessidades informativas e intensifique o cuidado, prevenção e vigilância da doença.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foi utilizado uma pesquisa sobre os indicadores, epidemiologia e as medidas preventivas da febre amarela, para se obter os dados foram utilizando informações de bancos de dados do Ministério da Saúde, Boletim Epidemiológico e Organização Mundial da Saúde (OMS), com as devidas palavras chave: medidas de prevenção, epidemiologia, indicadores da febre amarela. Se foi coletado as informações com as características relevantes sobre o tema para o presente trabalho.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período da epidemia da Febre Amarela que ocorreu entre 2016 a 2018, registrado 778 casos e 262 mortes no Brasil. O total passou para 1.376 casos e 483 mortes de 2017 até o final de 2018, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS). A epidemia foi uma oportunidade única de entender melhor uma doença que conhecíamos apenas por relatos de casos esparsos”, diz (Ribeiro, A. F. *et al.* 2019). O autor retrata a epidemia da Febre Amarela silvestre que aconteceu de 2016 até final de 2018 no Brasil.

Após a epidemia começou as publicações de artigos voltado a doença e seus principais indicadores e se sabe que existem dois indicadores do risco de morrer por febre amarela, um deles é a gravidade da doença e a quantidade de vírus em circulação no organismo.

Nem sempre essa relação é direta, ela determina a gravidade de outra doença viral, a dengue, mas não influencia a evolução da zika, também viral. No caso da febre amarela, uma contagem de vírus acima de 126 mil cópias por mL de sangue agrava severamente as possibilidades de sobrevivência. O outro indicador é através das taxas de neutrófilos, um tipo de células brancas do sangue. Taxas acima de 4 mil neutrófilos por mililitro (mL), embora dentro da faixa considerada normal (1.800 a 7.500 por mL), se mostraram associadas ao risco mais alto de morte. (Figueiredo LT, *et al.*, 2017). Os dados é melhor apresentado na figura 1.



FIGURA 1: Taxa de neutrófilos por mL indicando o normal e o de maior risco. FONTE: KALLAS, E. G. *et al.* Predictors of mortality in patients with yellow fever: an observational cohort study. **Lancet Infectious Diseases**. 16 mai. 2019.



Sabendo dos indicadores os médicos podem realizar um atendimento mais ágil, visto que a doença se prolifera rápido no humano, em menos de 48h o paciente pode chegar ao óbito.

Os sintomas iniciais da doença é a febre, dores musculares, dor de cabeça, perda de apetite, prostração, náusea e vômito, que aparecem à medida que o vírus causador da doença se instala no organismo, os sintomas podem desaparecer em até quatro dias, mas em contrapartida podem evoluir para a forma grave e podem ser fatais: a pele e os olhos ficam amarelados ou vermelhados e a urina escura, a febre reaparece, as dores abdominais e os vômitos se intensificam, começam as diarreias e as hemorragias. A morte pode chegar em até no máximo onze dias após os primeiros sintomas se não houver intervenção medica e tratamento.

Atualmente a medida de prevenção mais eficaz aceita pela (Organização Pan-Americana da Saúde - OPAS, 2019) é a vacina, onde toda a população que reside ou que se desloque para regiões silvestres, rurais ou de mata de áreas com recomendação de vacina (ACRV), deve se imunizar na Unidade Básica de Saúde (UBS) mais próxima da sua casa. A vacina está disponível, por meio do Sistema Único de Saúde (SUS), em todas as unidades de saúde, e deve ser administrada pelo menos 10 dias antes do deslocamento para áreas de risco.

Contraindicações para vacinação são as crianças com menos de 6 meses de idade; Indivíduos com histórico de reação anafilática a substâncias presentes na vacina (ovo de galinha e seus derivados, gelatina e outros produtos que contêm proteína animal bovina); Pacientes com histórico de doenças do timo (miastenia grave, timoma, casos de ausência de timo ou remoção cirúrgica), também devem buscar orientação de um profissional de saúde; Pacientes com imunossupressão de qualquer natureza: Pacientes infectados pelo HIV com imunossupressão grave; Pacientes em tratamento com drogas imunossupressoras (corticosteroides, quimioterapia, radioterapia, imunomodulador); Pacientes submetidos a transplante de órgãos; Pacientes com imunodeficiência primária; Pacientes com neoplasias. Em caso de esquecimento do processo de imunização é necessário a leitura do cartão de vacinação que tem os registros pessoais de vacinação. Segundo Hamer DH, et al (2018)

População Alvo	Indicação
Crianças com 9 meses de vida	1 (uma) dose
Crianças com 4 (quatro) anos de idade	Dose de reforço
Pessoas com 5 (cinco) anos ou mais de idade, não vacinadas ou sem comprovação de vacinação	1 (uma) dose

*Em situações especiais como epidemias e epizootias a vacina pode ser utilizada a partir de 6 meses de idade de acordo com norma específica, não sendo esta dose válida para a rotina.

FIGURA2. Esquema vacinal contra a Febre Amarela em 2020

Inicialmente foi realizada em duas dosagens, a primeira se tomava aos nove meses e a segunda para reforçar com quatro anos depois, isso com crianças com menos de cinco anos, acima disso, era necessário tomar a vacina e a segunda dose em dez anos depois. Mas em 2019 o Ministério da Saúde mudou para a melhoria da imunização da doença, o esquema vacinal passa a ser de uma única dose, como observado na Figura 2. A medida é segura e garante proteção durante toda a vida.



Outro método eficaz para prevenir a doença é manter bem tampado tonéis, caixas e barris de água; Lavar semanalmente com água e sabão tanques utilizados para armazenar água; Manter caixas d'água bem fechadas; Remover galhos e folhas de calhas; Não deixar água acumulada sobre a laje; Encher pratinhos de vasos com areia até a borda ou lavá-los uma vez por semana; Trocar água dos vasos e plantas aquáticas uma vez por semana; Colocar lixos em sacos plásticos em lixeiras fechadas; Fechar bem os sacos de lixo e não deixar ao alcance de animais; Manter garrafas de vidro e latinhas de boca para baixo; Acondicionar pneus em locais cobertos; Fazer sempre manutenção de piscinas; Tampar ralos; Colocar areia nos cacos de vidro de muros ou cimento; Não deixar água acumulada em folhas secas e tampinhas de garrafas; Vasos sanitários externos devem ser tampados e verificados semanalmente; Limpar sempre a bandeja do ar condicionado; Lonas para cobrir materiais de construção devem estar sempre bem esticadas para não acumular água; Catar sacos plásticos e lixo do quintal.

No âmbito do Ministério da Saúde, existem:

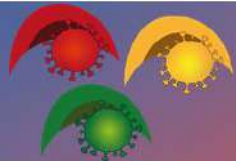
- Programas permanentes de prevenção e combate ao mosquito;
- desenvolvimento de campanhas de informação e mobilização das pessoas;
- fortalecimento da vigilância epidemiológica e entomológica para ampliar a capacidade de predição e de detecção precoce de surtos da doença;
- melhoria da qualidade do trabalho de campo de combate ao vetor (mosquito *Aedes Aegypti*);
- integração das ações de controle da dengue na atenção básica, com a mobilização dos Programas de Agentes Comunitários de Saúde (PACS) e Programas de Saúde da Família (PSF);
- utilização de instrumentos legais que facilitem o trabalho do poder público na eliminação de criadouros em imóveis comerciais, casas abandonadas ou fechadas, terrenos baldios;
- atuação em vários setores, por meio do fomento à destinação adequada de resíduos sólidos e a utilização de recursos seguros para armazenagem de água;
- desenvolvimento de instrumentos mais eficazes de acompanhamento e supervisão das ações desenvolvidas pelo Ministério da Saúde, estados e municípios.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que a Febra Amarela ainda é um risco a população a doença tem se expandido para regiões onde existe alta infestação do *Aedes aegypti*, mosquito transmissor do ciclo urbano da doença. Em relação a epidemiologia se concluiu que a doença vem surgindo com mais frequência, mesmo sendo em pouca quantidade de infectados, essas aparições não deveriam aparecer visto que as vacinas contra a doenças estão sendo realizadas no período corre e com mais eficácia. Em relação aos indicadores se sabe que existem dois indicadores da doença, sendo eles a gravidade da doença e a quantidade de vírus em circulação no organismo e o outro são as taxas de neutrófilos presentes no sangue, auxiliando assim nos diagnostico da doença. As medidas de prevenção mais eficazes são as campanhas de vacinas que deixaram a imunização mais segura, sendo apenas uma dose o suficiente para imunização e os métodos para não se ter o contato com o mosquito transmissor.

5. REFERÊNCIAS

Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa, Departamento de Apoio à Gestão Estratégica e Participativa. Política Nacional de Saúde Integral das Populações do Campo e da Floresta. *Brasília: Ministério da Saúde*; 2013. 48 p. Disponível em:



- http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_saude_populacoes_campo.pdf.
Epidemiologia & Saúde. Ed. Rio de Janeiro: *MEDSI*, 2003.pág.280-281.
- Figueiredo LT; Fonseca BA. Febre amarela. In: Focaccia R. Veronesi – *Tratado de Infectologia*. 4 a ed. São Paulo: Atheneu; 2017.
- Hamer DH; Angelo K; Caumes E; van Genderen PJJ; Florescu AS; Popescu CP; Perret C; McBride A; Checkley A; Ryan J; Cetron M; Schlagenhauf P. Fatal yellow fever in travelers to Brazil, 2018. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2018;23;67(11):340-341.
- Kallas, E. G. Predictors of mortality in patients with yellow fever: an observational cohort study. *Lancet Infectious Diseases*. 2019.
- Organização Pan-Americana da Saúde - *OPAS*, 2019
- Organization, world health. Yellow fever. *Fact Sheet* nº 100, revised december 2001.
- Ribeiro, A. F. Yellow Fever: Factors Associated with Death in a Hospital of Reference in Infectious Diseases, São Paulo, Brazil, 2018. *American Journal ou Tropical Medicine and Hygiene*. 28 mai. 2019.
- Strode GK. *Yellow fever*. New York: McGraw-Hill, 1951.
- Tauil, Pedro Luiz. Controvérsias atuais sobre a vacinação de febre amarela no Brasil. *Boletim Eletrônico da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. nº5, 23 de setembro de 2005.
- Vasconcelos PFC. Febre amarela. *Sociedade Brasileira de Pediatria*, Rio de Janeiro, 2000.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Vigilância e Epidemiologia em Saúde

SÍFILIS CONGÊNITA NA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE (PERNAMBUCO-BRASIL): ANÁLISE DO PERFIL EPIDEMIOLÓGICO ENTRE OS ANOS DE 2014 A 2019

J. B. de SOUZA¹, D. L. CORIOLANO²; Y. L. A. FERREIRA¹; A. C. SILVA¹; S. B. PALÁCIO¹; F. H. P. C. OLIVEIRA¹

¹ Centro Universitário São Miguel.

² Universidade Federal de Pernambuco.

E-mail para contato: jaquelinebarbosadesouza7@gmail.com

RESUMO – A sífilis congênita (SC) é resultante da infecção do *Treponema pallidum* na gestante, sendo transmitida por via placentária ou na ocasião do parto. Durante o período de 2014 a 2019, de acordo com dados obtidos na plataforma do SINAN, foram confirmados 120.123 casos no Brasil, e destes, 8.800 casos foram notificados no estado de Pernambuco, e 5.931 referem-se apenas a Região Metropolitana do Recife (RMR). O presente estudo teve como objetivo descrever o perfil epidemiológico da SC na RMR no período de 2014 a 2019. Trata-se de um estudo transversal retrospectivo descritivo do perfil epidemiológico da SC em oito cidades que compõem a RMR, os dados secundários foram obtidos através de fichas disponíveis no DataSUS. As variáveis quantitativas estudadas foram o grau de escolaridade materna, idade e momento do diagnóstico, enquanto as variáveis qualitativas foram raça, a realização ou não do pré-natal e o tipo de sífilis adquirida, notificados nos anos de 2014 a 2019. As características estatisticamente significativas associadas à prevalência de SC na região estudada foram o ensino fundamental incompleto (6º ao 9º ano), idade entre 15 e 19 anos, com realização de pré-natal, com prevalência na raça parda, e o diagnóstico foi realizado apenas no momento do parto. Identifica-se uma urgência na implantação de ações significativas para o controle desse agravo e que possibilitem a uniformização da conduta de vigilância.

PALAVRAS-CHAVE: Epidemiologia; Sífilis congênita; Infecções Sexualmente Transmissíveis.

ABSTRACT – Congenital syphilis (SC) results from the infection of *Treponema pallidum* in the pregnant woman, being transmitted through the placenta or at the time of delivery. During the period from 2014 to 2019, according to data obtained from the SINAN platform, 120,123 cases were confirmed in Brazil, and of these, 8,800 cases were reported in the state of Pernambuco, and 5,931 refer only to the Metropolitan Region of Recife (RMR). The present study aimed to describe the epidemiological profile of SC in the RMR in the period from 2014 to 2019. It is a cross-sectional, descriptive retrospective study of the epidemiological profile of SC in eight cities that make up the RMR, secondary data were obtained through tokens available on DataSUS. The



quantitative variables studied were the level of maternal education, age and time of diagnosis, while the qualitative variables were race, whether or not prenatal care was performed and the type of acquired syphilis reported in the years 2014 to 2019. The statistically significant characteristics significant changes associated with the prevalence of SC in the studied region were incomplete primary education (6th to 9th grade), age between 15 and 19 years, with prenatal care, with prevalence in the brown race, and the diagnosis was made only in delivery. An urgency is identified in the implementation of significant actions to control this disease and that allow the uniformity of the surveillance conduct.

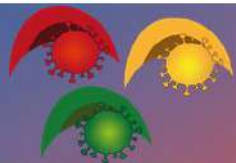
KEYWORDS: *Epidemiology; Congenital syphilis; Sexually Transmitted Infections.*

1. INTRODUÇÃO

Ainda que os programas de tratamento da sífilis tenham êxito e que o diagnóstico seja de fácil acesso, esta doença ainda persiste como um grave problema de saúde no mundo (Machado *et al.*, 2018; Silva; Morato, 2019). A sífilis congênita (SC) é resultado da evolução crônica ocasionada pela infecção do *Treponema pallidum* na gestante, caracterizando-se pela transmissão por via placentária, ou no momento do parto (Lafetá *et al.*, 2016; Mesquita *et al.*, 2018; Brasil, 2019b). A SC acarreta em uma série de complicações para a mulher e para o conceito, tais como parto prematuro, baixa peso ao nascer, aborto espontâneo, além de sequelas graves ao recém-nascido. Somado a isso, o recém-nascido com sífilis onera em média três vezes mais ao Sistema Único de Saúde (SUS) quando comparado àqueles sem a doença, devido aos custos da internação em Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) (Brasil, 2019a; Silva *et al.*, 2020).

De forma geral, os estágios de evolução da sífilis são divididos em três: fase primária, com o aparecimento de cancro nas regiões genitais, fase secundária, marcada pelo surgimento de erupções cutâneas e fase terciária, que embora seja mais rara, causa danos ao sistema nervoso central e outros órgãos vitais do paciente. Na existência da disseminação hematológica do *T. pallidum*, há uma probabilidade significativa de que o agente etiológico seja transmitido para o feto, por meio de transmissão vertical. A incidência da transmissão vertical varia de 70 a 100% quando considerada as fases primárias e secundárias, e 30% na fase terciária (Brasil, 2014; Mesquita *et al.*, 2018; Brasil, 2019b). Ressalta-se que para que o tratamento da SC seja adequado, a terapêutica deve ser ajustada conforme o estágio da doença, com o uso da penicilina G benzatina 30 dias antes do parto, além disso, o parceiro deve ser tratado concomitantemente (Workowski, Bolan, 2015; Cooper, Sánchez, 2018; Brasil, 2019b).

Objetivando a erradicação da SC no país até o ano 2000, a Organização Mundial de Saúde (OMS), em conjunto com a Organização Pan-americana de Saúde (OPAS) e Ministério da Saúde (MS) do Brasil propuseram que os casos de sífilis na gravidez devem ser identificados por meio do exame sorológico treponêmico conhecido como *Venereal Disease Research Laboratory* (VDRL) a partir da primeira consulta de pré-natal até o momento do parto. Além disto, a partir deste programa da OMS, foi estabelecido como limite aceitável a incidência de até 0,5 novos casos para cada mil nascidos vivos (Brasil, 2017; Cardoso *et al.*, 2018; Brasil, 2019b). Para avaliar as proporções do problema, o MS, no ano de 2005, incluiu a SC na listagem nacional de doenças de notificação compulsória (Brasil, 2005; Saback *et al.*, 2019). Em 2011, o MS, instituiu a Rede Cegonha, objetivando a melhora da qualidade da assistência pré-natal e à criança, facilitando assim, o acesso ao diagnóstico e ao tratamento da sífilis na gestante, cuja implantação respeita o



critério epidemiológico, a taxa de mortalidade infantil e a razão da mortalidade materna (Machado *et al.*, 2018; Vilela *et al.*, 2019).

Apesar de todos os esforços contra a propagação da SC no mundo, o aumento do número de casos é ainda bastante expressivo. No Brasil, durante o período de 2014 a 2019, foram confirmados 120.123 novos casos de sífilis congênita. O Estado de Pernambuco, de acordo com dados coletados na plataforma online do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan), no período de 2014 a 2019, registrou 8.800 novos casos de SC, e apenas a Região Metropolitana do Recife (RMR) conta com 5.931, posicionando o estado 1º lugar no ranking Nordestino, e 3º lugar no nacional. Diante disso, o presente estudo objetivou descrever a incidência e o perfil epidemiológico da SC na RMR (Pernambuco, Brasil), no período de 2014 a 2019. A relevância da presente pesquisa se dá pelo fato de que a análise epidemiológica da SC na região supracitada pode contribuir para o melhor conhecimento da gravidade do problema, podendo proporcionar a elaboração de novas políticas públicas de assistência às gestantes acometidas, e por consequência, desenvolver ações que contribuam para a prevenção da transmissão vertical da sífilis.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo transversal retrospectivo descritivo do perfil epidemiológico da SC em oito cidades que compõem a RMR (Recife, Olinda, Jaboatão dos Guararapes, Paulista, Igarassu, Abreu e Lima, Goiana, Camaragibe e Ilha de Itamaracá), localizadas entre 8,5 e 47,1 km de distância da capital Recife. Os dados secundários foram obtidos a partir das fichas de notificação epidemiológica da SC disponíveis no DataSUS, na plataforma do Sistema Nacional de Agravos (SINAN). As variáveis quantitativas estudadas foram o grau de escolaridade materna, e idade, momento do diagnóstico, enquanto as qualitativas foram raça, e a realização ou não do pré-natal, sendo todos referentes aos casos notificados nos anos de 2014 a 2019. Os resultados foram tabulados no software Microsoft Excel®.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre os anos de 2006 a 2018, foram notificados, no Brasil, 170.546 casos de SC observando-se um aumento progressivo no número de casos da doença (Melo, 2019). Este aumento está relacionado à falta de matéria-prima para produção de penicilina (Rodrigues *et al.*, 2017) e a ausência de notificações por parte da vigilância epidemiológica (Melo *et al.*, 2018). Observou-se que entre os anos de 2014 e 2019 foram notificados, apenas na RMR 5.931 casos de SC, com aumento de aproximadamente 3,8% do número de casos entre os anos de 2016 e 2017, seguidos de uma redução de aproximadamente 13,5% em 2019 (Tabela 1). As reduções das taxas podem estar correlacionadas com esforços municipais para redução dos casos de sífilis, como as campanhas anuais preventivas e implantação dos testes rápidos nas unidades de saúde, possibilitando um aumento dos diagnósticos e tratamento efetivo da infecção (Guimarães *et al.*, 2018). Entretanto, apesar da queda considerável do número de casos em 2019, é importante salientar que os dados disponibilizados na plataforma online do SINAN nesse período se referem aos meses de janeiro a junho, podendo não refletir de forma total o panorama epidemiológico no referido ano.



Tabela 1 – Distribuição dos casos de sífilis congênita por ano na Região metropolitana do Recife (Pernambuco, Brasil)

Ano	Número de casos	%
2014	903	15,2
2015	970	16,3
2016	1059	17,8
2017	1287	21,6
2018	1265	21,3
2019	474	7,8
Total	5931	100

O perfil sociodemográfico das gestantes no presente estudo indica que a sífilis gestacional é predominante em jovens com faixa etária entre 15-19 anos (~36,57%; n= 1120), seguidos por 20-29 anos e 30-29 anos (~27,26%; n= 835), 40 anos ou mais (~2,71%; n=83) e 10-14 anos (~1,73% dos casos; n= 53). Nesse sentido, em virtude da idade das gestantes, e o grau de escolaridade, é demonstrado a necessidade do desenvolvimento de ações efetivas voltadas a seu controle com foco nesse público, assim como projetos de educação em saúde para a população (Melo, 2019; Vilela *et al.*, 2019). A predominância da SC em mulheres de faixa etária menor que 20 anos e baixa escolaridade (Tabela 2), têm sido associadas à dificuldade ao acesso à informação e a um menor nível de conhecimento no âmbito da promoção a saúde e meios de prevenção a infecções (Nonato *et al.*, 2015). Além disso, no mesmo período, verificou-se que a prevalência de raça se dá por parda (~66,40%), seguido por branca (~10,04%), e preta (~8,15%), e esses índices se caracterizam pelo fato de mulheres de cor, sendo elas pretas ou pardas, terem menor acesso aos sistemas de saúde, logo realizando um número menor de consultas pré-natal, o que dificulta o diagnóstico e o tratamento da doença (Theophilo *et al.*, 2018).

Tabela 2 – Distribuição dos casos de Sífilis congênita segundo a escolaridade da mãe entre 2014 e 2019 na Região Metropolitana do Recife (Pernambuco, Brasil)

Escolaridade	Total	%
Ignorado	1044	17,60
Analfabeta	49	0,83
1º ao 5º ano	524	8,83



5º ano completo	211	3,56
6 ao 9º ano do EF	1971	33,23
EF completo	384	6,47
EM incompleto	679	11,45
EM completo	980	16,52
ES incompleto	50	0,84
ES completo	33	0,56
Não se aplica	6	0,10
Total	5931	100

EF: Ensino fundamental; EM: Ensino médio; ES: Ensino superior.

Com relação ao momento do diagnóstico da SC, notou-se que ~45,96% (n=2726) das gestantes só o fizeram no momento do parto/curetagem, enquanto ~39,72% durante o pré-natal (n=2356). Destaca-se que o momento do parto não representa o ideal para diagnóstico da infecção, uma vez que o diagnóstico precoce possibilita incremento nas ações de prevenção da transmissão vertical e as possíveis comorbidades que podem estar associados com a mesma (Soeiro *et al.*, 2014). Entretanto, ~72,99% (n=4329) das gestantes realizaram o pré-natal, enquanto apenas ~13,20% (n=783) não o fizeram, conforme segue ilustrado na Figura 1. De acordo com Silva *et al.* (2019), apesar da realização do pré-natal nas gestantes, em aproximadamente 44,9% delas foi possível o diagnóstico apenas no momento do parto ou curetagem. Entretanto, Costa e colaboradores (2013), no estado do Ceará – Brasil, observou um aumento da realização do pré-natal, verificando que cerca de 2.077 (~70%) das pacientes realizaram os exames, enquanto Lafetá *et al.* (2016) evidenciou que a maioria das gestantes realizam o mínimo de consultas recomendadas, todavia, persiste o diagnóstico tardio.

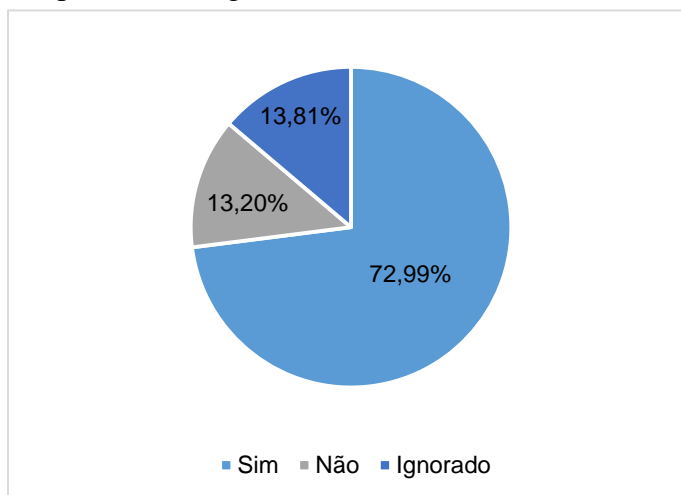




Figura 1 – Distribuição de casos de sífilis congênita segundo à realização do pré-natal entre 2014 e 2019 na Região Metropolitana do Recife (Pernambuco, Brasil).

De acordo com estudos realizados mundialmente, aproximadamente 70% a 90% dos casos diagnosticados de SC estão relacionados à falta de acompanhamento pré-natal ou sua execução de maneira incorreta. Dentre outros fatores de risco, estão a anamnese realizada de forma inadequada, exames de sorologia realizados em períodos incorretos, falha na interpretação de exames, dificuldade no reconhecimento da sintomatologia materna e a falta de comunicação entre equipe obstétrica e pediátrica (Vilela *et al.*, 2019).

4. CONCLUSÃO

O presente estudo evidenciou que a sífilis congênita apresenta um perfil de agravo recrudescente. Nos anos de 2014 a 2019, as taxas de incidência se mostraram acima do parâmetro nacional estabelecido. Além disso, os casos apontam baixa resolutividade na rede básica de saúde e na atenção à mulher, especificamente na assistência pré-natal, assinalando a ineficiência do controle da sífilis congênita. A ausência da uniformidade nas ações de vigilância relacionadas à investigação, notificação e registro, contribui para a baixa qualidade das informações. Desta forma, de acordo com tais resultados, identifica-se uma urgência na implantação de ações mais significativas para o controle desse agravo e que possibilitem a uniformização da conduta de vigilância.

5. REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, C. L. *et al.* Incidência da sífilis congênita no Brasil e sua relação com a Estratégia Saúde da Família. *Rev. de Saúde Pública*, v. 46, p. 479-486, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Transmissão vertical do HIV e Sífilis: estratégias para a redução e eliminação. Brasília: *Ministério da Saúde*, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 33, de 14 de Julho de 2005. Inclui doenças à relação de notificação compulsória, define agravos de notificação imediata e a relação dos resultados laboratoriais que devem ser notificados pelos Laboratórios de Referência Nacional ou Regional. *Diário Oficial da União*, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/ Aids e das Hepatites Virais. *Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Prevenção da Transmissão Vertical de HIV, Sífilis e Hepatites Virais*. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.
- BRASIL. *Boletim Epidemiológico- Sífilis*. Secretaria de Vigilância em Saúde- Ministério da Saúde, 2019a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST)*. Brasília, 122p, 2019b.
- CARDOSO, A. R. P. *et al.* Análise dos casos de sífilis gestacional e congênita nos anos de 2008 a 2010 em Fortaleza, Ceará, Brasil. *Cien. Saúde Colet.*, v. 23, n. 1, p. 563-574, 2018.
- COOPER, J. M.; SÁNCHEZ, P. J. Congenital syphilis. In: *Seminars in Perinatology*. WB Saunders, v. 42, n. 3, p. 176-184, 2018.



- COSTA, C. C. et al. Sífilis congênita no Ceará: análise epidemiológica de uma década. *Rev. Esc. Enferm. USP*, v. 47, n. 1, p. 152-159, 2013.
- GUIMARÃES, T. A.; ALENCAR, L. C. R.; FONSECA, L. M. B.; GONÇALVES, M. M. C.; SILVA, M. P. Sífilis em gestantes e sífilis congênita no Maranhão. *Arquivos de Ciências da Saúde*, v. 25, n. 2, p. 24-30, 2018.
- LAFETÁ, K. R. G.; et al. Sífilis materna e congênita, subnotificação e difícil controle. *Rev. bras. epidemiol.*, v. 19, n. 1, p. 63-74, 2016.
- MACHADO, C. J. et al. Sífilis congênita no Brasil em 2001/2002 e 2012/2013: estudo de causas múltiplas de óbito. *Rev. da Faculdade de Cien. Méd. de Sorocaba*, v. 20, n. 2, p. 98-103, 2018.
- MELO, E. M. F. S. *Sífilis Congênita no Brasil: cenário de 2006 á 2018*. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Enfermagem) – Faculdade de Ciências da Educação e Saúde, Centro Universitário de Brasília, Brasília, 2019.
- MESQUITA, A. L. M. et al. Discurso de profissionais de saúde acerca dos desafios ao conduzir pré-natal de gestantes com sífilis. *CIAIQ2018*, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2018.
- NONATO, S.M.; SOUTO, A.P.; GUIMARAES, M.D.C. Sífilis na gestação e fatores associados à sífilis congênita em Belo Horizonte - MG, 2010-2013. *Rev. Epi. Servi. Saúde*, Brasília, v. 24, n.4, p. 681-694, 2015.
- RODRIGUES, V.L.R.; OLIVEIRA, F.M.; AFONSO, T.M. Sífilis Congênita na Perspectiva de um Desafio para a Saúde Pública. In: *Congresso Internacional de Enfermagem*, Universidade de Tiradentes, v.1, n.1, 2017.
- SABACK, M. C. et al. Perfil epidemiológico da sífilis gestacional e congênita na Maternidade Ana Braga–Manaus, Amazonas. *Rev. Elet. Acervo Saúde*, v. 11, n. 5, p. 299-305, 2019.
- SILVA, M. E.; MORATO, C. B. A. Avaliação da prevalência de pacientes com sífilis atendidos em uma instituição de ensino superior em Recife. *Cad. de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 4, n. 2, p. 85, 2019.
- SILVA, M. J. N. D. et al. Congenital syphilis distribution in the State of Tocantins, Brazil, 2007-2015. *Epidemiol. Serv. Saúde*, v. 29, p. 477-486, 2020.
- SILVA, L. M. C. et al. Sífilis congênita no estado do Pará-Brasil, 2007 a 2016. *Rev. Elet. Acervo Saúde*, v. 24, e1003, 2019.
- SOEIRO, C. M. O.; MIRANDA, A. E.; SARACENI, V.; SANTOS, M. C.; SINESIO, T.; FERREIRA, L. C. L. Syphilis in pregnancy and congenital syphilis in Amazonas State, Brazil: an evaluation using database linkage. *Cad. Saúde Pública.*, v. 30, n. 4, p. 715-723, 2014.
- MELO, M. A. S. et al. Percepção dos profissionais de saúde sobre os fatores associados à subnotificação no Sistema Nacional de Agravos de Notificação (Sinan). *Rev. Adm. Saúde*, v. 18, n. 71, p. 1-17, 2018.
- THEOPHILO, R. L.; RATTNER, D.; PEREIRA, E. L. Vulnerabilidade de mulheres negras na atenção ao pré-natal e ao parto no SUS: análise da pesquisa da Ouvidoria Ativa. *Cien Saude Colet*, v. 23, p. 3505-3516, 2018.
- VILELA, L. S. C. A. L. et al. O pré-natal como ferramenta na prevenção da sífilis congênita: uma revisão integrativa da literatura/Pré-natal as a tool in the prevention of congenital syphilis: an integrating review of the literature. *Braz. J. Health Rev.*, v. 2, n. 3, p. 1616-1623, 2019.
- WORKOWSKI, K. A.; BOLAN, G. A. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. *MMWR. Recommendations and Reports: Morbidity and Mortality Weekly Report. Recommendations and Reports*, v. 64, n. RR-03, p. 1, 2015.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Vigilância e Epidemiologia em Saúde

INDICADORES DAS NOTIFICAÇÕES POR TUBERCULOSE: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS DOS CASOS NO BRASIL

E. P da SILVA¹, E. C. HOLANDA¹, E. P.FONTENELE¹, e S. M. de ANDRADE²

¹ Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia;

² Faculdade Santo Agostinho;

E-mail para contato: dudaps2804@gmail.com

RESUMO - Introdução: O Mycobacterium tuberculosis, causador da tuberculose, é uma bactéria que atinge principalmente o pulmão e pode levar o paciente a óbito, sendo assim, é considerado um agravo de saúde pública. Desse modo, o objetivo deste estudo foi analisar o perfil epidemiológico dos casos de Tuberculose no Brasil entre 2010 a 2019. Metodologia: Trata-se de um estudo epidemiológico, de cunho descritivo e com abordagem quantitativa, utilizando-se dados secundários, no qual foi realizada uma pesquisa epidemiológica dos casos de TB no País, no período de 2010 a 2019. Os dados foram coletados no site do DATASUS, a partir do SINAN. As variáveis analisadas foram: ano de notificação, região no Brasil, gênero, AIDS, uso de antirretroviral, formas clínicas, confirmação laboratorial, TDO, situação clínica encerrada e teste de sensibilidade. Resultado e Discussão: Foram notificados 877.929 casos de tuberculose. Destes identificou-se um número expressivo na região Sudeste e Nordeste. No que concerne aos casos de TB por sexo, o maior número de casos ocorreu no sexo masculino (n=602.498; 68,63%). No que tange a Aids e o uso de antirretroviral, foram 37,4% e 10,1% dos casos confirmados, respectivamente. Observou-se maior prevalência na forma pulmonar com 84,05%, com confirmação laboratorial (n=554.785; 63,2%), situação clínica encerrada a cura (n=560.859; 63,9%), com TDO (n=341.845; 38,94%) e no teste de sensibilidade sensível (n=58.199; 6,6%). Conclusão: Desse modo a TB é uma doença que merece atenção dos órgãos de saúde, principalmente por estar ligada a determinantes sociais.

Palavras-chave: Epidemiologia; Saúde Pública; Mycobacterium tuberculosis.

ABSTRACT - Introduction: Mycobacterium tuberculosis, which causes tuberculosis, is a bacterium that mainly affects the lung and can lead the patient to death, therefore, it is considered a public health problem. Thus, the objective of this study was to analyze the profile epidemiology of Tuberculosis cases in Brazil between 2010 to 2019. Methodology: This is an epidemiological study, of a descriptive nature and with a quantitative approach, using secondary data, in which an epidemiological survey of TB cases in the country was



carried out, from 2010 to 2019. Data were collected on the DATASUS website, from SINAN. The variables analyzed were: year of notification, region in Brazil, gender, AIDS, use of antiretroviral drugs, clinical forms, laboratory confirmation, DOT, closed clinical situation and sensitivity test. Result and Discussion: 877,929 cases of tuberculosis were reported, of which a significant number was identified in the Southeast and Northeast regions. With regard to TB cases by sex, the largest number of cases occurred in males ($n = 602,498$; 68.63%). Regarding AIDS and the use of antiretroviral drugs, 37.4% and 10.1% of the cases were confirmed, respectively. A higher prevalence was observed in the pulmonary form with 84.05%, with laboratory confirmation ($n = 554.785$; 63.2%), clinical situation ended with cure ($n = 560.859$; 63.9%), with ODD ($n = 341.845$; 38.94%) and in the sensitive sensitivity test ($n = 58.199$; 6.6%). Conclusion: Thus, TB is a disease that deserves attention from health agencies, mainly because it is linked to social determinants.

Keywords: Epidemiology; Public health; Mycobacterium tuberculosis.

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, o bacilo de Koch (ANDRADE et al.,2020). Essa se apresenta com curso subagudo ou crônico, proporcionando manifestações de sintomatologia indolente, de intensidade crescente, com períodos de remissão e bem-estar (KOZAKEVICH; SILVA,2015), podendo ser disseminada ou localizada, sob a forma pulmonar, ganglionar, renal ou óssea (TEXEIRA et al.,2017).

A maioria das pessoas infectadas possuem quadro conhecido como infecção latente por tuberculose (ILTb) (COSTA; GONÇALVES, 2018). Logo é comum há demora na procura por assistência médica em 66% dos acometidos. Porém, dentre a diversidade sintomatológica que pode ser manifestada durante a infecção, envolve tosse, hemoptise, dispnéia e perda ponderal (KOZAKEVICH; SILVA, 2015). E vários fatores estão associados a esta patologia, dentre eles a infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), diabetes, desnutrição, alcoolismo crônico e uso de fármacos imunossupressores (COSTA; GONÇALVES, 2018). Existe ainda uma extensa relação da tuberculose com más condições de vida e falta de saneamento básico (LIMA et al.,2020).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a tuberculose é a principal causa de morte por um único agente infeccioso. Em 2018, havia um número estimado de 10 milhões de novos casos de tuberculose e 1,5 milhões de pessoas morreram devido à doença no planeta (SILVA et al., 2020). Além disso, em torno de um terço dessas pessoas infectadas podem nunca ter sido diagnosticadas ou realizado tratamento, fato que ocasiona que a doença continue sendo uma das 10 principais causas de morte globalmente (LIMA et al.,2020).

No Brasil é prioridade do Ministério da Saúde o controle da TB, pois de acordo com dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) são registrados anualmente 85 mil casos novos de tuberculose, com cerca de 6 mil óbitos por ano (LIMA et al.,2020). Diante disso, este trabalho teve o objetivo de analisar o perfil epidemiológico dos casos de Tuberculose no Brasil entre 2010 a 2019.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo epidemiológico, de cunho descritivo e com abordagem quantitativa,



utilizando-se dados secundários. A pesquisa epidemiológica dos casos de Tuberculose foi realizada no Brasil, entre o período de 2010 a 2019. Os dados foram coletados no site do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), a partir do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). As informações estão na seção de informação de saúde Tabulador Genérico de Domínio Público (TABNET), na opção epidemiológica e morbidade. Devido ao estudo ter utilizado somente dados secundários de domínio público disponibilizados pelo Ministério da Saúde através do DATASUS não houve necessidade de submeter a Comitê de Ética em Pesquisa de acordo com a Resolução CNS 466/12.

As variáveis dependentes e independentes estudadas foram: ano de notificação, região no Brasil, gênero, AIDS, uso de antirretroviral, formas clínicas, confirmação laboratorial, TDO, situação clínica encerrada e teste de sensibilidade. As tabelas e gráficos foram calculados através de frequências absolutas e percentuais, sendo processada nos programas Microsoft Office - Microsoft Excel 2019 e Tab para Windows (TabWin) versão 4.14, aplicando análise estatística descritiva nas variáveis.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

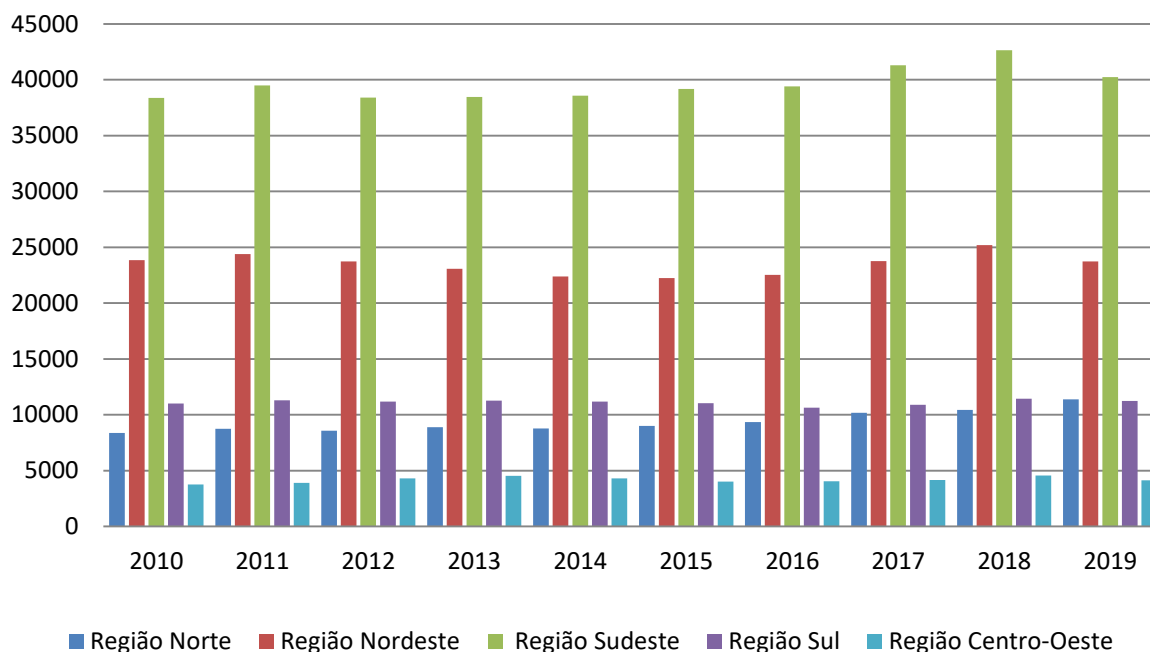


Figura 01: Casos confirmados de Tuberculose por ano de notificação segundo a região no Brasil, no período de 2010 a 2019.

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos e Notificação - SINAN Net. Dados exportados em julho de 2020, sujeito às alterações.

No Brasil, houve um número expressivo de casos de TB na região Sudeste e Nordeste entre os anos de 2010 a 2019, conforme o Figura 1. É possível que tal fato esteja relacionado com os Determinantes Sociais de Saúde (DSS), diagnóstico tardio, falha da adesão do tratamento e ao perfil de resistência aos medicamentos antituberculose (LIMA et al.,2020). Nesse estudo observou ainda a menor incidência da TB nas regiões Norte, Sul e Centro-Oeste (Figura 1) justificado pela



eficácia das políticas públicas de enfrentamento, combate e controle da doença nesses locais (ANDRADE et al.,2020).

Tabela 01- Casos confirmados de Tuberculose por gênero, Aids, uso de antirretroviral e formas clínicas no período de 2010 a 2019 no Brasil

Variáveis	Norte	Nordeste	Sudeste	Sul	Centro-Oeste	Brasil
Gênero	n	n	n	n	n	n(%)
Ign./Branco	2	35	10	7	5	59 (0,007)
Masculino	60.437	157.515	278.538	76.458	29.549	602.498 (68,63)
Feminino	33.290	77.466	117.701	34.753	12.162	275.372 (31,37)
Aids						
Ign./Branco	398	2.158	1.659	472	329	5.016 (5,93)
Sim	3.674	6.645	11126	8.570	1612	31.627 (37,41)
Não	4.972	17806	14244	7383	3.501	47.906 (56,66)
Antirretroviral						
Ign./Branco	14.451	46.319	48.988	8825	8.195	126.778 (14,44)
Sim	9.116	18.459	37.139	20.363	3;818	88.895 (10,12)
Não	70.162	170.238	310.122	82.030	29.703	662.256 (75,43)
Formas						
Ign./Branco	45	205	111	19	119	499 (0,057)
Pulmonar	80.223	202.135	330.109	89.718	35.731	737.917 (84,05)
Extrapulmonar	10.830	27.703	52.321	16.188	4.713	111.755 (12,73)
Pulmonar+Extrapulmonar	2.631	4.973	13.708	5.293	1.153	27.758 (3,16)

Legenda: Ign.-Ignorado

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos e Notificação - SINAN Net. Dados exportados em julho de 2020, sujeito às alterações

De acordo com os dados obtidos na Tabela 1, o total de casos em número absoluto para o sexo masculino durante o período analisado foi de 29.549(68,63%) notificações enquanto que para o sexo feminino foi de 12162(31,37%) casos confirmados. O sexo masculino é mais acometido por essa doença devido a fatores relacionados ao autocuidado, já que os homens se expõem mais a situações de risco, como o uso de álcool, fumo, drogas ilícitas, o que contribui para o agravamento do quadro clínico da doença (LIMA et al.,2020).

Ainda na Tabela 1, observa-se a associação entre o HIV e o bacilo de Koch, que constitui um sério problema de saúde pública podendo levar ao aumento da morbimortalidade, pois um paciente infectado com o vírus do HIV tem 45% mais chance de contrair o *Mycobacterium tuberculosis* (GIROTE et al.,2010). Porém, é importante destacar que a tuberculose é a mais



prevenível e curável de todas as infecções que acompanham a infecção pelo HIV (KOZAKEVICH; SILVA, 2015).

Segundo Cavalcante et al., (2019), a TB na forma pulmonar é a mais abrangente pelo bacilo. Nessa pesquisa a forma pulmonar predominou (n=35.731;84,05%)(Tabela 1). Dados estes que acompanham a tendência mundial, conforme a Organização Mundial de Saúde, cerca de 90% dos casos existentes são de forma pulmonar da doença, enquanto a forma extrapulmonar corresponde a cerca de 10% (GIROTE et al., 2010) Dessa maneira, a forma pulmonar possui grande importância epidemiológica devido a sua fácil transmissibilidade, uma vez que a maioria dos bacilos é absorvida pelos pulmões ao serem inalados com o ar e se instalarem neles ou nos gânglios linfáticos brônquicos proliferando-se de forma significativa (LIMA et al., 2020).

Tabela 02 - Casos confirmados de Tuberculose por confirmação laboratorial e situação clínica encerrada no período de 2010 a 2019 no Brasil

Variáveis	Norte	Nordeste	Sudeste	Sul	Centro-Oeste	Brasil
Confirmação laboratorial	n	n	n	n	n	n(%)
Sim	61.793	142.707	254.951	70.629	24.704	554.785 (63,2)
Não	31.936	92.309	141.298	40.589	17012	323.144 (36,8)
Situação encerrada						
Ign/Branco	9.546	21.861	35.135	7507	4.099	78.148 (8,9)
Cura	61.190	142.779	263.942	67.364	25.583	560.859 (63,9)
Abandono	10.214	25.564	48.297	13.889	4443	102.407 (11,7)
Óbito por tuberculose	2.299	8.812	14.056	3.729	1260	30.156 (3,4)
Óbito por outras causas	3.580	8.704	15.584	6.508	1290	36.296 (4,1)
Transferência	5.244	24.483	13.502	8462	3.914	55.605 (6,3)
TB-DR	907	1786	3430	1.788	182	8.093 (0,9)
Mudança de Esquema	479	445	787	874	113	2.698 (0,3)
Falência	32	125	167	74	9	407 (0,05)
Abandono Primário	238	457	1.349	1023	193	3.260 (0,4)

Legenda: Ign.-Ignorado; TB-DR- Tuberculose resistente a medicamentos.

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos e Notificação - SINAN Net. Dados exportados em julho de 2020, sujeito às alterações

Na análise dos dados da Tabela 2, percebe-se que sem a confirmação laboratorial correspondeu a 36,8 % (n=323.144) dos casos, o que nestes indivíduos, o diagnóstico torna-se mais difícil devido à capacidade de modificação dos aspectos clínicos, exames radiológicos atípicos, baixa sensibilidade da baciloscopia, cultura de escarro negativa e o crescente índice de tuberculose extrapulmonar no País. Assim, demanda-se um empenho maior do poder público no sentido de estruturar e equipar os serviços de atenção à saúde, com capacidade de atendimento e seguimento dos casos (OLIVEIRA et al., 2020).

Em relação ao abandono do tratamento, verifica-se na Tabela 2, 11,7 % dos casos, valor que é considerado acima do estabelecida como meta pelo Programa Nacional de Controle de



Tuberculose, que é de até 5%. Apesar de os tratamentos serem disponibilizados gratuitamente na rede pública, a dispensa das medicações e o seguimento do tratamento são realizados em locais distintos. Ademais, a longa duração do tratamento também favorece a falta de adesão (OLIVEIRA et al.,2020). Em consequência, estima-se o aumento do contágio, dos custos do tratamento, da morbimortalidade, e do surgimento de resistência às drogas (GIROTE et al.,2010).

Tabela 03 - Casos confirmados de Tuberculose por TDO e teste de sensibilidade no período de 2010 a 2019 no Brasil

Variáveis	Norte	Nordeste	Sudeste	Sul	Centro-oeste	Brasil
TDO	n	n	n	n	n	(n/%)
Ing./Branco	22.592	51.809	102.908	15.751	8299	201.359 (22,93)
Sim	33.333	89.348	153.369	45.079	20.715	341.845 (38,94)
Não	37.804	93.859	139.972	50.388	12.702	334.725 (38,13)
Teste de sensibilidade						
Ign/Branco	82.496	202.570	168.756	89.292	33.490	576.604 (65,7)
Resist Isoniazida	111	231	1.583	488	48	2.461 (0,3)
ResistRifampicina	53	149	467	125	24	818 (0,1)
Resit. Ison. e rif.	78	185	1158	338	35	1.794 (0,2)
Resist drogas 1ª linha	132	249	1293	264	91	2.029 (0,2)
Sensível	2.601	4.958	41.597	7082	1.961	58.199 (6,6)
Em andamento	696	1341	6.162	995	427	9.621 (1,1)
Não realizado	7.562	25.333	175.233	12634	5.640	226.403(25,8)

Legenda: Ign.-Ignorado;Ison.-Isoniazida;Rif.-Rifamicina;Resist.-Resistência.

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos e Notificação - SINAN Net. Dados exportados em julho de 2020, sujeito às alterações

No Brasil, o tratamento da TB na atenção básica é realizado através do tratamento diretamente observado (TDO) que funciona como um importante instrumento para diminuir a resistência aos medicamentos, incentivar a adesão terapêutica e reduzir o abandono. No TDO utiliza-se uma combinação de medicamentos por um período de seis meses. Entretanto, nessa pesquisa 334.725 das notificações não atenderam ao TDO, conforme a Tabela 3. Portanto, é importante identificar os principais problemas enfrentados durante o TDO no intuito de que sejam elaboradas e implantadas intervenções que contribuam para adesão ao tratamento e consequente declínio das taxas de morbidade e mortalidade relacionadas a essa patologia (CAVALCANTE et al.,2019).

4. CONCLUSÃO

A partir do estudo foi possível traçar o perfil epidemiológico da tuberculose no Brasil. Assim, constatou-se que esta doença atinge principalmente indivíduos do sexo masculino na forma pulmonar. Em relação aos portadores de HIV/Aids e o uso de antirretroviral indica nesse grupo o maior risco de disseminação da doença, tornando-os mais vulneráveis. Quanto à situação de encerramento verificou-se que o maior percentual foi o de cura, além de TDO não realizado, teste a sensibilidade a isoniazida e confirmação laboratorial. Além do mais, o maior número de casos



de TB ocorreu nas regiões do Nordeste e Sudeste. Assim, a TB é uma doença que merece atenção dos órgãos de saúde, principalmente porque essa enfermidade está muito ligada a determinantes sociais. Dessa forma, o reconhecimento desse perfil pode contribuir para que os serviços de saúde dêem assistência à população com maior vulnerabilidade para o adoecimento e desenvolvimento de ações que promovam a prevenção e o diagnóstico precoce por meio da busca de casos.

5. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, S. M. et al. Tuberculose em São Luís-Maranhão, Brasil: análise do comportamento epidemiológico entre 2010 e 2018. *Research, Society and Development*, 9 (6): e91963514, 2020.
- AIRTON, C. et al., Infecção latente por tuberculose em pacientes com doenças reumatológicas. *J Bras Pneumol.*,45(2):e20190023,2019.
- CAVALCANTE, A.M. SOUZA,D.A., GADELHA,K.M., ARRUDA,E.F., COSTA,R.S.L.. Tratamento da tuberculose: dificuldades enfrentadas por pacientes de uma unidade de saúde do acre. *enciclopédiaBiosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia*, 16 (30):1-11, 2019.
- COSTA, R. R. SILVA,M. R., GONÇALVES,I. C. Diagnóstico laboratorial da tuberculose: Revisão de literatura. *Rev. Med. Minas Gerais*, 28 (Supl 5): e-S280525,2018.
- GIROTI, S. K. O., BELEIR, A., MORENO,F. N.,SILVA,F. S. Perfil dos pacientes com tuberculose e os fatores associados ao abandono do tratamento. *Cogitare Enferm.*15(2):271-7, Abr/Jun.,2010.
- GUIMARÃES, R. M., LOBO, A.P., SIQUEIRA, E. A., BORGES, T. F. F., MELO, S. C.C.,Tuberculose, HIV e pobreza: tendência temporal no Brasil, Américas e mundo. *J Bras Pneumol* ; 38(4):511-517,2012.
- KOZAKEVICH, G .V., SILVA,R. M. Tuberculose: revisão de literatura. *Arq. Catarin Med.*44(4): 34-47,out-dez.,2015.LIMA, M.M.P. et al. Análise temporal e epidemiológica dos casos de tuberculose no estado do Piauí, Brasil. *Research, Society and Development*, 9(2), e160922252, 2020. ISSN 2525-3409.
- OLIVEIRA, E. H. et al., Aspectos epidemiológicos da coinfeção tuberculose/HIV: análise de uma década em Teresina, Piauí, Brasil. *Research, Society and Development*, 9(5):e35953137, 2020. ISSN 2525-3409.
- PINTO, T. A., ROSSONI, A. M.O., RODRIGUES, C. O., ROSSONI,M. D., TAHAN,T.T.. Diagnóstico da tuberculose em crianças: qual o papel do hemograma e das provas de atividades inflamatórias?. *Residência Pediátrica* ;7(supl 1):17-19,2017.
- SILVA, D. R., MELLO, F. C. Q., MIGLIORI, G. B. Série tuberculose 2020. *J BrasPneumol.* 2020;46(2):e20200027.
- TEIXEIRA, H.C. ABRAMO, C., MUNK,M. E. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. *J Bras Pneumol.*,33(3):323-334,2007.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Vigilância e Epidemiologia da Saúde

ARTRITE REUMATOIDE E COVID-19: IMPACTOS DO NOVO CORONAVÍRUS EM PACIENTES REUMATOLÓGICOS – UMA REVISÃO DE LITERATURA

L. F. CAETANO¹, E. F. SANTOS-JUNIOR¹, M. J. B. de M. RÊGO¹, M. C. PEREIRA¹, M. M. da ROSA¹, M. G. da R. PITTA¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica - Suely Galdino, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas.

E-mail para contato: lousefcaetano@gmail.com

RESUMO – A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória, autoimune e crônica, que atinge cerca de 1% da população mundial. A AR afeta indivíduos de todas as faixas etárias e de ambos os sexos, sendo as mulheres mais afetadas. Sua fisiopatologia é complexa, mas sabe-se que o infiltrado inflamatório e atuação de diversas citocinas e quimiocinas, em níveis elevados, são presentes na doença. Em dezembro de 2019, um novo coronavírus surgiu na China e em março de 2020, a Organização Mundial da Saúde declarou pandemia da COVID-19, doença causada pelo vírus. A patogênese da COVID-19 é desconhecida, porém estudos com pacientes infectados relatam um maior número de leucócitos e o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias no plasma. Diante disso, o presente trabalho objetivou entender os impactos da COVID-19 em pacientes com a AR. Para alcançar o objetivo proposto foi realizada uma busca de artigos nas bases de dados Pubmed, Science Direct e Scielo, utilizando descritores como “COVID-19”, “SARS-COV-2” e “rheumatoid arthritis”. Estudos demonstram que pacientes com AR podem ser mais propensos a se infectarem pelo coronavírus devido a implicações imunológicas causadas pela AR, podendo evoluir para a forma mais grave da doença. No entanto, correlações entre as doenças ainda são escassas e mais pesquisas são necessárias a fim de compreender as características clínicas, diagnóstico e tratamento voltados para os pacientes com doenças reumatológicas com a presença concomitante de COVID-19.

Palavras-chave: Artrite Reumatóide. Coronavírus. Doenças reumatológicas. SARS-COV-2.

ABSTRACT – Rheumatoid arthritis is an inflammatory, autoimmune and chronic disease that affects about 1% of the world population. RA affects individuals of all age groups and both sexes, with women being most affected. RA has a complex pathophysiology, but it is known that the inflammatory infiltrate and the performance of several cytokines and chemokines are present in the disease, which are at high levels. In December 2019, a new coronavirus emerged in China and in March 2020 the World Health Organization declared the COVID-19 pandemic, a disease caused by the virus. The pathogenesis of COVID-19 is unknown, but studies with infected patients



report a greater number of leukocytes and increased levels of pro-inflammatory cytokines in plasma. Therefore, this study aimed to elucidate the impacts of COVID-19 in patients with rheumatoid arthritis. To achieve the proposed objective, a search for articles was carried out in the databases Pubmed, Science Direct and Scielo, using descriptors such as “COVID-19”, “SARS-COV-2” and “rheumatoid arthritis”. Studies show that patients with RA may be more likely to become infected with the coronavirus due to the immunological implications caused by RA, and may progress to the most severe form of the disease. However, correlations between diseases are still scarce and more research is needed in order to understand the clinical characteristics, diagnosis and treatment aimed at patients with rheumatological diseases with the concomitant presence of COVID-19.

Keywords: Coronavirus; Rheumatoid arthritis; Rheumatological diseases; SARS-COV-2.

1. INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) caracteriza-se como uma doença inflamatória, autoimune, crônica e debilitante. Dentre os principais sintomas provocados pelos danos articulares, destacam-se a dor e a rigidez, além de uma maior sensibilidade das articulações afetadas (SINGH *et al.*, 2016). A AR atinge cerca de 1% da população mundial de ambos os sexos, sendo as mulheres 3 vezes mais acometidas que os homens, em qualquer faixa etária (JEKA *et al.*, 2012; FASSIO *et al.*, 2019).

A AR apresenta uma fisiopatologia complexa, e a doença pode ser dividida em duas fases de acordo com o período da doença e seu grau de acometimento. A primeira fase é a pré-artrite, na qual mediadores imunológicos sistêmicos, como anticorpos e citocinas, são facilmente detectados. Durante a fase de pré-artrite, o paciente não é acometido por um dano articular. A segunda fase é denominada de artrite reumatoide estabelecida, na qual ocorre um grave dano articular com inflamação crônica que formam as sinóvias, remodelação e danos a tecidos articulares a ele associado (HEARD *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2019). A sinovite é resultado da infiltração leucocitária no compartimento sinovial, que apresenta como características a neoangiogênese induzida por citocinas e condições de hipóxia, além de linfangiogênese insuficiente, limitando assim a saída celular (MCINNES; SCHETT, 2011).

O coronavírus é um dos principais patógenos que tem como alvo o sistema respiratório humano. Foi identificado no final de dezembro de 2019 em Wuhan, na China, após diagnóstico em um grupo de pacientes com pneumonia de etiologia desconhecida. Os relatórios iniciais identificaram um potencial surto de coronavírus e em fevereiro de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) nomeou a doença causada pelo vírus de “doença do coronavírus 2019” (COVID-19). Em março de 2020, com a doença se espalhando de maneira agressiva pelo mundo, a OMS declarou a mesma como pandemia (AHN *et al.*, 2020; ROTHAN; BYRAREDDY, 2020).

Dentre os sintomas mais comuns da COVID-19, destacam-se febre, tosse e fadiga, porém outros sintomas podem ser observados nos pacientes, incluindo dor de cabeça, dor de garganta e dispnéia. A patogênese da COVID-19 é amplamente desconhecida, mas estudos com pacientes infectados relatam o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias no plasma. Pesquisas demonstraram que em formas graves de COVID-19, foram observados níveis séricos elevados de citocinas, incluindo IL-2, IL-7, IL-10, G-CSF, MCP e TNF- α . Também foi relatado a presença de IL1- β , IL1RA, IL7, IL8, IL9, FGF2 básico, IFN γ e VEGFA (ROTHAN; BYRAREDDY, 2020; SHI *et al.*, 2020; SINGHAL, 2020; ZHAI *et al.*, 2020).

Sabe-se que a AR é um fator de risco para infecções graves, contribuindo para uma alta



morbimortalidade em pacientes quando comparados com a população em geral. Dentre as razões para maior suscetibilidade dos pacientes com AR, pode-se destacar a desregulação do sistema imunológico, presença de comorbidades associadas e o uso de medicamentos imunossupressores, como as drogas antirreumáticas modificadoras de doenças (DMARDs) (SONG *et al.*, 2020).

Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi entender os impactos da COVID-19 em pacientes com AR, pois as duas doenças implicam diretamente no sistema imunológico, gerando disfunção imune nos pacientes, além de apresentarem elevados níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias. Dessa forma, analisar casos relacionados a pacientes com AR que tiveram COVID-19, se faz necessário a fim de compreender se estes pacientes apresentam ou não um quadro mais grave devido a sua condição anteriormente estabelecida.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho trata-se de uma revisão de literatura e apresentou uma busca de artigos realizada nas bases de dados *Pubmed*, *Science Direct* e *Scielo*, utilizando descritores como “COVID-19”, “SARS-COV-2” e “rheumatoid arthritis”. Foram considerados artigos de 2020, visto que a COVID-19 se trata de uma doença emergente. Os critérios de inclusão foram estudos que correlacionavam a AR diretamente com a COVID-19. As principais razões para a exclusão foram estudos deficientes nos dados necessários para a análise e que não estavam dentro da área, além de revisões de literatura. Foram examinadas todas as listas de referência de estudos relevantes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fim de compreender se pacientes com doenças reumatológicas autoimunes são mais propensos a apresentar um agravamento quando infectados pela COVID-19, foram analisados estudos que realizaram o acompanhamento com esses pacientes. É importante destacar que alguns relatórios mostram que parece haver baixa incidência de infecção por COVID-19 em pacientes com doença reumática, porém para se ter a real incidência se faz necessário estudos com grandes coortes (SANTOS-MORENO *et al.*, 2020). Um total de 77 artigos foram encontrados durante as buscas. Foram excluídos 65 artigos com base na seleção de títulos e resumos. Portanto, apenas 11 artigos contemplaram os critérios de inclusão.

Cheng *et al.* (2020), acompanharam e descreveram as características clínicas de 5 pacientes com doença imunológica reumática com presença concomitante de COVID-19. Dentre esses pacientes, 4 apresentavam AR. O diagnóstico para COVID-19 destes pacientes foi dado através do teste RT-qPCR. No tocante aos pacientes de AR, 2 pacientes apresentaram agravamento da COVID-19. Dentre os achados, os estudos mostraram que as duas doenças se sobrepõem e também se influenciam em relação a patogênese e manejo farmacológico. Sabe-se que pacientes com AR frequentemente são tratados com medicamentos imunossupressores, como por exemplo os esteroides ou DMARDs. Sendo assim, a administração desses medicamentos e também a inibição da ativação das células T decorrente da patogênese da AR, podem contribuir para a maior frequência de infecções nesses pacientes (SONG *et al.*, 2020).

Monti *et al.* (2020), durante acompanhamento de 3 pacientes com AR que foram infectados pelo novo coronavírus, observaram que nenhum dos pacientes desenvolveram complicações respiratórias graves. Um estudo com 2 pacientes com AR, tratados com Rituximab, que foram infectados pelo novo coronavírus, apresentaram agravamento da COVID-19 e foram a óbito. Os autores relataram a presença de outras comorbidades que podem ter contribuído ainda mais para a letalidade da doença, além de apoiarem os riscos gerados pelo uso do medicamento em questão



(SCHULZE-KOOPS *et al.*, 2020). Em um relato de caso, Song *et al.* (2020) acompanharam uma paciente com AR que testou positivo para COVID-19. A paciente apresentou um quadro inicial de pneumonia e utilizava DMARDs para o tratamento da AR.

Com o intuito de registrar os casos de pacientes com doenças reumáticas diagnosticados com COVID-19, foi descrito as características demográficas e características clínicas de 600 pacientes de 40 países submetidos à Aliança Global de Reumatologia COVID-19 (C19-GRA), além de identificados os fatores associados à hospitalização por COVID-19. Dos 600 pacientes, 230 eram pacientes com AR e destes, 104 pacientes foram hospitalizados, trazendo mais uma vez uma possível associação de gravidade da doença em pacientes reumatológicos. No geral, os fatores associados a hospitalização com COVID-19, foram a idade avançada, presença de comorbidades e doses altas de prednisona (≥ 10 mg /dia) (GIANFRANCESCO *et al.*, 2020).

Uma outra pesquisa de acompanhamento de pacientes com AR mostrou que, dentre 68 pacientes envolvidos no estudo, 8 pacientes realizaram o teste RT-qPCR e apenas 1 caso foi positivo. O paciente estava fazendo uso de Metotrexato. Outros estudos revelaram que uma paciente que já fazia uso de Iguratimode, também testou positivo para COVID-19, mas não apresentou sintomas graves, porém foi possível observar que a mesma teve a presença prolongada do RNA viral mesmo após o desaparecimento dos sintomas. É sabido que as DMARDs podem afetar o curso da doença viral de maneira diferente, surgindo mais uma vez a preocupação com o risco de COVID-19 entre os pacientes que vem fazendo o uso de medicamentos antirreumáticos, visto que pacientes com COVID-19 apresentam um padrão de citocinas pró-inflamatórias semelhantes com as citocinas direcionadas no tratamento da AR (BABA *et al.*, 2020; ZOMALHETO; ASSOGBA; DOSSOU-YOVO, 2020).

Fredi *et al.* (2020) realizaram um estudo observacional com pacientes reumatológicos, entre eles, 24 dos 65 pacientes confirmados como positivos para COVID-19 apresentavam artrite reumatoide, dentre os quais, cinco chegaram a óbito. Diferente de outros estudos, os autores observaram durante a pesquisa que não houve uma diferença significativa quando comparada a gravidade em pacientes reumatológicos e o grupo controle. Sharmeen e colaboradores (2020) também relataram um estudo de caso com um paciente de AR que apresentou COVID-19, porém com sintomas mais leves.

Em grande parte dos estudos analisados, percebe-se uma associação entre pacientes com AR e casos mais graves de COVID-19, mas não se pode afirmar uma relação mediante a escassez e limitação de estudos, sendo estes muitas vezes relatos de casos envolvendo uma quantidade mínima de pacientes (QUARTUCCIO *et al.*, 2020). Porém é importante destacar que os efeitos dos medicamentos utilizados no tratamento de doenças reumáticas podem contribuir para um agravamento da COVID-19, pois afetam o processo viral (SHARMEEN *et al.*, 2020).

4. CONCLUSÃO

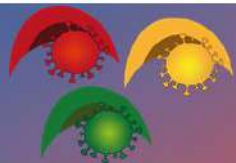
A pandemia de COVID-19 surpreendeu o mundo inteiro, e uma atenção especial se voltou aos pacientes que já possuíam alguma doença em curso. Diante disso, estudos específicos relacionando a AR e COVID-19 foram realizados para entender a gravidade da nova doença em pacientes com essa doença reumatológica. Pesquisas mostraram uma possível associação de gravidade da COVID-19 em pacientes com AR, dada possivelmente por alterações imunológicas. As correlações entre as doenças ainda são escassas, principalmente pela novidade trazida pela pandemia, porém, mais pesquisas são necessárias a fim de compreender o espectro de



características clínicas, bem como diagnóstico e abordagens no tratamento voltados para os pacientes com doenças reumatológicas com a presença concomitante de COVID-19.

5. REFERÊNCIAS

- AHN, D.; SHIN, H.; KIM, M.; LEE, S.; KIM, H.; MYOUNG, J.; KIM, B.; KIM, S. Current Status of Epidemiology, Diagnosis, Therapeutics, and Vaccines for Novel Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *J Microbiol Biotechnol*, v. 30, n. 3, p. 313-324, 2020.
- BABA, H.; KANAMORI, H.; OSHIMA, K.; SEIKE, I.; NIITSUMA-SUGAYA, I.; TAKEI, K.; SATO, Y.; TOKUDA, K.; AOYAGI, T. Prolonged presence of SARS-CoV-2 in a COVID-19 case with rheumatoid arthritis taking iguratimod treated with ciclesonide. *J Infect Chemother*, 2020.
- CHENG, C.; LI, C.; ZHAO, T.; YUE, J.; YANG, F.; YAN, Y.; LIU, X. COVID-19 with rheumatic diseases: a report of 5 cases, *Clin Rheumatol*, v. 39, n. 7, p. 2025-2029, 2020.
- FASSIO, A.; ADAMI, G.; GATTI, D.; ORSOLINI, G.; GIOLLO, A.; IDOLAZZI, L.; BENINI, C.; VANTAGGIATO, E.; ROSSINI, M.; VIAPIANA, O. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in patients with early rheumatoid arthritis results in acute changes of bone modulators. *Int Immunopharmacol*, v. 67, p. 487-89, 2019.
- GIANFRANCESCO, M.; HYRICH, K.L.; AL-ALDEY, S.; CARMONA, L.; DANILA, M.I.; GOSSEC, L.; IZADI, Z.; JACOBSON, L.; KATZ, P.; LAWSON-TOVEY, S.; MATEUS, E.F.; RUSH, S.; SCHMAJUK, G.; SIMARD, J.; STRANGFELD, A.; TRUPIN, L.; WYSHAM, K.D.; BHANA, S.; COSTELLO, W.; GRAINGER, R.; HAUSMANN, J.S.; LIEW, J.W.; SIROTICH, E.; SUFKA, P.; WALLACE, Z.S.; YASDANY, J.; MACHADO, P.M.; ROBINSON, P.C. Characteristics associated with hospitalisation for COVID-19 in people with rheumatic disease: data from the COVID-19 Global Rheumatology Alliance physician-reported registry. *Ann Rheum Dis*, p. 1-8, 2020.
- HEARD, B.J.; ROSVOLD, J.M.; FRITZLER, M.J.; EL-GABALAWY, H.; WILEY, J.P.; KRAWETZ, R.J. A computational method to differentiate normal individuals, osteoarthritis and rheumatoid arthritis patients using serum biomarkers. *J R Soc Interface*, v. 11, n. 97, 2014.
- JEKA, S.; ZUCHOWSKI, P.; KORKOSZ, M.; PROCHOREC-SOBIESZEK, M.; FISZ, J. J. Probing the use of fluorescence spectroscopy as a novel diagnostic tool in patients with rheumatoid arthritis: Applicability in the detection of secondary amyloidosis. *Med Sci Monit*, v. 18, p. 414-18, 2012.
- LIU, Y.; LIU, C.; LI, L.; ZHANG, F.; LI, Y.; ZHANG, S. High levels of antibodies to citrullinated alpha-enolase peptide-1 (CEP-1) identify erosions and interstitial lung disease (ILD) in a Chinese rheumatoid arthritis cohort. *Clin Immunol*, v. 200, p. 10-15, 2019.
- MCINNES, I.B.; SCHETT, G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis, *N Engl J Med*, v. 365, n. 23, p. 2205-2219, 2011.
- MONTI, S.; BALDUZZI, S.; DELVINO, P.; BELLIS, E.; QUADRELLI, V.S.; MONTECUCCO, C. Clinical course of COVID-19 in a series of patients with chronic arthritis treated with immunosuppressive targeted therapies. *Ann Rheum Dis*, 2020.
- QUARTUCCIO, L.; VALENT, F.; PASUT, E.; TASCINI, C.; DE VITA, S. Prevalence of COVID-19 among patients with chronic inflammatory rheumatic diseases treated with biologic agents or small molecules: A population-based study in the first two months of COVID-19 outbreak in Italy. *Joint Bone Spine*, 2020.
- ROTHAN, H.A.; BYRAREDDY, S.N. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak, *J Autoimmun*, 2020.



- SANTOS-MORENO, P.; CHAVEZ-CHAVEZ, J.; HERNÁNDEZ-ZAMBRANO, S.M.; RIVERA-TRIANA, D.P.; CASTIBLANCO-MONTAÑEZ, R.A.; AZA, A.; BUITRAGO-GARCIA, D.; VILLARREAL, L.; ROJAS-VILLARRAGA, A. Experience of telemedicine use in a big cohort of patients with rheumatoid arthritis during COVID-19 pandemic. *Ann Rheum Dis*, 2020.
- SCHULZE-KOOPS, H.; KRUEGER, K.; VALLBRACHT, I.; HASSELI, R.; SKAPENKO, A. Increased risk for severe COVID-19 in patients with inflammatory rheumatic diseases treated with rituximab. *Ann Rheum Dis*, 2020.
- SHARMEEN, S.; ELGHAWY, A.; ZARLASHT, F.; YAO, Q. COVID-19 in rheumatic disease patients on immunosuppressive agents. *Semin Arthritis Rheum*, v. 50, p. 680-686, 2020.
- SHI, Y.; WANG, G.; CAI, X.; DENG, J.; ZHENG, L.; ZHU, H.; ZHENG, M.; YANG, B.; CHEN, Z. An overview of COVID-19. *J Zhejiang Univ Sci B*, v. 21, n. 5, p. 343-360, 2020.
- SINGH, J.A.; SAAG, K.G.; BRIDGES, S.L.; AKL, E.A.; BANNURU, R.R.; SULLIVAN, M.C.; VAYSBROT, E.; MCNAUGHTON, C.; OSANI, M.; SHMERLING, R.H.; CURTIS, J.R.; FURST, D.E.; PARKS, D.; KAVANAUGH, A.; ODELL, J.; KING, C.; LEONG, A.; MATTESON, E.L.; SCHOUSBOE, J.T.; DREVLOW, B.; GINSBERG, S.; GROBER, J.; CLAIR, E.W.S.; TINDALL, E.; MILLER, A.S.; MCALINDON, T. 2015 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol*, v. 68, p. 1-26, 2016.
- SONG, J.; KANG, S.; CHOI, S.W.; SEO, K.W.; LEE, S.; SO, M.W.; LIM, D. Coronavirus Disease 19 (COVID-19) complicated with pneumonia in a patient with rheumatoid arthritis receiving conventional disease-modifying antirheumatic drugs. *Rheumatol Int*, v. 40, n. 6, p. 991-995.
- ZHAI, P.; DING, Y.; WU, X.; LONG, J.; ZHONG, Y.; LI, Y. The epidemiology, diagnosis and treatment of COVID-19. *Int J Antimicrob Agents*, v. 55, n. 5, 2020.
- ZOMALHETO; ASSOGBA; DOSSOU-YOVO. Impact of the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV2) infection and disease-2019 (COVID-19) on the quality of life of rheumatoid arthritis patients in Benin. *Egypt Rheumatol*, 2020.
- SINGHAL, T. A Review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19). *Indian J Pediatr*, v. 87, n. 4, 2020.



ÁREA DE SUBMISSÃO: Vigilância e Epidemiologia em Saúde

COVID-19 E A CRESCENTE CORRENTE ANTIVACINA: OS DESAFIOS DA IMUNIZAÇÃO NO BRASIL

G. C. C. BIVAR¹, M. E. SANTINI¹ e P. R. G. CARDOSO¹

¹ Centro Universitário Maurício de Nassau, Unidade de Boa Viagem, Recife, Pernambuco.

E-mail para contato: gabrielabivar@gmail.com

RESUMO – A *pandemia do SARS-COV-2 aumentou repentina e significativamente as hospitalizações por pneumonia com doença inflamatória sistêmica. Desde o seu surgimento, a COVID-19 afetou mais de 200 países, com mais de 10 milhões de casos e mais de 500 mil mortes. Até o momento, não existem evidências de qualidade que propiciem a prescrição de terapia farmacológica específica para o tratamento da COVID-19, a maior parte é utilizada em caráter “off-label”. O esforço mundial converge no desenvolvimento de uma vacina, entretanto, será grande o desafio para atingir imunidade coletiva, pois se observa crescente recusa e/ou hesitação de parte da população mundial, quanto a vacinação como meio imunopreventivo. Este estudo investiga o impacto do movimento anti-vacina sobre as intenções de uma possível vacinação contra COVID-19 no Brasil. Foi realizada uma revisão bibliográfica integrativa, com busca eletrônica na PubMed que retornou 12.148 artigos e aplicados critérios de inclusão e exclusão, restaram incluídos 29 artigos entre estudos intervencionais e descritivos. Os resultados revelaram que os motivos mais frequentes de hesitação se referem aos reais interesses da indústria e dos políticos, a não confiança na pesquisa, bem como as informações falsas que circulam nas redes sociais. Apesar da alta confiança geral na vacinação, é possível que o Brasil enfrente dificuldades para atingir a imunidade comunitária com a permanência da corrente anti-vacina e a recusa dos brasileiros a vacinar.*

Palavras Chave: COVID-19; SARS-COV-2; Vacina; Movimento Anti-Vacina; Recusa vacinal

ABSTRACT - *The SARS-COV-2 pandemic has suddenly and significantly increased hospitalizations for pneumonia with systemic inflammatory disease. Since its appearance, COVID-19 has affected more than 200 countries, with more than 10 million cases and more than 500 thousand deaths. So far, there is no quality evidence that provides the prescription of specific pharmacological therapy for the treatment of COVID-19, most of it is used in an “off-label” character. The global effort converges on the development of a vaccine, however, the greatest challenge will be to achieve a collective immunization, given the observed increase in refusal/hesitancy regarding vaccination as an immunopreventive method. This study investigates the impact of vaccine refusal movements on the intentions of a possible immunization against COVID-19 in Brazil. An integrative bibliographic review was performed, with an electronic search on*



PubMed that showed 12.148 articles and applied inclusion and exclusion criteria, remained included 29 articles between interventional and descriptive studies. The results revealed that the most frequent reasons for hesitation is in regard to the skepticism about the true interests of the industry and politicians, the lack of trust in research, as well as untrue information on social media. Despite the general high confidence in vaccination, it is possible that Brazil will have to face some challenges to achieve a collective immunity due to the remaining anti vaccine motion and the Brazilians' refusal to vaccinate.

Keywords: COVID-19; SARS-COV-2; Vaccine; Anti-Vaccine Movement; Vaccine Refusal

1. INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019, foram relatados na cidade de Wuhan, província de Hubei, China diversos casos de pneumonia por causa desconhecida. Na ocasião, realizada a análise do material genético isolado do vírus, descobriu-se que se tratava de um novo betacoronavírus, que fora inicialmente denominado 2019-nCoV pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (CHEN; GUO; PAN; ZHAO, 2020). A pandemia causada pelo agora denominado novo coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-COV-2) levou a um aumento significativo e repentino nas hospitalizações por pneumonia com doença inflamatória sistêmica daqueles mais susceptíveis. Desde o seu surgimento, a doença de coronavírus 2019 (COVID-19) já afetou mais de 200 países, resultando em mais de 10 milhões de casos e mais de 500 mil mortes confirmadas e os números não param de aumentar (WIERSINGA; RHODES; CHENG; PEACOCK et al., 2020).

O vírus tem um período de incubação de aproximadamente 7 dias e mais de 95% dos infectados que desenvolvem sintomas, os apresentam cerca de 11 dias após a infecção. É comum para aqueles mais graves serem internados com 7 dias do surgimento dos sintomas e, normalmente, estão em idade avançada ou apresentam alguma doença de base (GUAN; NI; HU; LIANG et al., 2020). O aspecto clínico observado, até o momento, na infecção pelo vírus SARS-CoV-2 é amplo, podendo ir de assintomático até uma pneumonia grave. Na maior parte dos casos, o quadro clínico costuma se apresentar como o de uma síndrome gripal, com os principais sinais e sintomas, fadiga, tosse seca, problemas respiratórios leves e febre persistente - ao contrário do que normalmente se observa em quadros de influenza - em média de 5 a 6 dias após a infecção. Contudo, tais sintomas podem evoluir para dispneia ou, em casos mais graves, Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) (ZHANG; DONG; CAO; YUAN et al., 2020; GUAN; NI; HU; LIANG et al., 2020).

Não existem, até o momento, evidências sólidas de alta qualidade que possibilitem a prescrição de uma terapia farmacológica específica para o tratamento COVID-19 e a maior parte das terapias que está sendo utilizada é em caráter “off-label”. O tratamento é feito por terapia de suporte como isolamento, repouso, oxigenoterapia, antibióticos e anticoagulantes, pois alguns pacientes evoluem rapidamente para SRAG, com risco de choque séptico, o que pode levar a falência múltipla de órgãos (HUANG; ZHANG; CHEN; ZHANG et al., 2020).

O esforço mundial converge não apenas na procura de um medicamento eficiente, como também no desenvolvimento de uma vacina que consiga induzir memória imunológica. Ainda assim, são grandes os desafios da vacinação para atingir imunidade de grupo ou imunidade coletiva (HABIBZADEH; STONEMAN, 2020). A imunização ativa por meio da vacinação é um mecanismo eficaz na prevenção das doenças infectocontagiosas imunopreveníveis. Do ponto de vista epidemiológico, as vacinas são consideradas uma tecnologia médica com excelente custo-benefício e altíssimo grau de resolutividade para a saúde pública (BEUTELS; VAN



DOORSLAER; VAN DAMME; HALL, 2003) que evita milhares de mortes ao ano, aumentando exponencialmente a expectativa de vida da população.

Ainda que a imunização seja efetiva e segura, nos últimos anos têm se observado uma recusa e/ou hesitação importante de parte da população, quanto a vacinação como meio imunopreventivo. Aliado a isso, a instabilidade e os atrasos nas vacinações têm levado a população a níveis de cobertura vacinal baixos e, conseqüentemente, a uma maior incidência de doenças antes erradicadas. Exemplo disso a epidemia de sarampo, que volta a alertar o Brasil (BRASIL, 2018). A dificuldade da imunização surge principalmente a partir de um movimento que vem ganhando destaque nos Estados Unidos, Brasil e no Mundo, conhecido por anti-vacina (SUCCI, 2018). Um estudo sobre a intenção de se vacinar na pandemia de H1N1 nos Estados Unidos, demonstrou que no início da pandemia em 2009 a intenção era de cerca de 50% da população, mas diminuiu para apenas 16% no ano seguinte, janeiro de 2010, demonstrando a baixa aderência da população à necessidade da vacinação (GIDENGIL; PARKER; ZIKMUND-FISHER, 2012).

Segundo o Ministério da Saúde (MS), (2018) as taxas de cobertura vacinal para a poliomielite e sarampo durante a campanha de vacinação de 2018 atingiram cerca de 40%, bem distante do valor considerado como ideal pela OMS, de pelo menos 95%. Pais que nunca tiveram contato com essas epidemias, acabam agindo de maneira inconsciente e despreocupada, não vacinando seus filhos. O que revela um possível erro de interpretação da população adulta sobre a vacinação e segue seu próprio instinto. Pesquisas descrevem como suposição para o aumento no número de surtos de algumas doenças preveníveis, a heterogeneidade da cobertura vacinal, alegando que indivíduos não vacinados tendem a estar em contato com outros indivíduos não vacinados, criando subpopulações vulneráveis, susceptíveis a novos surtos locais, tendendo a acreditar que as pessoas que possuem o comportamento hesitante ou antivacionista tendem a estar próximas (SALATHÉ; BONHOEFFER, 2008).

Nesse sentido, as melhores evidências científicas demonstram que a eliminação e/ou controle de doenças transmissíveis está intimamente ligada ao conceito de imunidade coletiva, imprescindível no controle da atual pandemia causada pelo vírus SARS-CoV-2 e fica evidente a necessidade de compreensão dos possíveis problemas que o Brasil pode enfrentar na eventual tentativa de realização da imunização da sua população. O presente trabalho tem como objetivo responder o seguinte questionamento: a crescente corrente anti-vacina representa um desafio à imunização contra o COVID-19 no Brasil?

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Tipo de Estudo

O método de pesquisa utilizado é uma revisão bibliográfica integrativa, com finalidade reunir e sintetizar os achados sobre o tema, de forma ordenada. Esse modelo de pesquisa tem como objetivo pautar um estudo embasado em conhecimentos previamente constituídos, criando novos conhecimentos embasados nos resultados anteriores. Por se tratar de um tema de teor sociocultural, intimamente ligado ao comportamento humano, foi escolhido como objetivo metodológico o tipo de busca exploratória. A técnica de abordagem escolhida para esta pesquisa foi o método qualitativo.

2.2. Procedimento de Pesquisa e Análise dos Dados

Para realização desta revisão de literatura seguiu-se os preceitos do estudo exploratório, por meio de uma extensa pesquisa bibliográfica em artigos científicos sobre o tema. Foi realizada uma pesquisa na base de dados PubMed, de janeiro a junho de 2020, através das palavras-chave em



português e sua correspondente em inglês: “VACINA E COVID-19”, “VACINA E SARS-COV”, “ANTI-VACINAÇÃO ou ANTI-VACINA”, “CONFIANÇA NA VACINA” e “RECUSA VACINAL”. A avaliação para a seleção dos artigos foi realizada por três avaliadores independentes. A seleção inicialmente foi realizada através de títulos, seguida por resumos, e quando selecionados, por leitura completa dos artigos.

2.3 Critérios de Inclusão e Exclusão

Para inclusão, as obras precisaram ser artigos completos ou portarias nacionais, publicados entre os anos de 2000 a 2020, somente redigidos nas línguas portuguesa e/ou inglesa, sendo a data final para o aceite de artigos 14 de julho de 2020, com isso, artigos relacionados à COVID-19 publicados após essa data não foram inclusos, pois estavam fora do período estabelecido para a pesquisa. Como critérios de exclusão, fuga do tema ou dos objetivos abordados, ou as obras na modalidade teses, monografias, resenhas e resumos foram excluídos. Obras não gratuitas e/ou não disponíveis em seu formato completo também não foram adicionadas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos moldes propostos, a busca eletrônica retornou 12.148 artigos a partir das palavras-chave supracitadas na base de dados PubMed. Após seleção manual, através de leitura dos títulos e aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, foram descartados aqueles que não contemplavam os critérios, chegando ao total de 12.119 artigos. O resultado final foi um total de 29 artigos incluídos entre estudos intervencionais e descritivos. Os dados podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1 – Artigos selecionados de acordo com os descritores e os critérios de seleção

Base de Dados	Descritores	Resultado inicial	Critério de Seleção				Leitura Final	Excluídos
			Período	Título	Abstract	Free-Access		
PubMed	Vaccine and COVID-19	1.444	1.444	94	11	8	8	1.436
	Vaccine and SARS-COV-2	1.123	1.123	61	6	5	5	1.118
	Anti-Vaccination	265	252	54	9	4	4	261
	Anti-Vaccine	192	180	39	7	3	3	189
	Vaccine Confidence	7.842	7.190	33	6	5	5	7.837
	Vaccine Refusal	1.282	1.210	76	8	4	4	1.278
TOTAL	-	12.148	11.399	357	47	29	29	12.119

As apostas para o desenvolvimento de uma vacina são altas e se não realizadas com todos os critérios de segurança e eficácia as repercussões podem ser devastadoras tanto para estudos, quanto para aqueles que forem vacinados. Como demonstrado por Schaefer et. al. (2020), embora busquem reduzir os danos causados pelo novo SARS-COV-2, é preciso balancear a ética, a segurança e a eficácia do novo produto e isso é desafiador. Estudar a progressão natural da doença pode ainda, garantir a aceleração deste desenvolvimento. Uma das principais dificuldades no desenvolver da vacina para COVID-19 é, com certeza, a principal população alvo, composta essencialmente de pacientes em idade avançada, aumentando os riscos de imunização dessa população. (PATEL; PATHAK; TIWARI; YATOO et al., 2020).

O desenvolvimento de uma vacina para a COVID-19 certamente será em tempo recorde. Após o início do surto, em janeiro de 2020, em abril do corrente ano já existiam 19 candidatas, sendo que 7 delas já estavam em testes em humanos – ainda que os resultados e efeitos dessas



vacinas não tenham sido divulgados no primeiro momento. Embora a estimativa seja de que uma vacina eficiente esteja pronta em até 18 meses, a OMS sugere que os países não dependam de uma vacina e busquem meios de redução da disseminação viral (MAHASE, 2020b). Uma das estratégias para a celeridade na produção da vacina está no conhecimento dos antígenos virais, o que possibilita a síntese da vacina mais rapidamente, sem a necessidade de utilizar um vírus inativado, como aponta Mahase (2020) inclusive com a participação do Brasil como local de testes da vacina produzida em Oxford (MAHASE, 2020a).

Quando pronta, é possível que a vacina passe por dificuldades de aceitação pela população. Como demonstrado por Khan et.al. (2020), já há especulações anti-vacinais nos países muçulmanos, como o Paquistão (KHAN; MALLHI; ALOTAIBI; ALZAREA et al., 2020). E não é difícil de entendê-los. A necessidade urgente da criação de uma vacina pode fazer com que empresas e pesquisadores sigam por caminhos dúbios ética e cientificamente, pois alguns estudos não duram mais do que três semanas na Fase 1, seguindo direto para a Fase 2 de desenvolvimento, o que normalmente demoraria meses ou anos. É possível que os candidatos a participantes não sejam realmente voluntários e dados podem ser omitidos com facilidade (ISERSON, 2020). Como demonstrado por FADDA, et.al. (2020), a população confia em vacinas, pois as mesmas demoram anos no processo de produção, mas em um produto desenvolvido em tempo recorde, é possível que essa adesão caia. Somado a isso, é notório o aumento da divulgação de informações falsas sobre vacinas pelos movimentos contrários a vacinação. Com a velocidade da comunicação, uma vez estabelecido o entendimento do cidadão, é difícil fazê-lo entender sobre os benefícios e segurança vacinal (FADDA; ALBANESE; SUGGS, 2020).

A ascensão dos movimentos anti-vacinação no mundo ocidental representa uma terrível ameaça à saúde e à imunidade coletiva. Recentemente pessoas de todas as idades foram vítimas de surtos de sarampo, uma das mais notáveis doenças "eliminadas" que retornaram como consequência direta de não se atingir a porcentagem ideal de cobertura. Esses surtos não apenas pressionam os sistemas nacionais de saúde, mas também causam vítimas fatais. Como demonstrado por Hussain, et.al. (2018), mesmo país favoráveis a vacinação, podem ser confundidos pelo debate em andamento e podem questionar suas escolhas, além do mais, aqueles mais carentes de informações são os mais susceptíveis (HUSSAIN; ALI; AHMED; HUSSAIN, 2018).

A Internet é um local bastante suscetível para informações falsas. Os movimentos anti-vacinas costumam inundar a plataforma com as mais diferentes formas de mensagens, como indica ISAACS (2019). Embora o público ainda tenha um ceticismo por informações online, é notório o crescimento destas teorias conspiratórias (ISAACS, 2019). Johnson, et.al. (2020) mostra em sua pesquisa em uma rede social (Facebook), que a expressão anti-vacina é ascendente, desafiadora e tem uma maior taxa de crescimento quando comparada aos grupos em que se discute a pró-vacinação. Os grupos antivacinação costumam criar teorias conspiratórias e enredos facilmente compreendidos pelos indecisos, cativando essa parcela da população, como observado em 2019 e o surto de sarampo, o que pode trazer complicações para uma possível vacina contra a COVID-19 (JOHNSON; VELÁSQUEZ; RESTREPO; LEAHY et al., 2020).

Durante uma pandemia é esperado que a população esteja mais receptiva a vacinas, porém não foi isso o observado por MEGGET (2020). Quando pesquisado em Nova York com um total de mil participantes se eles receberiam uma vacina, apenas 59% foi positivo e apenas 53% vacinariam seus filhos. É esperado que a comunidade anti-vacinação se prenda a tudo que dê errado no desenvolvimento da vacina para COVID-19 e, assim, ganhe força. Como citado, "COVID-19 desaparecerá antes do movimento anti-vacinação". Ainda assim, é preciso ter ciência

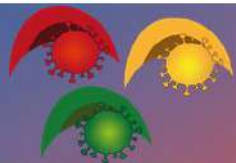


que a vacinação não é apenas uma questão de direito individual, mas sim uma estratégia de saúde comunitária (MEGGET, 2020). Como demonstra Jolley; Douglas (2014) no centro do movimento de conspiração anti-vacinas está o argumento de que grandes empresas farmacêuticas e governos estão encobrendo informações para atingir seus próprios objetivos. De acordo com as teorias mais populares, as empresas farmacêuticas têm lucros tão grandes com as vacinas que subornam os pesquisadores para falsificar seus dados, encobrir evidências dos efeitos colaterais nocivos das vacinas e aumentar as estatísticas sobre a eficácia da vacina (JOLLEY; DOUGLAS, 2014).

A vacinação oferece muitos benefícios econômicos e de saúde para a sociedade e a comunicação é essencial para garantir sua confiança. Tem se observado taxas de vacinação abaixo do esperado tanto em países mais ricos, quanto nos em desenvolvimento, de acordo com a pesquisa apresentada por Hardt (HARDT; SCHMIDT-OTT; GLISMANN; ADEGBOLA et al., 2013). De acordo com Larson et. al. (2015), a confiança na vacinação é dinâmica e contextual e depende das percepções da população frente a competência e motivação do fabricante e/ou indústria farmacêutica, pesquisadores e profissionais de saúde. A confiança na vacina não é só um fenômeno individual, mas também social e político. A Nigéria, por exemplo, foi palco de um dos mais significativos episódios de crise de confiança em vacinas entre 2003 e 2004, prejudicando a vacinação da Poliomielite. Isso repercutiu em um surto na própria Nigéria e em três continentes, com um prejuízo financeiro de aproximadamente US\$ 500 milhões e prejuízo social com mais de 1000 casos confirmados. Outros países como Reino Unido, Grécia e Paquistão também enfrentaram ou enfrentam recusa vacinal, seja por questões de confiança ou políticas (LARSON; SCHULZ; TUCKER; SMITH, 2015).

Estas crenças são endêmicas em vários países. Nos Estados Unidos cerca de 3% das crianças tem isenções de vacinação e esse número pode saltar para 20% a depender da comunidade. Em um estudo realizado no Reino Unido, os pais que acreditavam nas teorias de conspiração anti-vacina eram menos propensos a vacinar uma criança (STEIN, 2017). No Brasil o movimento vem ganhando força. Como descrito por Mendonça et al., (2010), na cidade de Teresina-PI, adolescentes e adultos jovens possuem pouca informação sobre doenças imunopreveníveis, mas o estudo indica que tal fato decorre principalmente da maneira inadequada que o assunto é abordado (MENDONÇA; DE ARAÚJO, 2010). Por sua vez, Barbieri et al., (2017) mostra que os pais que vacinaram seus filhos, em São Paulo, sentem como um dever parental a realização da vacinação. Enquanto a comunidade científica trabalha para a criação de uma vacina contra a COVID-19, do outro lado um pequeno e barulhento grupo anti-vacina está mobilizado e atuando contra. Os ativistas estão propagando narrativas estranhas: eles dizem falsamente que as vacinas contra o coronavírus serão usadas para implantar microchips nas pessoas, por exemplo, e afirmam falsamente que uma mulher que participou de um teste de vacina no Reino Unido morreu. Em abril, alguns exibiram cartazes com slogans anti-vacinais em comícios na Califórnia para protestar contra o bloqueio. Na semana passada, um vídeo do YouTube, agora excluído, promovendo teorias da conspiração sobre a pandemia e afirmando (sem evidências) que as vacinas “matariam milhões” recebeu mais de 8 milhões de visualizações, como publicado na Nature (BALL, 2020).

No Brasil, em um estudo feito por Brown, et. al. (2018) a cobertura da vacina contra sarampo, caxumba e rubéola vem caindo constantemente desde 2013, causando preocupações com a formação de bolsões de pessoas não imunizadas. Um fator persistente na relutância da vacina é a questão da desconfiança - desconfiança no produto (incluindo informações sobre a vacina), no provedor, no formulador de políticas e na política envolvente. A consequência dessa desconfiança - não aceitar a vacinação - tem impactos negativos na saúde pública e custos significativos, como no caso da Iniciativa Global de Erradicação da Poliomielite. Além da desconfiança, também foi



notado que o desconforto do filho em tomar uma vacina pode ser um fator retardante para os pais. Dados de um estudo mostraram que de 1000 participantes com filhos, muitos hesitariam e 6 foram completamente contrários à vacinação e o maior percentual de motivos de hesitação foi atribuído a questões de confiança. Ainda nesse estudo, os menos propensos à vacinação são adultos jovens abaixo dos 25 anos, pais solteiros, com menor renda familiar e menor nível de escolaridade (BROWN; SPERANDIO; TURSSI; LEITE et al., 2018).

Para Badur et.al. (2020) recuperar a confiança na vacinação é essencial. A vacinação é uma das maiores histórias de sucesso da medicina, eficaz na redução da prevalência e redução da mortalidade da população. Para o grupo, o planejamento da comunicação não deve se limitar ao gerenciamento de crises, deve ser contínuo, fornecendo proativamente mensagens direcionadas às preocupações públicas cruciais, levando em consideração as características sociais e culturais, bem como as influências da localização geográfica. Apenas dessa forma é possível restaurar a incerteza causada por essa corrente anti-vacinação e a vacina da COVID-19, quando pronta, ter sucesso (BADUR; OTA; ÖZTÜRK; ADEGBOLA et al., 2020). Inclusive, como proposto por Harrison (2020), é fundamental que o estudo da vacina para COVID-19 tenha bons resultados e só seja colocada em prática com toda a eficácia e segurança, pois o movimento contrário poderá ganhar força com o menor dos equívocos e viraria uma catástrofe (HARRISON; WU, 2020).

4. CONCLUSÃO

É notório que o avanço do pensamento anti-vacina traz para a sociedade o aumento do risco de ressurgimento de doenças anteriormente erradicadas. Há teorias conspiratórias em todo mundo, desde países ricos aos em desenvolvimento. No Brasil, essa corrente é responsável por disseminar informações irreais e é observada uma queda significativa na cobertura vacinal do país. Os principais fatores que levam a população a não acreditar nas vacinas são os reais interesses da indústria e dos políticos, a não confiança na pesquisa, bem como a quantidade de informações falsas que circulam massivamente nas redes sociais e atingem as mais variadas classes socioeconômicas. Ainda assim, aqueles mais propensos a não vacinar, ao menos no Brasil, são os jovens, pais solteiros, com menor remuneração e desenvolvimento educacional. Estes fatores podem ser determinantes caso uma possível vacina para a COVID-19 seja desenvolvida. É certo que o vírus circulará por bastante tempo nos países mais afetados e somente uma cobertura vacinal efetiva será capaz de reduzi-la, diminuindo os danos causados pela permanência do vírus. É possível que o Brasil encontre um caminho difícil para atingir a cobertura vacinal e imunidade comunitária se o pensamento anti-vacina continuar sendo disseminado e os brasileiros se recusarem a vacinar.

5. REFERÊNCIAS

- BARBIERI, Carolina Luisa Alves; COUTO, Márcia Thereza; AITH, Fernando Mussa Abujamra. A (não) vacinação infantil entre a cultura e a lei: os significados atribuídos por casais de camadas médias de São Paulo, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 33, n. 2, e00173315, 2017.
- BADUR, S.; OTA, M.; ÖZTÜRK, S.; ADEGBOLA, R. et al. Vaccine confidence: the keys to restoring trust. *Hum Vaccin Immunother*, 16, n. 5, p. 1007-1017, May 2020.
- BEUTELS, P.; VAN DOORSLAER, E.; VAN DAMME, P.; HALL, J. Methodological issues and new developments in the economic evaluation of vaccines. *Expert Rev Vaccines*, 2, n. 5, p. 649-660, Oct 2003.
- BROWN, A. L.; SPERANDIO, M.; TURSSI, C. P.; LEITE, R. M. A. et al. Vaccine confidence



- and hesitancy in Brazil. *Cad Saude Publica*, 34, n. 9, p. e00011618, 09 2018.
- CHEN, J. Pathogenicity and transmissibility of 2019-nCoV-A quick overview and comparison with other emerging viruses. *Microbes Infect*, 22, n. 2, p. 69-71, 03 2020.
- CHU, D. K.; AKL, E. A.; DUDA, S.; SOLO, K. et al. Physical distancing, face masks, and eye protection to prevent person-to-person transmission of SARS-CoV-2 and COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*, 395, n. 10242, p. 1973-1987, 06 2020.
- FADDA, M.; ALBANESE, E.; SUGGS, L. S. When a COVID-19 vaccine is ready, will we all be ready for it? *Int J Public Health*, Jun 2020.
- GUAN, W. J.; NI, Z. Y.; HU, Y.; LIANG, W. H. et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med*, 382, n. 18, p. 1708-1720, 04 2020.
- HABIBZADEH, P.; STONEMAN, E. K. The Novel Coronavirus: A Bird's Eye View. *Int J Occup Environ Med*, 11, n. 2, p. 65-71, 04 2020.
- HARDT, K.; SCHMIDT-OTT, R.; GLISMANN, S.; ADEGBOLA, R. A. et al. Sustaining Vaccine Confidence in the 21st Century. *Vaccines (Basel)*, 1, n. 3, p. 204-224, Jun 2013.
- HARRISON, E. A.; WU, J. W. Vaccine confidence in the time of COVID-19. *Eur J Epidemiol*, 35, n. 4, p. 325-330, Apr 2020.
- HUANG, H.; ZHANG, M.; CHEN, C.; ZHANG, H. et al. Clinical Characteristics of COVID-19 in patients with pre-existing ILD: A retrospective study in a single center in Wuhan, China. *J Med Virol*, Jun 2020.
- HUSSAIN, A.; ALI, S.; AHMED, M.; HUSSAIN, S. The Anti-vaccination Movement: A Regression in Modern Medicine. *Cureus*, 10, n. 7, p. e2919, Jul 2018.
- ISAACS, D. Vaccine hesitancy and anti-vaccination movements. *J Ped Child Health*, 55, n. 11, p. 1293-1294, Nov 2019.
- ISERSON, K. V. SARS-CoV-2 (COVID-19) Vaccine Development and Production: An Ethical Way Forward. *Camb Q Healthc Ethics*, p. 1-10, Jun 2020.
- JOHNSON, N. F.; VELÁSQUEZ, N.; RESTREPO, N. J.; LEAHY, R. et al. The online competition between pro- and anti-vaccination views. *Nature*, 582, n. 7811, p. 230-233, 06 2020.
- JOLLEY, D.; DOUGLAS, K. M. The effects of anti-vaccine conspiracy theories on vaccination intentions. *PLoS One*, 9, n. 2, p. e89177, 2014.
- KHAN, Y. H.; MALLHI, T. H.; ALOTAIBI, N. H.; ALZAREA, A. I. et al. Threat of COVID-19 Vaccine Hesitancy in Pakistan: The Need for Measures to Neutralize Misleading Narratives. *Am J Trop Med Hyg*, Jun 2020.
- LARSON, H. J.; SCHULZ, W. S.; TUCKER, J. D.; SMITH, D. M. Measuring vaccine confidence: introducing a global vaccine confidence index. *PLoS Curr*, 7, Feb 2015.
- MAHASE, E. Covid-19: What do we know so far about a vaccine? *BMJ*, 369, Apr 2020b.
- MEGGET, K. Even covid-19 cannot kill the anti-vaccination movement. *BMJ*, 369, p. m2184, 06 2020.
- MENDONÇA, R. E. C.; DE ARAÚJO, T. M. [Analysis of scientific production on the usage of contraceptive methods by adolescents]. *Rev Bras Enferm*, 63, n. 6, p. 1040-1045, 2010 Nov-Dec 2010. PATEL, S. K.; PATHAK, M.; TIWARI, R.; YATOO, M. I. et al. A vaccine is not too far for COVID-19. *J Infect Dev Ctries*, 14, n. 5, p. 450-453, May 2020.
- SALATHÉ, M.; BONHOEFFER, S. The effect of opinion clustering on disease outbreaks. *J R Soc Interface*, 5, n. 29, p. 1505-1508, Dec 2008.

Realização

PPG  **UFPE**
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica



PROPESQ

PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS
DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

ISG 
Instituto
Suely Galdino