

**4° EBIT**



**ENCONTRO BRASILEIRO PARA  
INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

**ANAIS DO 4° ENCONTRO BRASILEIRO  
PARA INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

**TEMA: *INTERDISCIPLINARIDADE NA PRODUÇÃO  
DE INSUMOS ESTRATÉGICOS DE SAÚDE***

*Organização:*

*Maira Galdino da Rocha Pitta  
Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo  
Alexandre Stamford da Silva  
Breno Caldas de Araújo*

Copyright (c) by **Organizadores**

Todos os direitos reservados aos Organizadores

**Maira Galdino da Rocha Pitta**  
**Moacyr Jesus Barreto de Melo Rego**  
**Alexandre Stamford da Silva**  
**Breno Caldas de Araujo**

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Encontro Brasileiro para Inovação Terapêutica (4. : 2016: Recife, PE).**

**4º Encontro Brasileiro para Inovação Terapêutica:  
Interdisciplinaridade na Produção de Insumos Estratégicos de Saúde/  
[organização]: Maira Galdino da Rocha Pitta... [et.al.] – Recife:  
Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, 2016.**

**958 p.: il. ; CD ROM**

**ISSN: 2318-3926**

**1. Terapêutica 2. Saúde I. Pitta, Maira Galdino da Rocha (org.) II.  
Título**

**615.5 CDD (22.ed.)**

## APRESENTAÇÃO

Com o tema “Interdisciplinaridade na produção de insumos estratégicos de saúde”, o 4o EBIT alcançou seu objetivo de continuar orientando o desenvolvimento de políticas públicas, conhecimentos e tecnologias que possam contribuir para o fortalecimento do complexo industrial da saúde e o bem-estar da população brasileira.

As atividades do 4º EBIT incluíram: minicursos, conferências e apresentações de trabalhos científicos, além de mesas redondas, debates e outros espaços de intenso intercâmbio entre os saberes. Desta forma, através de integração entre diferentes setores interdisciplinares, alcançou-se a construção de conhecimentos, mecanismos e estratégias inovadoras e originais para debelar os obstáculos ainda existentes no complexo industrial da saúde em âmbitos regional e nacional.

De abrangência nacional, o Encontro reuniu 328 participantes, constituído de pesquisadores, alunos de graduação e pós-graduação; gestores públicos, sobretudo do Sistema Único de Saúde e profissionais da área de saúde. Além do relevante tema abordado: “Interdisciplinaridade na produção de insumos estratégicos de saúde”, podemos atribuir o sucesso do 4o EBIT também aos eventos que ocorreram em paralelo, como a 3ª Jornada para o Desenvolvimento da Economia da Saúde de Pernambuco - JODESPE e o 2º Workshop INOVAPE. Os eventos em paralelo ocorreram em decorrência de importantes articulações entre pesquisadores de Pernambuco com o Ministério da Saúde e a Secretaria Estadual de Ciência, Tecnologia e Inovação de Pernambuco.

Os participantes que submeteram trabalhos científicos para apresentação e publicação corresponderam a 80,1% do total de congressistas. Adicionalmente, o 4º EBIT apresentou resultados para a Estratégia Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação 2016-2019 do MCTIC, consolidando-se como uma importante articulação para desenvolvimento tecnológico em insumos para a saúde e avaliação de impactos sobre a sociedade.

Os Anais do Encontro Brasileiro para Inovação Terapêutica - EBIT compõem publicação periódica de resumos expandidos e artigos inéditos de trabalhos científicos apresentados durante o EBIT. Esta quarta edição é composta ao todo por 161 trabalhos científicos aceitos para publicação e apresentação no 4o EBIT. Os resumos e artigos, aqui reunidos, contemplaram o desenvolvimento de fármacos, medicamentos e outros insumos prioritários para a saúde, bem como para a gestão de políticas públicas voltadas para o setor saúde.

Maira Galdino da Rocha Pitta  
Presidente do 4º EBIT

## **PRESIDENTE**

Maira Galdino da Rocha Pitta

## **ORGANIZADORES**

Maira Galdino da Rocha Pitta  
Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo  
Alexandre Stamford da Silva  
Breno Caldas de Araújo

## **COMISSÃO CIENTÍFICA**

Adriana Falângola Bezerra (PPGGES/UFPE)  
Armando Silva da Cunha Jr (UFMG)  
Breno Ramos Sampaio (PPGGES/UFPE)  
César Augusto Souza de Andrade (PPGIT/UFPE)  
Fernando Gusmão (IMIP)  
Francisco de Sousa Ramos (PPGGES/UFPE)  
Inês Costa (SES-PE)  
Ivan da Rocha Pitta (PPGIT/UFPE)  
Jonatas Ferreira (PPGS/UFPE)  
José Lamartine Soares Sobrinho (PPGIT/UFPE)  
José Ricardo Bezerra Nogueira (PPGGES/UFPE)  
Karina Perrelli Randau (PPGIT/UFPE)  
Luiz Alberto Lira Soares (PPGIT/UFPE)  
Marcelo Zaldini (PPGIT/UFPE)  
Mareni Rocha Farias (UFSC)  
Maria Danielly Lima de Oliveira (PPGCB/UFPE)  
Maria do Carmo Alves de Lima (PPGIT/UFPE)  
Marina Galdino da Rocha Pitta (PPGIT/UFPE)  
Mauro Silveira de Castro (UFRS)  
Michelly Cristiny Pereira (PPGIT/UFPE)  
Paulo Guilherme de Melo Filho (PPGGES/UFPE)  
Paulo Henrique Pereira de Meneses Vaz (PPGGES/UFPE)  
Raul da Mota Silveira Neto (PPGGES/UFPE)  
Roberta de Moraes Rocha (PPGGES/UFPE)  
Roseane Lemos (SES-PE)  
Suely Arruda Vidal (PPGGES/UFPE)  
Tatiane Almeida de Menezes (PPGIT/PPGGES/UFPE)  
Umbelina Cravo Teixeira Lagiola (PPGGES/UFPE)

## **COMISSÃO DE RESUMOS**

Marina Ferraz Cordeiro  
Sayonara Maria Calado Gonçalves  
Wagner Luis Mendes de Oliveira  
Sabrina Stefanne Barboza  
Kamyla Conceição Gomes Nascimento  
Janilson José da Silva Junior

## **COMISSÃO DE DIVULGAÇÃO**

Pablo Ramon Gualberto Cardoso  
Renata Virginia Cavalcante Santos  
Simão Kalebe Silva de Paula  
Thiago Ubiratan Lins e Lins  
Lucianna Rabelo Pessoa de Siqueira  
Míria de Oliveira Barbosa,  
Amanda Carla Quintas de Medeiros vieira

## **COMISSÃO DE MONITORIA**

Flaviana Alves dos Santos  
Lucas Gabriel Souza Santos

## **COMISSÃO DE MINI-CURSOS**

Helena Lima da Silva Neta  
Kalline Lourenço Ribeiro  
Elias Tibúrcio Junior  
Ruany Cristyne de Oliveira Silva

## **COMISSÃO CULTURAL**

Lidiane Vasconcelos do Nascimento Carvalho  
Wanessa Layssa Batista de Sena  
Lucas Batista Tavares  
Fernanda Gomes Bezerra  
Maria Clara Pinheiro Duarte Sampaio  
Rayssa Maria de Melo Wanderley Feitosa

## **COMISSÃO DE CERTIFICADOS**

Maria Andrezza Bezerra Correia  
Kamila de Melo Vilar  
Mardonny Bruno de Oliveira Chagas  
Larissa Pelágia de Lima Ferreira  
Marcel Almeida

## **COMISSÃO DE LOGÍSTICA**

Eudes Gustavo Constatino Cunha  
Anderson Rodrigues de Almeida  
Caio Gomes de Barros Martins  
Thuanny Maryna dos Santos,  
Regina Souza Aires

# COMISSÃO DE AVALIADORES DE RESUMOS

Amanda Figueiredo Barbosa Azevedo (PPGIT/ UFPE)  
Andrea Dantas (HC/UFPE)  
Antonio Felix da Silva Filho (PPGIT/UFPE)  
Arthur Felipe Santos Barbosa (UFPE)  
Carolina Galgane Lage Miranda (PPGIT/UFPE)  
Douglas Carvalho Francisco Viana (PPGIT/UFPE)  
Elisângela A. de Moura Mendonça (UFPB)  
Fernando Zanghelini (UFPE)  
Flavia Emília Cavalcante Valença Fernandes (PPGIT/UFPE)  
Flaviana Alves dos Santos (PPGIT/UFPE)  
Gabriela Souto Vieira de Mello (CESMAC)  
Henrique Mariz (HC/UFPE)  
Inês Costa (SES-PE)  
Isaac Aaron Morales Frias (UFPE)  
Isabella Macário Ferro Cavalcanti (CAV/UFPE)  
Jamerson Oliveira (UFPE)  
José de Arimatea Rocha Filho (PPGIT/UFPE)  
Joyce Nunes dos Santos (PPGIT/UFPE)  
Kamila de Melo Vilar (PPGIT/UFPE)  
Karina Perrelli Randau (PPGIT/UPFE)  
Larissa Pelágia de Lima Ferreira (PPGIT/UFPE)  
Lidiane Vasconcelos do Nascimento Carvalho (PPGIT/UFPE)  
Lucianna Rabelo Pessoa de Siqueira (PPGIT/UFPE)  
Luis Alberto Lira Soares (PPGIT/UFPE)  
Luiza Rayanna Amorin de Lima (UFPE)  
Magda Rhayanny A. Ferreira (UFPE)  
Mardonny Chagas (UFPE)  
Maria Andreza Correia (UFPE)  
Mariana Brayner (UFPE)  
Marina Ferraz Cordeiro (PPGIT/ UFPE)  
Marina Galdino da Rocha Pitta (UFPE)  
Pablo Ramon Gualberto Cardoso (PPGIT/UFPE)  
Priscilla Stela Santana de Oliveira (PPGIT/UFPE)  
Rafael Ramos da Silva (PPGIT/UFPE)  
Renata Virginia Cavalcanti Santos (PPGIT/UFPE)  
Roseane Lemos (PPGES/UFPE)  
Sabrina Stefanne Barboza (PPGIT/UFPE)  
Sayonara Maria Calado Gonçalves (PPGIT/UFPE)  
Silvina Odete Bustos (ICESP)  
Thiago Matos (UFPE)  
Thiago Salazar (UFPE)  
Thiago Ubiratan Lins e Lins (NUPIT/UFPE)  
Tiago Farias Sobel (UFPB)  
Wagner Luis Mendes de Oliveira (UFPE)



# SUMÁRIO

## RESUMOS EXPANDIDOS

### ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA

- AF1- ANÁLISE DOS BENEFÍCIOS E MALEFÍCIOS DO TRATAMENTO COM CLONAZEPAM EM CLIENTES DE UMA DROGARIA DO MUNICÍPIO DE MORENO-PERNAMBUCO 22
- AF2 - AVALIAÇÃO DAS PRESCRIÇÕES DE ANTIBIÓTICOS E CLASSIFICAÇÃO DAS INFECÇÕES ACOMETIDAS NA UNIDADE DE PRONTO ATENDIMENTO MARIA ESTHER SOUTO CARVALHO – UPA IMBIRIBEIRA 26
- AF3 - AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE INIBIDOR DE BOMBA DE PRÓTONS EM UMA FARMÁCIA DA FAMÍLIA DA ATENÇÃO BÁSICA DO RECIFE-PE. 30
- AF4 - AVALIAÇÃO DA IMPLANTAÇÃO DO COMITÊ TÉCNICO PARA O USO RACIONAL DE MEDICAMENTOS (CURAME) NA PREFEITURA DO RECIFE 34
- AF5 - AVALIAÇÃO DAS DIFICULDADES NA ADESÃO AO MEDICAMENTO NO TRATAMENTO DE TUBERCULOSE EM PACIENTES COM COINFECÇÃO HIV/TUBERCULOSE DA POLICLÍNICA LESSA DE ANDRADE 38
- AF6 - ATUAÇÃO DO FARMACÊUTICO NA CAPACITAÇÃO DE ATENDENTES DAS FARMÁCIAS DAS UNIDADES DE SAÚDE DA FAMÍLIA NOS DISTRITOS SANITÁRIOS III E VII DA CIDADE DE RECIFE – PE 42

### BIOENSAIOS

- B1- NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE IL-17A DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO IRRADIADAS IN VITRO 48
- B4 - AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE IFN- $\gamma$  EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO IRRADIADAS IN VITRO 53
- B5 - AVALIAÇÃO IN VITRO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DOS ÓLEOS DE *Alpinia speciosa*, *Ageratum conyzoides* e *Dysphania ambrosioides* NA LINHAGEM CELULAR DE CÂNCER DE PÂNCREAS MIA PACA-2 57
- B7 - ANÁLISE SOROLÓGICA COMPARATIVA EM INDIVÍDUOS COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA) 61
- B9 - AVALIAÇÃO DE EFEITOS HEPATOTÓXICOS DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *Kalanchoe brasiliensis* Cambess EM CAMUNDONGOS *Swiss* 65

### BIOLOGIA MOLECULAR

- BM1 - MICRORNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DA INFÂNCIA NO BRASIL: POTENCIAIS BIOMARCADORES PARA DISTINÇÃO ENTRE OS SUBTIPOS T E B 70

BM2 - INFLUÊNCIA DO MICROAMBIENTE HIPÓXICO E PRIVADO DE NUTRIENTES NA EXPRESSÃO GÊNICA DE PAR-4 (PROSTATE APOPTOSIS RESPONSE 4) EM CÉLULAS DE CÂNCER DE PÂNCREAS 74

BM3 - ANÁLISE FUNCIONAL DE POLIMORFISMOS DO ONCOGENEE7 DOS PAPILOMAVÍRUS HUMANO TIPOS 16 E 31 EM AMOSTRAS CLÍNICAS DO NORDESTE BRASILEIRO. 79

BM5 - MODULATION OF PROSTATE APOPTOSIS RESPONSE-4 (PAR-4) EXPRESSION BY NOVEL OXAZOLIDINE DERIVATIVES IN ACUTE T CELL LEUKEMIA 83

BM6 - CUSTO BENEFÍCIO NA ESCOLHA DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA PARA A DETECÇÃO DO GENOMA DE HPV EM AMOSTRAS CLÍNICAS 87

BM7 - PAPEL DE GALECTINA-3 NA MOTILIDADE DO CÂNCER DE PÂNCREAS 91

### **BIOTECNOLOGIA E NANOTECNOLOGIA EM SAÚDE**

BN1 - RECENTES PERSPECTIVAS DO USO DE ESFINGOLIPÍDIOS COMO ALVO PARA AGENTES ANTIFÚNGICOS 96

BN6 - DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA NANOSENSORIA PARA TESTE RÁPIDO DE HIDRONEFROSE 100

BN7 - DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL IN VITRO DE NANOPARTÍCULAS DE PLA CONTENDO METOTREXATO 104

BN8 - ESTUDO DA SOBREVIDA DE CAMUNDONGOS SWISS COM SARCOMA-180, TRATADOS COM LIPOSSOMAS FURTIVOS CONTENDO ÁCIDO BARBÁTICO DE *Cladonia Salmannii* (Líquén) 109

BN9 - NANOPARTÍCULAS DE PLGA FUNCIONALIZADAS PARA LIBERAÇÃO MODIFICADA DE DOXORRUBICINA E ESTUDO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL IN VITRO 113

BN11 - NANOPARTÍCULAS DE PLGA FUNCIONALIZADAS PARA ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS DE CARÁTER ANIÔNICO 117

### **CONTROLE DE QUALIDADE E INDÚSTRIA FARMACÊUTICA**

CQ1 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA DROGA VEGETAL *Momordica charantia L* 122

CQ2 - PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE SONDAS DE MICRODIÁLISE: UMA ABORDAGEM DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 127

CQ3 - ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA DE UM UMIDIFICADOR DE CACHOS DE UMA EMPRESA DO SETOR DE COSMÉTICOS DE PERNAMBUCO 132

CQ4 - AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE PRELIMINAR DE UM NOVO PERFUME E DOADOR DE BRILHO CAPILAR	136
CQ5 - CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA DO METIL P-CUMARATO POR DSC, DTA E TG	140
CQ6 - CARATERIZAÇÃO TÉRMICA DA MONOCROTALINA POR DSC e TG	144
CQ7 - PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA PRELIMINAR DE EXTRATO FLUIDO DE <i>Plectranthus barbatus</i> Andrews	148
CQ8 - DETERMINAÇÃO ESTEREOSSELETIVA DOS ENANTIÔMEROS DO CITALOPRAM EM PLASMA HUMANO POR LC-MS/MS	152
CQ9 - OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE LIBERAÇÃO DE SISTEMAS BINÁRIOS A BASE DE EFAVIRENZ E HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES PARA UTILIZAÇÃO EM MEDICAMENTO ANTIRRETROVIRAL	156
CQ10 - OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA DE GEL TRANSDÉRMICO À BASE DE DOXICICLINA MANIPULADO EM UMA FARMÁCIA VETERINÁRIA DE PERNAMBUCO	160
CQ11 - ESTUDO DE PRÉ-FORMULAÇÃO DA EPIISOPILOTURINA, EXTRAÍDO DE <i>Pilocarpus microphyllus</i> (Jaborandi), COMO ALTERNATIVA TERAPÊUTICA PARA DOENÇAS NEGLIGENCIADAS	164
CQ12 - AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA (EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA) DE COMPRIMIDOS DE MEBENDAZOL COMERCIALIZADOS NA EUROPA E NO BRASIL.	169
CQ13 - AVALIAÇÃO DE COMPRIMIDOS COM POTENCIAL MUCOADESIVO DE GOMA DE CAJUEIRO E QUITOSANA	173
CQ15 - DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO POR CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÍLICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE ANTIPSICÓTICOS EM PLASMA HUMANO: UMA ABORDAGEM DE PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS	177
CQ16 - UMA ABORDAGEM SOBRE PLANEJAMENTO E CONTROLE DA PRODUÇÃO NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA	181
CQ17 - ESTUDO DE VIABILIDADE CELULAR EM LINHAGEM DE MACRÓFAGOS HUMANOS DE SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTENDO HIDRÓXIDO DUPLO LAMELAR E EFAVIRENZ	185
<b>GESTÃO, ECONÔMIA E SAÚDE</b>	
GE4 - FATORES RELACIONADOS COM O AUMENTO DO GASTO PÚBLICO COM MEDICAMENTOS	190
GE8 - CUSTO DO CUIDADO ESPECIALIZADO EM PRÁTICAS INTEGRATIVAS E COMPLEMENTARES NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE	194

GE15 - GESTÃO DE CUSTOS NA REDE DE ATENÇÃO À SAÚDE: ESTUDO DE CASO DE UMA UNIDADE DE CUIDADOS INTEGRALIS, RECIFE/PE 199

### **PESQUISA CLÍNICA E PRÉ-CLÍNICA**

PC3 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNORREGULADORA IN VITRO DO DERIVADO TIAZOLIDÍNICO LPSF/CR-35 204

PC6 - AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA INTERLEUCINA-22 COMO UM BIOMARCADOR PARA A ARTRITE REUMATÓIDE 208

PC7 - AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO COLÁGENO TIPO I EM PACIENTES PORTADORES DE PSORÍASE 212

PC8 - DERIVADOS HÍBRIDOS DO INDOL-TIOFENO COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA PARA TRATAMENTO DE CÉLULAS DE LEUCEMIA AGUDA RESISTENTE 216

PC9 - HIPERCOLESTEROLEMIA: O POTENCIAL DO EXTRATO DE *Kalanchoe brasiliensis* COMO TRATAMENTO? 220

PC12 - AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS NOVOS DERIVADOS SINTÉTICOS DA CURCUMINA EM LINHAGEM CELULAR DE LEUCEMIA HL60 224

PC13 - INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA E CITOTÓXICA DE CANDIDATOS A FÁRMACOS ANTICHAGÁSICOS 228

PC18 - AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA CURCUMINA EM LINHAGENS NEOPLÁSICAS DE MELANOMA E PRÓSTATA 232

PC19 - AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PPGALNAC-T14 EM AMOSTRAS DE TUMORES PRIMÁRIOS DE CÂNCER GÁSTRICO 236

### **PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL**

PNQM3 - CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA DA LÂMINA FOLIAR DE *Psidium guajava* L. 241

PNQM4 - APLICAÇÃO DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DE SOLUÇÃO EXTRATIVA PADRONIZADA DE *Spondias mombin* JACQ. 245

PNQM5 - UTILIZAÇÃO DE PLANEJAMENTO FATORIAL COMO ESTRATÉGIA PARA OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO EXTRATIVO DE *Morus nigra* L. 249

PNQM6 - PERFIL FITOQUÍMICO DE FOLHAS DE *Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss. (APIACEAE) 254

PNQM7 - OTIMIZAÇÃO DO DECOCTO DA RAIZ DE *Bromelia laciniosa* UTILIZANDO DESIGN EXPERIMENTAL 258

PNQM8 - CARACTERIZAÇÃO FARMACOGNÓSTICA FÍSICO-QUÍMICA DA DROGA VEGETAL E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE-DAD PARA FINGERPRINT DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE <i>Anternanthera brasiliiana</i> KUNTZE	262
PNQM9 - <i>Eclipta alba</i> (L.) Hassk. (ASTERACEAE): DETERMINAÇÃO DO PERFIL FITOQUÍMICO DE FOLHAS	266
PNQM12 - ANÁLISE POR CLAE-DAD E AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIPROLIFERATIVO DE <i>Cnidocolus quercifolius</i> POHL (EUPHORBIACEAE) EM CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO	270
PNQM13 - CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA DA FOLHA DE <i>Alpinia zerumbet</i> (Pers.) B.L.Burt & R.M.Sm.	274
PNQM14 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DO ALCALOIDE HARMANA ISOLADO DE <i>Simira gardneriana</i> M.R.V. BARBOSA & PEIXOTO (RUBIACEAE)	278
PNQM15 - INVESTIGAÇÃO IN SILICO DA AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTI-PROLIFERATIVA DE MOLÉCULAS ISOLADAS DE PRÓPOLIS ORGÂNICA BRASILEIRA	282
PNQM16 - ANÁLISE FITOQUÍMICA DAS FOLHAS DE <i>Cinnamomum zeylanium</i> BLUME (LAURACEAE) POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA	286
PNQM17 - DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES NO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE <i>Eugenia uniflora</i> Linn POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	290
PNQM18 - OTIMIZAÇÃO DE METODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES NAS FOLHAS DE <i>Alpinia zerumbet</i>	294
PNQM19 - ANÁLISE HISTOQUÍMICA DA LÂMINA FOLIAR DE <i>Azadirachta indica</i> A. Juss.	298
PNQM20 - EFEITO CITOTÓXICO E ANTITUMORAL DO EXTRATO METANÓLICO DE <i>Annona vepretorum</i> Mart. (ANNONACEAE)	302
PNQM21 - USO, DIVERSIDADE E POSSÍVEIS EFEITOS DE EXTRATOS VEGETAIS COMERCIALIZADOS EM UMA FEIRA LIVRE NA CIDADE DE SERRA TALHADA – PE: UM ESTUDO DESCRITIVO	306
PNQM23 - OTIMIZAÇÃO DE CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E EXTRATIVAS PARA DOSEAMENTO DE CUMARINA EM <i>Justicia pectoralis</i> Jacq POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	310
PNQM26- SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO DERIVADO HIDANTOINICO MG-1/LPSF ATRAVÉS DA TÉCNICA DE GC-MS	314
PNQM27 - CARACTERIZAÇÃO FARMACOGNÓSTICA E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE FINGERPRINT POR CLAE-DAD DAS CASCAS DE <i>Mimosa tenuiflora</i> (Fabaceae)	318

PNQM28 - SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE UM NOVO DERIVADO TIAZOLIDÍNICO LPSF/GQ-407 ATRAVÉS DA TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG-MS)	322
PNQM30 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA, ANTIBIOFILME E CITOTÓXICA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE <i>Passiflora cincinnata</i> MAST. (Passifloraceae)	326
PNQM31 - OBTENÇÃO DE EXTRATOS SECOS POR ASPERSÃO DOS FRUTOS DE <i>Libidibia ferrea</i> Martius – JUCÁ	330
PNQM32 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE NOVOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO DO FÁRMACO $\beta$ -LAPACHONA UTILIZANDO POLÍMERO HIPER-RAMIFICADO	334
PNQM33 - SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICÂNCER DE ARIL-TIAZOLINONAS	338
PNQM34 - SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL PELA TÉCNICA DE CG-EM DE UM NOVO AGONISTA $\alpha$ -2 ADRENORECEPTOR (PT-31).	342
PNQM36 - ABORDAGENS METODOLÓGICAS DA SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO POR CG-EM DATIAZOLIDINA-2,4-DIONA	346
PNQM37 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DE NOVOS DERIVADOS HÍBRIDOS DE FTALIMIDA E TIAZOL	350
PNQM38 - SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA DE UM NOVO AGONISTA PARCIAL DE PPAR- $\gamma$ (GQ-16)	354
PNQM39 - SÍNTESE E COMPROVAÇÃO ESTRUTURAL DE UM NOVO DERIVADO TIAZOLIDÍNICO GQ-402/LPSF CANDIDATO A FÁRMACO ANTI-INFLAMATÓRIO	358
PNQM40 - SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE NOVAS 1-3 TIAZÓISPARA A ATIVIDADE ANTI-Trypanosoma cruzi.	362

#### **TERAPIAS EM SAÚDE**

TS2 - ANÁLISE DIFRATOMÉTRICA DE HIDROTALCITAS SINTÉTICAS PARA CARREAMENTO DE FÁRMACOS	367
TS3 - EFETIVIDADE DAS PRÁTICAS INTEGRATIVAS E COMPLEMENTARES PARA SOFRIMENTO DIFUSO	371
TS4 - DIETILCARBAMAZINA (DEC) PROTEGE CONTRA HEPATOTOXICIDADE AGUDA INDUZIDA POR TETRACLORETO DE CARBONO (CCl <sub>4</sub> ) EM CAMUNDONGOS, POR REDUZIR MARCADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS E ESTRESSE OXIDATIVO	375

## VIGILÂNCIA E EPIDEMIOLOGIA EM SAÚDE

VE1- CHIKUNGUNYA COMO FATOR DE RISCO PARA RECIDIVA DE ERISPELA 381

## **TRABALHOS COMPLETOS**

### **BIOENSAIOS**

- B2 - AVALIAÇÃO ELETROQUÍMICA DA PLATAFORMA NANOESTRUTURADA COM NANOTUBOS DE CARBONO PARA DETECÇÃO DE MICOTOXINA 387
- B3 - AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE SURFACTANTES QUÍMICOS E BIOLÓGICOS EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS 394
- B6 - AVALIAÇÃO PROTEÔMICA DO MECANISMO DE AÇÃO DO NOVO DERIVADO OXAZOLIDINICO LPSF-NB-3 EM LINHAGEM DE LEUCEMIA AGUDA 402
- B8 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DO MIGLUSTATO ZAVESCA® SOBRE INTERFERON-GAMA E INTERLEUCINA-6: UM POSSÍVEL MECANISMO PARA UM FUTURO REPOSICIONAMENTO? 411
- B10 - POTENCIAL EFEITO ANTITUMORAL DO EXTRATO DOS FRUTOS DA LIBIDIBIA FERREA 419

### **BIOLOGIA MOLECULAR**

- BM4 - DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO NO SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES SAUDÁVEIS E COM LESÕES CERVICAIS 428

### **BIOTECNOLOGIA E NANOTECNOLOGIA EM SAÚDE**

- BN2 - BIOSSENSOR PIEZOELÉTRICO BASEADO EM PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO PARA DETECÇÃO BACTERIANA 438
- BN3 - DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMAS NANOESTRUTURADAS PARA A BIODETECÇÃO DE SHISTOSOMA MANSONI 445
- BN4 - A ELEVAÇÃO DOS NÍVEIS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO DESENCADEADA POR ANTIFÚNGICOS E SUA CONTRIBUIÇÃO TERAPÊUTICA 450
- BN5 - PLANEJAMENTO FATORIAL PARA EXTRAÇÃO DE ENZIMA FIBRINOLÍTICA DE MUCOR SUBTILISSIMUS UCP1262 MEDIANTE SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS (PEG/FOSFATO) 456
- BN10 - NANOBIOSENSOR BASEADO EM POLIANILINA E CLAVANINA A PARA IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS 464
- BN12 - AVALIAÇÃO IN VITRO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE *Aspergillus fumigatus* S7 CONTRA MICRO-ORGANISMOS DE INTERESSE CLÍNICO 471
- BN13 - AVALIAÇÃO E DETERMINAÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DA PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE POR *Streptomyces xanthocidicus* UFPEDA 3418 479

BN14 - DESENVOLVIMENTO DE NANOBIOELETRODO BASEADO EM 486  
COMPÓSITO HÍBRIDO PARA O DIAGNÓSTICO ULTRASSENSÍVEL DE  
HPV 16

### **CONTROLE DE QUALIDADE E INDÚSTRIA FARMACÊUTICA**

CQ13 - DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA 495  
QUANTIFICAÇÃO DO AZUL DE METILENO RESIDUAL NA PRODUÇÃO  
DE COLA DE FIBRINA

### **DESENVOLVIMENTO E IMPLEMENTAÇÃO DE MÉTODOS IN SILICO**

Dİnsilico1 - MODIMOL WORKBENCH: A WEB-BASED SCIENCE 504  
GATEWAY TO SUPPORT IN SILICO APPLICATIONS IN HPC  
ENVIRONMENTS

Dİnsilico2 - GRIDOMOL: NEW DEVELOPMENTS AND 512  
IMPLEMENTATIONS OF DISTRIBUTED COMPUTING FOR IN SILICO  
APPROACHES USED IN THERAPEUTIC INNOVATION

### **GESTÃO, ECONOMIA E SAÚDE**

GE1 - ANÁLISE DE CUSTO RELATIVO AO TRATAMENTO DA 522  
MICROCEFALIA NO PRIMEIRO ANO DE VIDA E SEUS IMPACTOS NA  
SAÚDE PÚBLICA.

G2 - ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE GASTO PÚBLICO PER CAPITA EM 528  
SAÚDE E A TAXA DE MORTALIDADE INFANTIL NAS QUATRO  
MACRORREGIÕES DE SAÚDE DO ESTADO DE PERNAMBUCO NO  
PERÍODO E 2008 A 2012

GE3 - SISTEMAS DE INFORMAÇÃO DA ATENÇÃO PRIMÁRIA: TEMPO 536  
GASTO E NECESSIDADE NA PERCEPÇÃO DOS ENFERMEIROS

GE5 - A INTEROPERABILIDADE DOS SISTEMAS DE INFORMAÇÕES EM 543  
SAÚDE COMO PROPOSTA DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM SAÚDE

GE6 - MAPEAMENTO DOS CENTROS DE CUSTOS: UM ESTUDO DE CASO 551  
NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROFESSOR ALBERTO ANTUNES –  
HUPAA-UFAL/EBSERH.

GE7 - GASTOS FAMILIARES PRIVADOS COM SAÚDE NO BRASIL E EM 560  
PERNAMBUCO: UMA ANÁLISE DESCRITIVA COM MICRODADOS DA  
PESQUISA DE ORÇAMENTOS FAMILIARES

GE9 - COMPRA CENTRALIZADA DE MEDICAMENTOS: UMA ECONOMIA 568  
DA SAÚDE EFICIENTE?

GE10 - SEGURANÇA DO PACIENTE SOB A ÓTICA DA DIMENSÃO DO 575  
CUIDADO DE SAÚDE

GE11 - IMPACTO DA LEI MARIA DA PENHA SOBRE OS ANOS POTENCIAIS DE VIDA PERDIDOS DAS MULHERES.	583
GE12 - SUSTENTABILIDADE NAS COMPRAS PÚBLICAS: UM ESTUDO DE CASO NUMA UNIDADE HOSPITALAR DO ESTADO DE PERNAMBUCO	591
GE13 - IMPACTO DO PROGRAMA NACIONAL DE MELHORIA DO ACESSO E DA QUALIDADE NAS AÇÕES DE RASTREIO DO CÂNCER DE COLO UTERINO EM ALAGOAS	599
GE14 - A EFICIÊNCIA DA ATENÇÃO PRIMÁRIA À SAÚDE NO ESTADO DE PERNAMBUCO	607
GE16 - IDENTIFICAÇÃO DO PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DAS VÍTIMAS DE ACIDENTES DE TRANSPORTE TERRESTRE NO BRASIL E PERNAMBUCO A PARTIR DE MICRODADOS DA PESQUISA NACIONAL DE SAÚDE 2013.	615
GE17 - IMPACTO DO MELANOMA MALIGNO EM PERNAMBUCO: UMA ANÁLISE DA JUDICIALIZAÇÃO EM PERNAMBUCO	623
GE18 - O SIOPS COMO FERRAMENTA DE APOIO À GESTÃO: O CONHECIMENTO DOS GESTORES MUNICIPAIS DE PERNAMBUCO	630
GE19 - ANÁLISE DO DESEMPENHO ECONÔMICO-FINANCEIRO DOS HOSPITAIS DE PEQUENO PORTE NO ESTADO DE PERNAMBUCO ENTRE OS ANOS DE 2009 A 2015.	639
GE20 - ANÁLISE DOS GASTOS COM AÇÕES JUDICIAIS NA SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE PERNAMBUCO, NO ANO DE 2014	647
GE21 - AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO DACLATASVIR VERSUS ALFA PEGINTERFERONA 2A NO TRATAMENTO DA HEPATITE C CRÔNICA	655
GE22 - FINANCIAMENTO DO TRATAMENTO ONCOLÓGICO NO BRASIL: UMA ANÁLISE DOS HOSPITAIS PRIVADOS E PÚBLICOS DA REDE SUS	662
GE23 - SISTEMA DE COTAS: PREFERÊNCIAS PROFISSIONAIS E ÁREAS DE ATUAÇÃO DE MÉDICOS EGRESSOS DE UMA UNIVERSIDADE PÚBLICA BRASILEIRA	670
GE24 - APLICAÇÃO DO CUSTEIO VARIÁVEL EM UMA CLÍNICA ESCOLA DE FONOAUDIOLOGIA	677

#### **MICROBIOLOGIA CLÍNICA**

MC1 - IDENTIFICAÇÃO POLIFÁSICA E AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE ISOLADOS CLÍNICOS DE LEDURAS DO COMPLEXO <i>Candida parapsilosis</i>	685
MC2 - PERFIL DE RESISTÊNCIA E PRODUÇÃO DE BIOFILME POR CEPAS DE <i>Escherichia coli</i> ISOLADAS DE ÚLCERA POR PRESSÃO	693
MC3 - CANDIDÍASES INVASIVAS EM UNIDADES DE TERAPIA INTENSIVA	701

## **PESQUISA CLÍNICA E PRÉ-CLÍNICA**

- PC1 - PEPTÍDEOS OBTIDOS DE SERPENTES CROTALUS DURISSUS COMO POTENCIAIS TERAPÊUTICOS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA 709
- PC2 - TIAZOLIDINODIONAS: UMA BREVE ABORDAGEM SOBRE OS EFEITOS TÓXICOS ASSOCIADOS AO USO 717
- PC4 - AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA CENTRAL DE QUATRO DERIVADOS SINTÉTICOS DE ISATINA EM RATOS. 724
- PC5 - AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE IL-33 EM PACIENTES PORTADORES DE ARTRITE REUMATÓIDE COM ATIVIDADE DA DOENÇA 730
- PC10 - AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE INDUÇÃO DE MORTE DO DERIVADO LPSF/AA-29 NA LINHAGEM DE CÂNCER DE MAMA MCF-7 735
- PC11 - AVALIAÇÃO DE CÉLULAS T REGULADORAS DE PACIENTES BRASILEIROS COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO 743
- PC14 - AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR E DA INDUÇÃO DE APOPTOSE DO DERIVADO TIAZACRIDÍNICO LPSF/AA29 EM CÉLULAS DE LEUCEMIA E LINFOMA 750
- PC15 - AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DE CÉLULAS DENDRÍTICAS ESTIMULADAS COM PEPTÍDEOS RECOMBINANTES DE LEISHMANIA VIANNIA BRAZILISIENSES 757
- PC16 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DA DIETILCARBAMAZINA NA SECREÇÃO DE IFN- $\gamma$  E IL-17A EM SOBRENADANTE DE CULTURA DE CÉLULAS MONONUCLEADAS DE SANGUE PERIFÉRICO DE ASMÁTICOS 765
- PC17 - NÍVEIS SÉRICOS DE IL-29 EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO. 771
- PC20 - SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS: PROCESSO INFLAMATORIO? 777

## **POLITICAS PÚBLICAS EM SAÚDE**

- PP1 - REDUÇÃO DE CUSTOS NO SETOR DE NUTRIÇÃO DE UM HOSPITAL REGIONAL A PARTIR DA INTERVENÇÃO DO NÚCLEO DE ECONOMIA DA SAÚDE 787
- PP2 - IMPLANTAÇÃO DOS NÚCLEOS DE ECONOMIA DA SAÚDE NOS HOSPITAIS ESTADUAIS – O CASO DE PERNAMBUCO, BRASIL, 2016 792
- PP3 - O PROGRAMA SAÚDE DA FAMÍLIA COMO INOVAÇÃO PARA REDUÇÃO DA MORTALIDADE INFANTIL 800

PP4 - APURAÇÃO DE CUSTOS NA FARMÁCIA AMBULATORIAL DE UM HOSPITAL ESPECIALIZADO EM DOENÇAS INFECTOCONTAGIOSAS A PARTIR DO NÚCLEO DE ECONOMIA DA SAÚDE - NES. 807

### **PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL**

PNQM1 - SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO DERIVADO TIAZACRIDÍNICO LPSF/AA-57 816

PNQM11 - Panax ginseng NÃO MODIFICA O EFEITO DA FLUOXETINA EM TESTES DE DEPRESSÃO E MEMÓRIA EM RATOS 822

PNQM22 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA E ANTIBACTERIANA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE RIZOMAS DE *Limonium brasiliense* (Baicuru) 828

PNQM24 - ANÁLISE *in vitro* DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DA *Trichilia catigua* A. JUSS. 836

PNQM25 - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA EM UVB DE DIFERENTES EXTRATOS VEGETAIS 842

PNQM29 - ESTUDOS DE CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE RESVERATROL 849

PNQM35 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTITUMORAL DE NOVOS DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DA BETULINA E DO ÁCIDO BETULÍNICO 857

PNQM41 - SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DO DERIVADO TIAZOLIDÍNICO LPSF/JB-8 865

### **SISTEMA DE INOVAÇÃO EM SAÚDE**

SIS1 - DETECÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE LESÕES DE MAMA EM MAMOGRAFIAS UTILIZANDO REDES NEURAIS ARTIFICIAIS E ATRIBUTOS MORFOLÓGICOS 872

SIS2 - PROPOSTA DE UM TOMÓGRAFO DE IMPEDÂNCIA DE BAIXO CUSTO BASEADO NO PARADIGMA OPEN-HARDWARE 878

### **TERAPIAS EM SAÚDE**

TS1 - TRATAMENTO DE PACIENTES COM OVERDOSE AGUDA POR BENZODIAZEPÍNICOS 887

TS6 - CARCINOMA DUCTAL INVASIVO EM MULHER JOVEM: UM RELATO DE CASO 895

### **VIGILÂNCIA E EPIDEMIOLOGIA EM SAÚDE**

VE2 - TENTATIVAS DE SUICÍDIO POR INTOXICAÇÃO EXÓGENA COM RATICIDAS 901

VE3 - EPIDEMIOLOGIA DAS TENTATIVAS DE ABORTO CAUSADAS POR AGENTES TÓXICOS EXÓGENOS NO BRASIL	909
VE4 - PERFIL DO PACIENTE USUÁRIO DE TERAPIA RENAL SUBSTITUTIVA E IMPACTO EM SEU ESTILO DE VIDA	917
VE5 - A VIOLÊNCIA LETAL CONTRA MULHERES: TENDÊNCIA E DIFERENÇAS REGIONAIS NO BRASIL	925
VE6 - PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DOS ACIDENTES OFÍDICOS CAUSADOS POR SERPENTES DO GÊNERO BOTHROPS NA REGIÃO NORDESTE DO BRASIL, 2010-2015: RELAÇÃO ENTRE O TEMPO DO ACIDENTE/ATENDIMENTO E A EVOLUÇÃO CLÍNICA DO CASO NOS ÚLTIMOS CINCO ANOS	932
VE7 - AVALIAÇÃO DA COBERTURA E EFETIVIDADE DO EXAME CITOLÓGICO PREVENTIVO DO CÂNCER DE COLO DO ÚTERO EM PERNAMBUCO, BRASIL	941
VE8 - ANÁLISE DOS FATORES ASSOCIADOS À MORTALIDADE POR CÂNCER DO COLO DO ÚTERO EM RECIFE, PERNAMBUCO	949



## **RESUMOS EXPANDIDOS**



**ASSISTÊNCIA  
FARMACÊUTICA**

ÁREA DE SUBMISSÃO: ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA – AF 1

## ANÁLISE DOS BENEFÍCIOS E MALEFÍCIOS DO TRATAMENTO COM CLONAZEPAM EM CLIENTES DE UMA DROGARIA DO MUNICÍPIO DE MORENO-PERNAMBUCO

E. M. L dos SANTOS<sup>1</sup>, B. G. SILVA<sup>1</sup> e R. M. F. da SILVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas

E-mail para contato: [gomessbeatriz@gmail.com](mailto:gomessbeatriz@gmail.com)

*RESUMO – O uso excessivo de medicação e de forma inadequada é considerado um problema de saúde pública, principalmente no caso de psicotrópicos como o Clonazepam. O trabalho em questão contou com a colaboração de uma pequena drogaria do município de Moreno/PE e de seus clientes, usuários do Clonazepam, com o objetivo de analisar os benefícios e malefícios do tratamento e em quais casos o medicamento vem sendo prescrito. Trinta e oito (38) clientes foram submetidos a um questionário e os dados coletados foram registrados e analisados para elaboração de gráficos e obtenção de resultados. Dentre os resultados, observou-se que os pacientes sentem melhoras da sua condição clínica, a maioria não sente efeitos adversos. Mesmo sendo um fármaco seguro, pode provocar riscos a seus usuários. Assim, torna-se evidente a necessidade por mais estudos nesta área e uma orientação adequada a pacientes que usam medicamentos de forma contínua, estabelecendo uma relação multidisciplinar com profissionais das diversas áreas da saúde.*

*Palavra chave: Psicotrópicos; Questionário; Medicamento.*

*ABSTRACT- Overuse of medication and improperly is considered a public health problem, especially in the case of psychotropic drugs such as clonazepam. The work in question included the participation of a small drugstore in the city of Moreno / PE and its customers, Clonazepam users, in order to analyze the benefits and harms of treatment and in which cases the drug has been prescribed. Thirty-eight (38) customers were subjected to a questionnaire and the data were recorded and analyzed for graphing and achieving results. Among the results it was observed that patients experience improvements in their clinical condition, most feels no adverse effects. Even as safe drugs may cause risk to its users. Thus, it becomes evident the need for more studies in this area and appropriate*



*guidance to patients who use drugs continuously, establishing a multidisciplinary relationship with professionals from different areas of health.*

*Keywords: Psychotropic; Questionnaire; Medicine.*

## 1. INTRODUÇÃO

O aumento da utilização de medicamentos, dentre eles os psicotrópicos, pode promover o uso irracional de medicamentos. Porém, o uso inadequado de psicotrópicos provoca tolerância, dependência e outras reações adversas extremamente danosas aos indivíduos (NOTO *et al.*, 2002).

Segundo Rang e Dale (2012), o clonazepam é um psicotrópico da classe dos benzodiazepínicos utilizado para o tratamento de crises epiléticas, transtornos de ansiedade, distúrbio do pânico, fobia social, transtornos do humor, transtorno bipolar, depressão, transtorno das pernas inquietas, transtorno da boca ardente e transtorno da vertigem.

Conforme dados do boletim do SNGPC entre 2007 e 2010, os benzodiazepínicos são os medicamentos controlados mais consumidos. O clonazepam, bromazepam e alprazolam lideram as estatísticas, 1º, 2º e 3º lugares, respectivamente. O consumo do clonazepam passou de 4 milhões para 10 milhões de Unidades Físicas Dispensadas (UFD – caixas vendidas de medicamentos), de 2008 para 2010 (HERNÁEZ, 2010).

Neste contexto, surge o interesse em saber para quais condições clínicas o clonazepam está sendo prescrito e como esses pacientes vêm se sentindo com o consumo dessa medicação, observando benefícios e malefícios do tratamento. O objetivo desse estudo foi verificar essas informações a partir de entrevistas com pacientes, após a consulta médica e dispensação. As informações coletadas podem promover um melhor entendimento sobre o tratamento com clonazepam, identificar possíveis reações que poderiam interferir no tratamento e também avaliar em quais situações clínicas esse medicamento vem sendo prescrito.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Uma amostra de 38 clientes foi selecionada a ser entrevistada com um questionário de autoria própria. O questionário foi composto por perguntas de cunho investigatório. Os clientes foram abordados na própria drogaria e previamente à execução da entrevista, a pesquisadora explicou o objetivo da pesquisa e forneceu o TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido). Em seguida, o questionário foi apresentado e feito oralmente. Após a coleta de dados, optou-se por utilizar uma metodologia para analisá-los denominada “Análise de conteúdo” cuja autoria é do químico Roque Moraes. Para representação gráfica, utilizou-se o programa Excel® para gerar gráficos de setores (pizza) e de caixa (*boxplot*).

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Pernambuco, recebendo o número 37460414.5.0000.5208 como registro de aprovação.



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quanto à condição clínica que o clonazepam foi prescrito a essa população, 36% foram medicados por problemas de insônia, 21% depressão, 18% ansiedade, 15% nervosismo, 3% transtorno de stress pós-traumático, 3% esquizofrenia, 3% hipertensão e 3% tontura. A primeira posição desse *ranking* coincide com pesquisas anteriores como estudos de Bettioli (2012) e a de Amaral e Machado (2012).

Diante das condições clínicas apresentadas pelos pacientes ao iniciarem o tratamento, perguntou-se quais dessas condições passaram por melhorias. Quarenta e sete por cento (47%) dessas pessoas afirmaram que tiveram melhoras na insônia, 35% relataram melhoras no nervosismo, 8% na ansiedade, 2% em cefaleia e 2% em tonturas. Seis por cento (6%) dos entrevistados afirmaram não sentir nenhuma melhoria com o uso do clonazepam para nenhuma das enfermidades presentes. Como menciona Lader (2008), um fator que favorece a utilização prolongada de benzodiazepínicos é a percepção dos indivíduos de que produzem efeitos terapêuticos gratificantes e rápidos.

Os pacientes foram questionados quanto à ocorrência de algum malefício possivelmente provocado pelo uso do clonazepam. Foi observado que 67% dos entrevistados responderam que não sentem nenhum prejuízo aparente com uso do clonazepam. Por outro lado, 15% afirmaram sentir tontura, 8% sentem sonolência diurna, 5% apresentam cefaleia, 3% têm esquecimento e os 3% restante afirmaram a ocorrência de efeito rebote. Esses resultados concordam com os estudos de Bettioli (2012) e com o próprio mecanismo do fármaco, já que o uso de benzodiazepínicos pode apresentar alguns efeitos indesejáveis como sedação, amnésia anterógrada, comprometimento cognitivo e da coordenação.

### 4. CONCLUSÃO

A principal indicação de uso do clonazepam para essas pessoas foi a presença de insônia, que, ao longo do tratamento, sofria melhora. Efeitos adversos são mencionados apenas por minoria desses indivíduos.

De uma maneira geral, os dados e resultados desta pesquisa coincidem com os da literatura, onde pôde-se observar o grande envolvimento dos entrevistados com o clonazepam.

Como perspectivas para possíveis trabalhos futuros, pode-se expandir a análise que possa ser realizada, de modo que outros questionamentos sejam elaborados, um número maior de entrevistados seja atingido, mais drogarias sejam envolvidas e até mesmo que mais medicamentos sejam estudados. Pois o conhecimento sobre como o paciente vem reagindo ao tratamento é de crucial importância para garantir adesão ao mesmo e sua eficácia.



## **5. REFERÊNCIAS**

AMARAL, B.D; MACHADO, K, L. Benzodiazepínicos: uso crônico e dependência. Londrina, 2012

BETTIOL, R. S. Análise da prevalência da utilização de benzodiazepínicos em uma farmácia de um município do sul de Santa. Criciúma, 2012.

HERNÁEZ, A.M. A medicalização dos estados de ânimo. O consumo de antidepressivos e as novas biopolíticas das aflições. *Florianópolis: Unisul; 2010. p.111-134.*

LADER M. Effectiveness of benzodiazepines: do they work or not? *Expert Rev Neurother, 2008; 8(8):1189-1191*

NOTO, A.R, CARLINI, E.A; MASTRIANNI, P.C; ALVES, V.C, GALDURÓZ, J.C.F; KUROIWA, W. Análise de prescrição e dispensação de medicamentos psicotrópicos em dois municípios do Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Psiquiatria. 2002;24(2):68-73.*

RANG, H. P; DALE, M. M. *Rang & Dale Farmacologia. 7. ed.* Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 781 p.

## **6. AGRADECIMENTOS**

À Drogeria Santo Amaro.



ÁREA DE SUBMISSÃO: ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA – AF 2

## AVALIAÇÃO DAS PRESCRIÇÕES DE ANTIBIÓTICOS E CLASSIFICAÇÃO DAS INFECÇÕES ACOMETIDAS NA UNIDADE DE PRONTO ATENDIMENTO MARIA ESTHER SOUTO CARVALHO – UPA IMBIRIBEIRA

S. V. PEREIRA<sup>1</sup>, J. R. de LIMA<sup>1</sup>, R. R. de CARVALHO<sup>1</sup>, R. M. F. da SILVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas

E-mail para contato: faneedanni@gmail.com

**RESUMO** – *O presente trabalho tem como objetivo avaliar as prescrições de antibióticos ocorridas na UPA Imbiribeira, assim como, classificar as infecções acometidas neste mesmo período. Durante a avaliação, os dados coletados na própria unidade foram: idade, sexo, hipótese de diagnóstico e antibiótico prescrito. Em seguida, foram separadas as amostras para cada um dos sete antibióticos e por seguinte, classificadas as infecções. Após o processamento de todas as informações, constatou-se que as infecções cutâneas tiveram maior porcentagem de contágio e que, em seguida, as infecções respiratórias e urinárias, respectivamente, também obtiveram quantidades significativas de acometimentos. Casos atípicos e isolados também foram classificados, bem como, infecções gastrointestinais, infecções associadas (urinária + respiratória), articulares, circulatórias e profilaxias. De todas as prescrições, 73% ocorreram de forma inadequada. Apesar das campanhas já realizadas para uso racional de antibióticos, são necessários a intensificação e o fornecimento de recursos necessários para que uma boa prescrição ocorra.*

**Palavras-chave:** Antibacterianos. Agentes anti-infecciosos. Fármacos anti-infecciosos.

**ABSTRACT** - *This study aims to evaluate the antibiotic prescriptions occurred in UPA Imbiribeira, as well as classify infections affected in the same period. During the evaluation, the data collected at the same place were: age, sex, hypothesis diagnosis and prescribed antibiotics. Then the samples were divided for each of the seven antibiotics and the infections were classified. After processing all the information, it was found that skin infections had a higher percentage of contagion and then the respiratory and urinary infections, respectively, also obtained significant amounts of injuries. Atypical and isolated*



*cases were classified as well as gastrointestinal infections, associated infections (urinary + respiratory), articular, circulatory and prophylactics infections. Of all prescriptions, 73% were improperly. Despite the campaigns already undertaken for rational use of antibiotics, the intensification and the provision of necessary resources for a good prescription to occur is necessary.*

*Keywords: antibacterials. anti-infective agents. antiinfective drugs.*

## 1. INTRODUÇÃO

Apesar da restrição de compra e uso de antibióticos impostas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a má utilização ainda ocorre, pois, a baixa composição no elenco desses fármacos disponíveis para tratamento das infecções apresentadas nas unidades de pronto atendimento e a não realização de exames para um diagnóstico preciso, na maioria das vezes, impossibilita uma terapia direcionada e eficaz, sendo esses, alguns fatores contribuintes para a resistência bacteriana, que tornou-se um problema de saúde pública em todo o mundo. Por este motivo, a busca por novos antibióticos com novos alvos é incessante (Fiol *et al.*, 2010). A exemplo da União Europeia que, desde 2001, divulga propostas de combate à resistência bacteriana aos seus membros (Dias *et al.*, 2010), campanhas de uso racional de antibióticos e capacitações são realizadas todos os anos pelos Conselhos Regionais de Farmácia para conscientizar a população e os profissionais da área da importância de um tratamento correto e completo (Bisson, 2010).

Justifica-se a realização deste estudo com o propósito de entender a conduta médica diante de infecções diversas e um quadro limitado de antibióticos para a escolha do tratamento adequado. Contudo, objetiva-se classificar as infecções apresentadas e avaliar as prescrições dos antibióticos que ocorreram para as quais.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo retrospectivo, de janeiro a dezembro de 2015, ocorrido na Unidade de Pronto Atendimento Maria Esther Souto Carvalho – UPA Imbiribeira, localizada na cidade do Recife em Pernambuco. Em 2015, os antibióticos, disponíveis na Unidade, foram ampicilina, azitromicina, benzilpenicilina benzatina, ceftriaxona, ciprofloxacino e fórmula associada de pieracilina com tazobactam.

Na primeira etapa, na própria unidade, foi realizada a coleta de dados (idade, sexo, hipótese de diagnóstico e antibiótico prescrito) através dos prontuários eletrônicos com o auxílio do programa MV 2000<sup>R</sup> que ocorreu dentro de um critério de inclusão, em que apenas indivíduos de idades entre 40 e 100 anos poderiam participar, e exclusão, onde pacientes pediátricos e vítimas de trauma não entraram no estudo. Em seguida, realizou-se a avaliação das prescrições dos antibióticos que ocorreram em 2015 na Unidade, totalizando 1800 prescrições. Após a separação das amostras, a próxima etapa foi a classificação das infecções e a quantificação do sexo dos pacientes acometidos pelas infecções. Calculou-se a porcentagem das infecções e elaboraram-se tabela e gráfico para melhor entendimento metodológico, utilizando os programas Word<sup>®</sup> e Excel<sup>®</sup>.

O projeto foi previamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética, apresentando o número CAE 56329416.6.1001.5208.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a avaliação das 1800 prescrições, observou-se o acometimento de diversas infecções apresentadas nos pacientes que procuraram atendimento na Unidade durante o ano de 2015, dentre elas; respiratórias, urinárias, cutâneas e gastrointestinais. Como se pode observar na Tabela 1, infecções cutâneas obtiveram o maior número de acometimentos, apresentando 38% do total, seguidas das infecções respiratórias e urinárias, com 35% e 12% respectivamente. Casos atípicos e isolados também tiveram destaque significativo (6%), pois referem-se a diagnósticos imprecisos ou ímpares como: cefaleia intensa; tontura e instabilidade; infecção bacteriana não especificada; septicemia não especificada; quadro infeccioso; tremores e alucinações; episódios de vômito; pé diabético; infecção em adulto; dor lombar em quadril; cefaleia crônica e anorexia. Infecções gastrointestinais (5%), infecções associadas (urinária + respiratória- 2%), infecções articulares (0,8%) e circulatórias (0,7%) tiveram um percentual menor, assim como a profilaxia (0,5%) que ocorreu por contato com caso de meningococemia. De todos os prontuários avaliados, 57% eram pacientes do sexo masculino.

INFECÇÕES	PORCENTAGENS (%)
INFECÇÕES CUTÂNEAS	38,00
INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS	35,00
INFECÇÕES URINÁRIAS	12,00
CASOS ATÍPICOS E ISOLADOS	6,00
INFECÇÕES GASTROINTESTINAIS	5,00
INFECÇÕES URINÁRIAS + INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS	2,00
INFECÇÕES ARTICULARES	0,80
INFECÇÕES CIRCULATÓRIAS	0,70
PROFILAXIAS	0,50

Tabela 1 – Classificação das infecções apresentadas na UPA Imbiribeira em 2015

Fonte: Dados da pesquisa

Assim como as infecções, as prescrições também foram diversificadas. Conforme mostra a Figura 1, 73% das prescrições de antibacterianos aconteceram incorretamente. Antibiótico prescrito, mas não indicado para determinada infecção, prescrições desnecessárias, diagnósticos incorretos ou incompletos e baixa integração do elenco de antibióticos disponíveis na unidade são fatores que contribuem, de fato, para tratamentos inadequados e conseqüentemente aumento de quadro de resistência bacteriana.

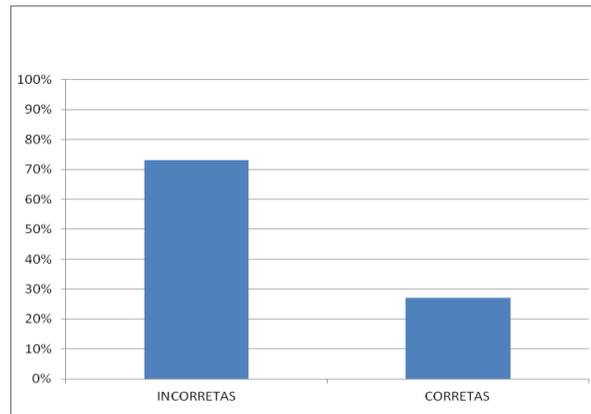


Figura 1 – Prescrições de antibióticos na UPA Imbiribeira em 2015.

Fonte: Dados da pesquisa

## 4. CONCLUSÃO

É de suma importância a realização de campanhas para conscientizar a população do risco que ela se encontra ao consumir de forma indiscriminada os antibióticos, bem como, a realização de capacitações constantes dos profissionais da área da saúde, para que ambos combatam o aumento da resistência bacteriana, mas também é necessário que se forneçam subsídios suficientes para que tanto os profissionais quanto a população tenham opções e acesso a tratamentos corretos e completos.

## 5. REFERÊNCIAS

BISSON, M. P. Campanha uso racional de antibióticos e combate à resistência bacteriana. *Cons. Reg. de Farm. do Est. de S. P.* São Paulo, Originalmente apresentado ao Ministério da Saúde como requisito à participação da 2ª edição do Prêmio Nacional de Incentivo à Promoção do Uso Racional de Medicamentos, 2010.

DIAS, M.; MENEZES, M. F.; MONTEIRO, M. S.. *Cader. de Otorrinol. . Clín., invest. e inova.* Lisboa: Círculo Médico, 2009.

FIOL, F. S. D.; FILHO, S. B.; LOPES, L. C.; TOLEDO, M. I. Perfil de prescrições e uso de antibióticos em infecções comunitárias. *Revis. da Soc. Bras. de Med. Trop.* Sorocaba, v. 43, n. 1, p. 68-72, jan-fev 2010.

## 6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Universidade Federal de Pernambuco e à Unidade de Pronto Atendimento Maria Esther Souto Carvalho – UPA Imbiribeira.

ÁREA DE SUBMISSÃO: ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA – AF 3

## **AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE INIBIDOR DE BOMBA DE PRÓTONS EM UMA FARMÁCIA DA FAMÍLIA DA ATENÇÃO BÁSICA DO RECIFE-PE.**

J. F. OLIVEIRA<sup>1</sup>, P.R.G. CARDOSO<sup>2</sup>, M. J. B. M. REGO<sup>2</sup>, D. P. LYRA-JR<sup>3</sup>, G. A. SANTOS-JR<sup>3</sup>,  
M. G. R. PITTA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Ciências Sociais Aplicadas CCSA, Universidade Federal de Pernambuco

<sup>2</sup> Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino, UFPE

<sup>3</sup> Laboratório de Ensino e Pesquisa em Farmácia Social, Universidade Federal de Sergipe-UFS  
E-mail para contato: jfoliveir@hotmail.com

*RESUMO - Os inibidores da bomba de prótons (IBP) são utilizados em doenças gastrointestinais, sendo uma das classes de medicamentos mais prescritas no mundo devido à sua elevada eficácia e baixa toxicidade. O objetivo do estudo foi avaliar a influência do aumento do consumo de omeprazol sobre os custos e suas possíveis causas. Foi realizado um estudo de natureza quantitativa para análise do custo, consumo e o tempo de tratamento (em semanas) na Farmácia da Família Alto do Pascoal, Distrito Sanitário 2, Recife-PE, no período de 2012 a 2015. Os dados foram obtidos a partir do sistema de gestão da assistência farmacêutica (HORUS). No período estudado, observou-se que o consumo de omeprazol foi proporcionalmente superior ao aumento do número de pacientes atendidos, implicando num custo associado ao medicamento quase três vezes maior. Nota-se um aumento importante no consumo de omeprazol em parte determinada pelo uso irracional que gera desperdícios de recursos dificulta o acesso além tornar o usuário mais vulnerável aos riscos potenciais.*

*Palavras-chave: Análise de custo, Farmácia Comunitária, Omeprazol, Uso irracional de medicamentos.*

*ABSTRACT - Inhibitors of proton pump (PPIs) are used in gastrointestinal disorders. It is one of the most prescribed drug classes in the world due to its high efficacy and low toxicity. The aim of this study was to evaluate the influence of increased consumption of omeprazole costs and their possible causes. A quantitative study was performed for analysis of the cost, consumption and the treatment time (in weeks) in the Farmácia da Família Alto do Pascoal, Distrito Sanitário 2, Recife - Brazil, between 2012 and 2015. Data were obtained from Pharmaceutical Management Information*



*System (HORUS). In the period studied, we observed that the consumption of omeprazole was proportionally greater than the increase in the number of patients. This resulted in an associated drug cost almost three times higher. Thereby, a significant increase in consumption of omeprazole, in part determined by the irrational use, entails in a waste of resources, difficult access to this drug and makes the user vulnerable to potential risks.*

*Keywords: Cost analysis, Community Pharmacy, Omeprazole, Irrational use of drugs*

## 1. INTRODUÇÃO

Os inibidores da bomba de prótons (IBP) são uma das classes de medicamentos mais prescritas no mundo devido à sua elevada eficácia e baixa toxicidade (Sanchez-Cuen *et al.*, 2013). São utilizados em doenças gastrointestinais, como a doença do refluxo gastroesofágico, a úlcera gástrica ou duodenal, a síndrome de Zollinger Ellison e a terapia de erradicação do *H. pylori* (Hegar *et al.*, 2013). Também tem indicação para o tratamento de dispepsia e entre os pacientes de alto risco com prescrição de aspirina, anti-inflamatórios não esteroidais (AINE), antiplaquetários e anticoagulantes (Abraham, 2012).

A evidência de eficácia e um perfil de segurança favorável dos IBP podem ter contribuído para um significativo aumento das prescrições. O custo mundial da terapia com esta classe de medicamentos só perde para o custo terapêutico com as estatinas, sendo estimado em mais de US \$ 11 bilhões por ano nos EUA (Heidelbaugh *et al.*, 2012)

No Brasil, o volume de recursos financeiros federais investidos na compra e distribuição de medicamentos no Sistema Único de Saúde (SUS) representou, em 2002, 9,7% do gasto em saúde financiado pelo Ministério da Saúde. Entre os fatores que podem influenciar o aumento dos gastos está o uso inadequado de fármacos. A partir do uso racional de medicamentos é possível maximizar os benefícios e minimizar os riscos decorrentes da sua utilização dos fármacos, além de reduzir os custos totais da terapia para o indivíduo e a sociedade (Mota *et al.*, 2008)

Considerando o consumo crescente de omeprazol na Farmácia da Família do Alto do Pascoal, localizada no território do Distrito Sanitário 2, Recife, este trabalho justifica-se pela necessidade de conhecer os custos associados ao aumento do consumo médio mensal deste medicamento, bem como suas possíveis causas.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Estudo de natureza quantitativa no qual foi analisado o custo, o consumo e o tempo de tratamento (em semanas) com o omeprazol na Farmácia da Família Alto do Pascoal no período de 2012 a 2015. Este serviço de saúde está localizado no Distrito Sanitário 2 da cidade do Recife e atende a quatro Equipes de Saúde da Família com média de 250 atendimentos/dia.

Os dados foram obtidos a partir de relatórios do sistema de gestão da assistência farmacêutica (HORUS), e digitados duplamente em planilha Excel para a análise estatística descritiva.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme mostram as figuras 1 e 2, o número de pacientes atendidos não aumentou na mesma magnitude do consumo de omeprazol. O elevado consumo implicou num custo associado ao medicamento quase três vezes maior, embora não tenha ocorrido alteração na quantidade de equipes de saúde referenciada à farmácia e, portanto, na cobertura populacional.

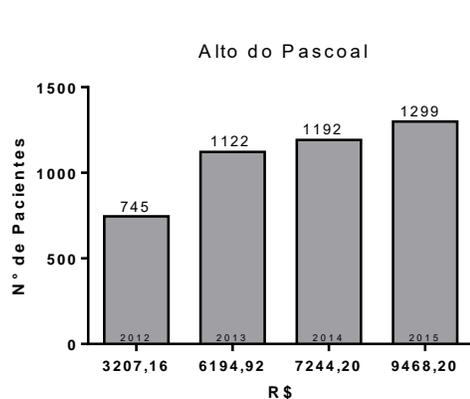


Figura 1 - Número de pacientes e custo (R\$) de Omeprazol 20 mg

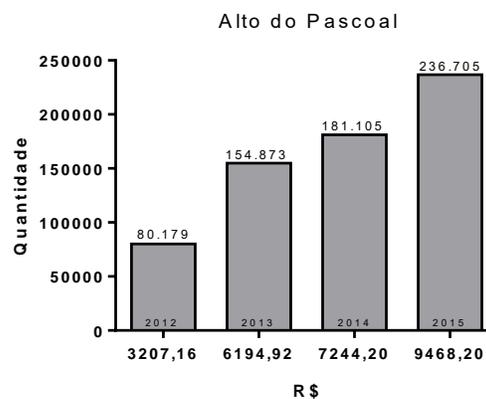


Figura 2 - Consumo (unidades) e custo (R\$) de Omeprazol 20 mg

Um dos fatores que possivelmente pode ter contribuído para essa disparidade é a duração do tempo de tratamento. Conforme mostra a figura 3 percebe-se que mais de 50 % dos pacientes fizeram uso de omeprazol acima de oito semanas.

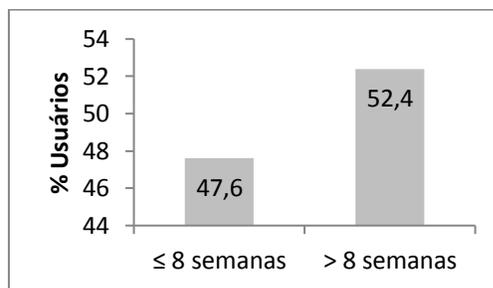


Figura 3 - Número de pacientes versus tempo de tratamento (semanas) com Omeprazol 20mg na Farmácia Alta do Pascoal (2015), Recife, PE.

Similarmente, Hipólito *et al.* (2016) demonstrou que 84,3% das prescrições apresentaram duração superior a seis meses e Cuen *et al.* (2013) constatou que 35,3% dos pacientes faziam uso crônico destes medicamentos. Entretanto, estes dados são contrários à literatura, que recomenda duração média de quatro a oito semanas para tratamento com IBP para as condições clínicas de hipersecreção ácida mais comuns (Brasil, 2010; Kelly *et al.*, 2015).



Assim, a sobreutilização do omeprazol encontrada neste estudo pode apontar para seu uso irracional, o que implica em elevação de custos (Ribeiro *et al.*, 2014) e exposição desnecessária à efeitos adversos, como hipergastrinemia, infecções respiratória e gastrointestinal, além de hipocloridria crônica que pode resultar em deficiências de ferro, cálcio e vitamina B12 (Haenisch *et al.*, 2015; Son; Zhu; Lu, 2014; Yuen; Nasiya, 2012).

#### 4. CONCLUSÃO

Pode-se perceber que o aumento no consumo de omeprazol resultou na elevação do custo financeiro para a assistência farmacêutica. Possivelmente esse cenário foi influenciado pelo uso irracional do medicamento que gera desperdícios de recursos, dificulta o acesso além tornar o usuário mais vulnerável aos riscos potenciais. É necessária a adoção de estratégias que minimizem o impacto do uso irracional como intervenções educativas, baseadas em evidência, dirigidas aos profissionais de saúde e à comunidade local para subsidiar a tomada de decisão terapêutica e gestão clínica com abordagem multiprofissional.

#### 5. REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, NS. Proton pump inhibitors: potential adverse effects. *Curr Opin Gastroenterol.*, v. 28, n. 6, p. 615-20, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Formulário terapêutico nacional 2010: Rename 2010. 2. ed., Brasília: Ministério da Saúde, 2010.
- SANCHEZ-CUEN, JA et al. Indicaciones inadecuadas en el consumo crónico de inhibidores de bomba de protones en un hospital de México: Estudio transversal. *Rev. esp. enferm. dig.*, v. 105, n. 3, p. 131-137, 2013.
- HAENISCH, B et al. Risk of dementia in elderly patients with the use of proton pump Inhibitor. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, v. 265, p.419-428, 2015.
- HEGAR, B et al. A double-blind placebo-controlled randomized trial on probiotics in small bowel bacterial overgrowth in children treated with omeprazole. *J. Pediatr.* v. 89, n. 4, p. 381-387, 2013.
- HEIDELBAUGH, JJ et al. Overutilization of proton-pump inhibitors: What the clinician needs to know. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, v. 5, n. 4, p. 219-232, 2012.
- HIPÓLITO, P et al. Perfil de usuários com prescrição de omeprazol em uma Unidade Básica de Saúde do Sul do Brasil: considerações sobre seu uso racional. *Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade*, v. 11, n. 38, p. 1-10, 2016.
- KELLY, OB et al. The Inappropriate Prescription of Oral Proton Pump Inhibitors in the Hospital Setting: A Prospective Cross-Sectional Study. *Dig Dis Sci*, v. 60, p. 2280-2286, 2015.
- MOTA, DM et al. Uso racional de medicamentos: uma abordagem econômica para tomada de decisões. *Ciênc. saúde coletiva*, v. 13, supl., p. 589-601, 2008.
- RIBEIRO, S et al. Uso inapropriado de inibidores da bomba de protões num serviço de medicina interna. *J Port Gastreterol.*, v. 21, n. 1, p. 9-14, 2014.
- SONG H, ZHU J, Lu D. Long-term proton pump inhibitor (PPI) use and the development of gastric pre-malignant lesions. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2014.
- YUEN TL; NASIYA NA. Fracture Risk and Bone Mineral Density Reduction Associated with Proton Pump Inhibitors. *Pharmacotherapy*, v. 32, n. 1, p. 67-79, 2012.

ÁREA DE SUBMISSÃO: ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA – AF 4

## AVALIAÇÃO DA IMPLANTAÇÃO DO COMITÊ TÉCNICO PARA O USO RACIONAL DE MEDICAMENTOS (CURAME) NA PREFEITURA DO RECIFE

M. T. M. FERNANDES<sup>1</sup>, F. H. L. GUIMARÃES<sup>2</sup> e R. M. F. SILVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas

<sup>2</sup>Prefeitura do Recife, Distrito Sanitário I

E-mail para contato: monicafernandees@gmail.com

*RESUMO – No Bet al, os medicamentos são considerados uma das principais causas de intoxicação por agentes tóxicos em humanos. O uso irracional de medicamentos tem contribuído para que muitos tratamentos não tenham eficácia terapêutica, e com isso, os pacientes voltem mais vezes aos consultórios médicos em busca de um tratamento eficiente. No município do Recife, uma equipe multiprofissional tem o objetivo de consolidar o Comitê Técnico para o Uso Racional de Medicamentos, o CURAME, com o objetivo de promover ações que favoreçam o uso racional de medicamentos, conscientizando e capacitando profissionais prescritores e dispensadores. Os pacientes também receberão informações sobre os medicamentos, em forma de campanhas educativas, conscientizando-os da importância de se usar determinado medicamento da forma correta, a fim de obter uma farmacoterapia resultante em uma melhora no tratamento. Por ainda estar em seus primeiros passos, o CURAME ainda precisa passar por diversas etapas até se consolidar no município. Ao se firmar, trará inúmeros benefícios para a população e gastos públicos, bem como redução dos índices de intoxicações pelo uso incorreto dos medicamentos.*

*Palavras-chave: Uso Irracional de Medicamentos, CURAME, eficácia terapêutica*

*ABSTRACT - In Brazil, the drugs are considered a major cause of intoxication by toxic agents in humans. The irrational use of drugs has contributed to many treatments have no therapeutic efficacy, and therefore, patients return more often to doctors' offices in search of an effective treatment. In Recife, a multidisciplinary team aims to consolidate the Technical Committee for the Rational Use of Drugs, the CURAME, in order to promote actions that promote the rational use of medicines, raising awareness and empowering*



*prescribers and dispensers professionals. Patients will also receive information about medicines in the form of educational campaigns, making them aware of the importance of using certain medication the right way in order to obtain a resulting pharmacotherapy in an improvement in treatment. To still be in its infancy, the CURAME still needs to go through several steps to consolidate the city. When firm, will bring numerous benefits to the population and public spending, as well as lowering the levels of poisoning by misuse of medicines.*

*Key-words: Irrational use of medicines, CURAME, therapeutic efficacy*

## 1. INTRODUÇÃO

Para que se possa propor o uso racional de medicamentos, é preciso antes de tudo, estabelecer a necessidade da utilização do medicamento; em seguida, que seja prescrito o medicamento adequado, o que atende a melhor escolha, levando em consideração eficácia e segurança comprovadas e aceitáveis. Além do mais é de fundamental importância que o medicamento seja prescrito na forma farmacêutica, dose e período de duração do tratamento adequado; que também esteja acessível e que responda sempre aos critérios de qualidade requeridos; onde haja a dispensação em condições que favoreçam a compreensão do usuário, e por fim, que o regime terapêutico seja cumprido da melhor forma possível (Aquino, 2008).

O uso racional de medicamentos tem por finalidade ampliar ao máximo os benefícios que são esperados pelo uso dos fármacos, diminuir os riscos relacionados à sua utilização (os efeitos não desejados) e minimizar os custos totais do tratamento tanto pra o indivíduo quanto para a sociedade (Mota et al., 2008).

O município do Recife foi contemplado pelo Ministério da Saúde em 2015, através do programa QUALIFARSUS, para desenvolver o projeto do cuidado farmacêutico, que visa à prática da clínica farmacêutica nos serviços da atenção primária à saúde. Farmacêuticos do município foram qualificados e desenvolveram consultas farmacêuticas que gerou a percepção de diversos problemas relacionados à farmacoterapia e conseqüentemente as intervenções farmacêuticas necessárias visando à melhoria na vida destes pacientes assistidos.

Um dos produtos deste projeto do cuidado farmacêutico foi à formação e implantação de um Comitê Técnico para promoção do uso racional de medicamentos e desta forma o Comitê de Promoção do Uso Racional de Medicamentos (CURAME), começa em 2016 a ser organizado dentro do município.

Os Comitês que são grupos de trabalhos técnico-científicos, de caráter multiprofissional, são uma estratégia para que se possa conhecer e avaliar o perfil de utilização dos medicamentos, para que então possam ser realizadas atividades de orientação, desenvolvimento de ações de conscientização, atividades de qualificação dos serviços e promover o uso racional de medicamentos no território (Bet al., 2014).



## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

Recife apresenta divisão sanitária em 08 territórios, que são os Distritos Sanitários. O Distrito Sanitário II foi o de escolha para a formação do primeiro CURAME, localizado na zona Norte da cidade. O CURAME tem amplitude para o todo o município, mas para efetividade e consolidação do mesmo foi definido um local piloto para início das atividades. Através de uma apresentação inicial aos profissionais do Distrito Sanitário II, foi realizada uma sensibilização para importância da formação deste comitê e posteriormente foi definida equipe multidisciplinar para compor o CURAME. Este trabalho trata-se de uma análise qualitativa através da observação participante no desenvolvimento e possíveis produtos gerados por este Comitê.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A proposta do uso racional de medicamentos fornecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS), é, de fato bastante desafiadora, tendo em vista que para que se haja o uso racional de medicamentos é importante a participação e colaboração de paciente, prescritor e dispensador.

O prescritor precisa fornecer ao paciente informações necessárias ao paciente, para que o mesmo possa estar ciente de sua farmacoterapia; o dispensador, por sua vez, tem o importante papel de complementar as informações à cerca do tratamento do paciente; e, por fim, o paciente necessita seguir todas as recomendações para que se tenha um sucesso no tratamento medicamentoso.

A ideia do Comitê é promover o uso racional de medicamentos passando-se por algumas etapas. Primeiro, é preciso fazer uma avaliação sobre determinada problemática encontrada no território, que esteja relacionada ao uso de algum medicamento ou classe de medicamentos que possam estar sendo usados de maneira incorreta. Em seguida, pretende-se debater essa temática com os integrantes do comitê, de forma a promover ações que possam ajudar na resolução do problema abordado. Daí a importância de uma equipe multiprofissional, visto que prescritores e dispensadores precisam estar de acordo ao que diz respeito ao uso racional daquele medicamento.

Quanto ao paciente, além de campanhas educativas feitas na unidade de saúde, o mesmo também receberá mais informações que possam contribuir para o seu tratamento durante a consulta médica e também consultas clínicas realizadas por farmacêuticos capacitados.

## **4. CONCLUSÃO**

No município do Recife, a implantação do CURAME ainda está em seus primeiros passos, já que é necessário, antes de tudo consolidar uma equipe multiprofissional, estabelecer regimentos, portarias, entre outros documentos necessários. Ao se firmar, o Comitê tende a trazer muitos benefícios para os pacientes, que receberão mais conhecimento sobre sua farmacoterapia, possuindo então, uma gama de informações que permite que o mesmo faça uso de medicamentos de forma consciente e racional.



## 5. REFERÊNCIAS

AQUINO, D. S. *Por que o uso racional de medicamentos deve ser uma prioridade? Ciência & Saúde Coletiva*, [S.l.], v. 13, n. p. 733-736, 2008.

BET AL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Cuidado Farmacêutico na Atenção Básica. Caderno 1: Serviços Farmacêuticos na Atenção Básica à Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

MOTA, D. M. *et al.* Uso racional de medicamentos: uma abordagem econômica para tomada de decisões. *Ciência & Saúde Coletiva*, [S.l.], v. 13, p. 589-601, 2008.

## 6. AGRADECIMENTOS

À Prefeitura do Recife, por disponibilizar o tema e profissionais qualificados para a preceptoria deste trabalho, e à UFPE, pela contribuição científica.

ÁREA DE SUBMISSÃO: ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA – AF 5

## AVALIAÇÃO DAS DIFICULDADES NA ADESÃO AO MEDICAMENTO NO TRATAMENTO DE TUBERCULOSE EM PACIENTES COM COINFEÇÃO HIV/TUBERCULOSE DA POLICLÍNICA LESSA DE ANDRADE

E. S. MORAIS<sup>1</sup>, E. F. SANTIAGO<sup>2</sup> e R. M. F. SILVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas

<sup>2</sup>Prefeitura do Recife, Policlínica Lessa de Andrade.

E-mail para contato: emmanuellemoraes2@gmail.com

*RESUMO – A Tuberculose (TB) tem sido estimada como uma das doenças mais associadas à infecção pelo human immunodeficiency virus (HIV), e que possui um alto índice de não adesão ao tratamento medicamentoso. Dentre as principais causas que estão intimamente ligadas à adesão e ao abandono em coinfectados HIV/TB, estão fatores relacionados ao paciente e estilo de vida. O objetivo deste trabalho é descobrir através do questionário aplicado aos pacientes, o conhecimento deles sobre a tuberculose e avaliar se essa pode ser uma dificuldade na adesão do tratamento da TB nesses pacientes coinfectados. Através do sistema Hórus<sup>®</sup>, identificou-se os pacientes com coinfeção HIV/TB cadastrados na policlínica Lessa de Andrade. De setenta e dois pacientes cadastrados, trinta e sete foram encontrados e vinte e cinco responderam ao questionário, no qual treze, dos vinte cinco participantes não sabiam o que era a doença tuberculose. E pelo menos nove já possuíam o ensino médio completo. Com isso, pode-se inferir que há falta de orientação para esses pacientes, mesmo eles possuindo um grau de escolaridade acima da média. Assim, revela que o tratamento de pacientes com HIV/TB requer acompanhamento especial, no que se diz maior informação sobre a doença.*

*Palavras-chave: Tuberculose. Coinfecção. Adesão*

*ABSTRACT - The Tuberculosis (TB) has been estimated as one of the most common diseases associated with infection by the human immunodeficiency virus (HIV), and it has a high rate of non adherence to drug treatment. Among the main causes that are closely related to adherence and abandonment in HIV/TB coinfectated cases are factors related to the patient and their lifestyle. The objective of this study is to discover, through the*



*questionnaire applied to the patients, their knowledge about tuberculosis and to evaluate if it is related with the difficulty in adherence to TB treatment in these coinfecting patients. Through the Horus® system, patients with HIV/TB coinfection enrolled in the Lessa de Andrade polyclinic were identified. From seventy-two patients registered, thirty-seven were found and twenty-five answered the questionnaire, in which thirteen of the twenty five participants did not know what the tuberculosis disease was. And at least nine had completed high school. Therefore, it can be inferred that there is a lack of orientation for these patients, even though with an above-average level of education. Thus, this study reveals that the treatment of patients with HIV/TB requires special monitoring related with more information about the disease.*

*Keywords: Tuberculosis. Coinfection. Accession*

## 1. INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma doença antiga, mas ainda assim, é um grande problema de saúde pública, não só emergencial no Brasil, mas também no mundo. Diversas causas estão ligadas ao aumento da incidência de tuberculose (TB), dentre elas: a pobreza e a má distribuição de renda; além do limitado conhecimento sobre a doença e o abalo da coinfeção HIV/TB. (Brasil, 2004). A tuberculose tem uma especial relevância, dentre as doenças associadas com a infecção pelo HIV. (Santos, 2009) Atualmente, conforme estimativas da OMS, dois bilhões de pessoas correspondendo a um terço da população global, estão infectadas com a doença, e que a cada ano, ocorram 9 milhões de casos novos. (Silva *et al.*, 2016). O Brasil ocupa a 16ª posição, em número absoluto de casos desde 2009. (Brasil, 2015) A taxa de desistência da terapia de tuberculose é muito elevada, apesar de essa terapia ser efetiva e econômica. O que pode justificar essa elevação é o tempo do tratamento, efeitos colaterais/secundários, a falta de informação e de acompanhamento aos pacientes (De Souza, 2005). O abandono é considerado um dos principais problemas e desafios para a luta contra a doença, tendo, como resultado claro, o crescimento do custo do tratamento, da mortalidade e das taxas de reincidência, além de facilitar o desenvolvimento de resistência bacteriana. (Ferreira *et al.*, 2005). O objetivo desta pesquisa foi conhecer e compreender os fatores, que levam à não adesão, avaliando suas dificuldades e descrevendo o que leva o paciente com coinfeção HIV/TB a abandonar ao tratamento medicamentoso.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado na Policlínica Lessa de Andrade, localizada no bairro da Madalena, na cidade de Recife, Pernambuco. A pesquisa é de corte transversal, descritiva com abordagem quantitativa. Através do sistema Hórus® e dos prontuários, encontraram-se pacientes com coinfeção HIV/TB. Os pacientes responderam a um questionário aplicado, que foi desenvolvido pelos autores, que continha perguntas como escolaridade e conhecimento de informações sobre tuberculose: O que é tuberculose? /Qual a transmissão? /Qual a prevenção? /Como é feito o diagnóstico inicial? /Qual a duração do tempo de tratamento? /Quando é considerado abandono de tratamento? Todas as perguntas possuíam alternativas para guiar os pacientes para alguma resposta. Participaram do estudo,

os admitidos na instituição, de janeiro de 2012 até dezembro de 2015, que possuíam a coinfeção HIV/TB. A análise de dados foi realizada através do programa Microsoft Excel®, que deu os resultados em gráficos, baseados nas respostas do questionário. O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, da Universidade Federal de Pernambuco, apresentando número CAE: 50767315.0.0000.5208.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontrados setenta e dois pacientes com coinfeção HIV/TB. Dentre eles, três já haviam entrado em óbito e trinta e dois não foram encontrados. Dos trinta e sete que poderiam ser incluídos no estudo, vinte e cinco responderam o questionário. Dos resultados mais relevantes, treze dos vinte e cinco participantes não sabiam definir o que era a doença, mesmo com opções de resposta, como mostra a Figura I.

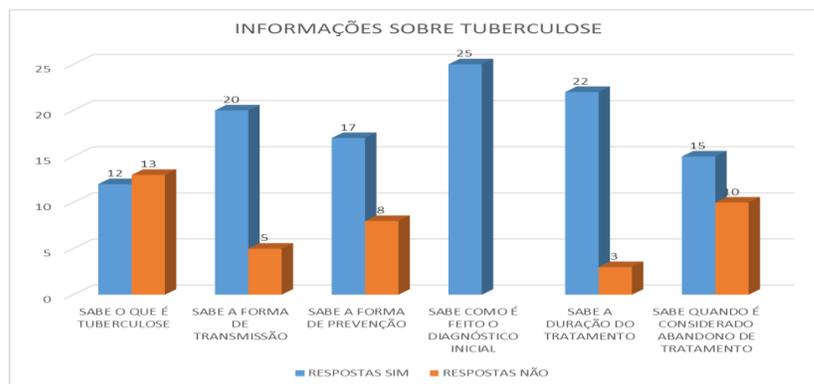


Figura I: Informações sobre tuberculose; Respostas do questionário aplicado aos pacientes coinfectados HIV/TB.

Do total, vinte e dois sabiam o tempo de duração do tratamento exato, abandoná-lo poderia ser uma questão consciente. Porém, segundo Rodrigues (2010), há uma interferência de grande relevância nos fatores socioeconômicos, para o abandono do tratamento da TB, visto que a baixa escolaridade é de grande importância na interrupção do tratamento. Esse motivo se manifesta na compreensão dos doentes nos seus problemas de saúde e interferem em sua adesão a terapia. No que diz respeito a saber quando é considerado abandono de tratamento, verificou-se que dez, não sabiam. Isso implica em não saber exatamente o mês que aconteceu o abandono. Ferreira, em 2005, afirmou que um relevante no controle do abandono é saber o mês da sua ocorrência. À medida que os pacientes sentem-se bem de um modo geral e, na maioria das vezes, sem sintomas aparentes, o abandono acontece ao término do primeiro e no começo do segundo mês de tratamento. Também relatou que é considerável o grau de escolaridade na incidência da não adesão, pois mostrou-se que pessoas de baixo nível de escolaridade ou até mesmo baixa escolarização abandonam 79,5% mais o tratamento do que os demais. Nota-se nesse estudo, associando as respostas sobre informação à TB com o grau de escolaridade dos participantes, que pode não ter ligação ao conhecimento sobre a doença. Pois os participantes apresentaram um nível mediano de escolaridade, como mostra a Figura II.

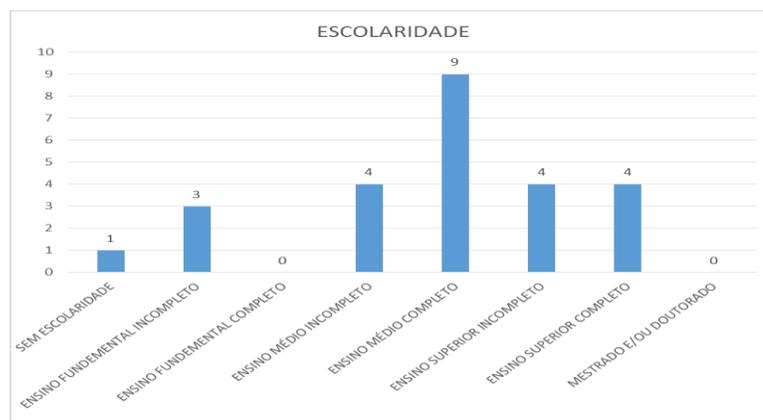


Figura II: Informações sobre escolaridade; Respostas do questionário aplicado aos pacientes coinfectados HIV/TB.

#### 4. CONCLUSÃO

O tratamento de pacientes com HIV/TB requer cuidados e acompanhamentos especiais, devido à não adesão da terapia. Faz-se necessária a implementação de novas estratégias, para controle do abandono, aumento de informações e políticas públicas de saúde no combate às duas mais importantes doenças infectocontagiosas de nosso século. A orientação dos pacientes, tendo eles escolaridade ou não, pelos profissionais de saúde é uma das alternativas mais rápidas e com maior retorno ao paciente, porém fatores relativos ao conhecimento pela escolaridade dos pacientes são mais difíceis de serem alterados, pelo fato de depender de ações de educação governamentais, que torna mais complexo essa mudança.

#### 5. REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Saúde. *Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde*, Brasília, v. 46, n. 9, 2015.
- FERREIRA S.M.B. *et al.* Abandono do tratamento da tuberculose pulmonar em Cuiabá - MT – Brasil. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, Cuiabá, v. 31, n. 1, p.10-3, 2005.
- RODRIGUES, I.L.A. *et al.* Abandono do tratamento de tuberculose em coinfectados TB/HIV. *Revista da Escola de Enfermagem da USP - Revistas USP*, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 383-7, 2010.
- SANTOS, J.S. *et al.* A coinfeção tuberculose e HIV: Um Importante Desafio - Artigo de revisão. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, Santa Maria, v. 41, n. 3, p. 209-215, 2009.

#### 6. AGRADECIMENTOS

À Policlínica Lessa de Andrade, da Prefeitura do Recife.

**ÁREA DE SUBMISSÃO: ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA – AF 6****ATUAÇÃO DO FARMACÊUTICO NA CAPACITAÇÃO DE ATENDENTES DAS FARMÁCIAS DAS UNIDADES DE SAÚDE DA FAMÍLIA NOS DISTRITOS SANITÁRIOS III E VII DA CIDADE DE RECIFE – PE**

A. ARAGÃO<sup>1</sup>, T. PAULINA<sup>1</sup> e A. LUCENA<sup>2,3</sup> V.Q. Guerra<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas.

<sup>2</sup> Faculdade Pernambucana de Saúde.

<sup>3</sup> Farmacêuticos do Distrito Sanitário III da Cidade do Recife

E-mail para contato: alexlucenav@hotmail.com

*RESUMO – Sendo a Assistência Farmacêutica um conjunto de atividades relacionadas ao medicamento, faz-se necessário a compreensão de seu conceito por todos aqueles que são responsáveis pela chegada do mesmo ao seu destino, o paciente. Nas Unidades de Saúde do Recife, a responsabilidade da farmácia é dos atendentes, que são encarregados de entregar os medicamentos à população. O paciente, ao receber o medicamento, necessita de orientação, pois é ele que administrará o medicamento fora da Unidade de Saúde e sem supervisão direta de um profissional de saúde e assim, aqueles que estão encarregados desta função necessitam de treinamento adequado. Por isso, anualmente, os farmacêuticos da farmácia do Distrito Sanitário III/VII oferecem uma capacitação, a fim de que problemas relacionados à rotina de dispensação sejam sanados. A capacitação tratou de diferentes temas e situações, com auxílio audiovisual. Como ferramenta de compreensão e sondagem dos conhecimentos prévios e adquiridos, foram aplicados questionários ANTES DO TREINAMENTO com questões relativas à problemática cotidiana E AO o fim do treinamento, houve a possibilidade de responder ao mesmo questionário novamente, para atestar a eficácia da capacitação realizada. Através dos resultados apresentados foi demonstrada a importância e possibilidade de confirmar qualitativamente a efetividade da capacitação realizada, uma vez que em todos os grupos trabalhados verificou-se um aumento na assimilação do real papel, atribuições e peculiaridades da função na farmácia, por parte dos atendentes.*

*Palavras – chaves: Assistência Farmacêutica, Atendentes de Farmácia, Farmacêutico.*

*ABSTRACT - Being the Pharmaceutical Assistance a set of activities related to the medicine, it becomes necessary to understand its concept by all those who are*



*responsible for the arrival of the medicine to its last destiny, the patient. In the Health Units of Recife, the responsibility of the pharmacy is the attendants, who are in charge of delivering the medicines to the population. When receiving the medication, the patient needs guidance because they will administer the medicine outside the Health Unit and without direct supervision of a health professional and thus those who are in charge of this function need adequate training. Therefore, pharmacists in the Sanitary District III / VII pharmacy provide training every year, so that problems related to the dispensing routine are settled. The training dealt with different themes and situations, with audiovisual assistance. As a tool for understanding and probing previous and acquired knowledge, questionnaires were applied before the training with questions related to the daily problematic, and at the end of the training, it was possible to respond to the same questionnaire again, to attest the effectiveness of the training performed. Through the results presented, it was demonstrated the importance and possibility of qualitatively confirming the effectiveness of the training performed, since in all the groups studied there was an increase in the assimilation of the real role, attributions and peculiarities of the function in the pharmacy, by the attendants.*

*Keywords: Pharmaceutical Services, Attendants of Pharmacy, Pharmacist.*

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo as diretrizes definidas na Política Nacional de Medicamentos, a assistência farmacêutica pode ser definida como um conjunto de atividades relacionadas com o medicamento. Envolve desde o abastecimento de medicamentos, a conservação, o acompanhamento e a avaliação da utilização, a obtenção e a difusão de informação sobre medicamentos e a educação permanente dos profissionais de saúde, do paciente e da comunidade para assegurar o uso racional de medicamentos. (CONASS 2006) Com o aumento populacional e quantidade de Unidades de Saúde (US's), a composição territorial da cidade do Recife foi redividida, onde o número de distritos sanitários passou de seis para oito. Assim a farmácia distrital III e VII atende a 28 unidades de saúde que abrangem 29 bairros deste município. Cada unidade de saúde possui uma farmácia que está sob responsabilidade dos atendentes. Estes funcionários são os responsáveis por entregar os medicamentos à população.

Ao receber o medicamento, o paciente necessita de orientação, pois é ele quem administrará o medicamento fora da Unidade de Saúde e sem supervisão direta de um profissional de saúde. São graves os problemas relacionados ao uso e à gestão inadequada dos medicamentos. Ao se adotar a conduta de que os medicamentos podem ser “entregues” por qualquer pessoa, valoriza-se mais a quantidade dos medicamentos dispensados e não a qualidade e resolutividade da assistência farmacêutica. Ao não se exercer um controle rigoroso dos estoques, da aquisição e da dispensação, certamente, haverá um comprometimento do erário com desperdícios de recursos, possibilitando desvios e perdas, acarretando como consequência prejuízos aos usuários do SUS (CONASS 2006).

Visando a melhoria da qualidade na entrega dos medicamentos à população, a farmácia dos distritos III e VII realizam anualmente uma capacitação, a fim de que as dúvidas e problemas relacionados à rotina de dispensação sejam sanadas. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o papel do farmacêutico na capacitação dos atendentes de farmácia das unidades de



saúde pertencentes aos distritos sanitários III e VII.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

Foram convocados para realização da capacitação os funcionários das farmácias que compõem os distritos sanitários III e VII. Os atendentes foram divididos em 3 grupos, baseando-se na disponibilidade e tempo de serviço dos mesmos, totalizando três horas de treinamento para cada grupo. Como ferramenta de compreensão e sondagem dos conhecimentos prévios e adquiridos foram aplicados questionários semiestruturados contendo dez questões objetivas relativas à problemática cotidiana. Inicialmente os questionários foram distribuídos a fim de aferir o nível de conhecimento sobre o que seria discutido na exposição, como também, esclarecer as possíveis dúvidas e identificar os pontos críticos que precisariam de maior ênfase.

Diferentes temas foram abordados como automedicação, uso racional de medicamentos, estocagem e acondicionamento, descarte, formas farmacêuticas, dispensação, medicamentos genéricos e um estudo casuístico dos demais programas atendidos pela farmácia distrital. Após o término do treinamento, foi oferecida a possibilidade de responder ao mesmo questionário novamente, para comprovar qualitativamente a eficácia da capacitação realizada, através dos conhecimentos adquiridos.

Os dados obtidos foram avaliados de forma qualitativa e quantitativa a partir dos questionários aplicados aos funcionários em treinamento. Para a avaliação quantitativa foi realizada uma análise estatística descritiva com auxílio do programa Microsoft Office Excel 2007. Os valores percentuais apresentados foram calculados baseados na diferença das médias obtidas antes e após a capacitação, com a finalidade da verificação dos conhecimentos prévios e adquiridos.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Foi avaliado um total de 30 pessoas, dentre elas funcionários efetivos e contratados por empresas terceirizadas, em regime de exercício da função. Através dos dados obtidos a partir dos questionários foi possível observar que a função de atendente de farmácia é exercida em sua maioria por mulheres (73%), com faixa etária entre 21 e 49 anos, que apresentam segundo grau completo. A grande maioria dos funcionários efetivos encontra-se afastada do seu cargo original por algum tipo de problema e enviados a assumir a farmácia da unidade. Observou-se que 80% dos analisados não possuíam conhecimento ou capacitação na área de medicamentos na época em que assumiram a função de atendente de farmácia e relataram dificuldades ao iniciarem a função.

Os resultados obtidos a partir dos questionários apontam que os atendentes de maneira geral conseguiram responder pouco mais da metade do questionário que apresentava problemas relacionados à sua rotina na farmácia. A capacitação realizada abordou diferentes temas e situações/problema, com auxílio audiovisual e discussão das maiores dificuldades encontradas, apresentando sugestões para resolução baseado nas experiências e vivências do grupo. Observou-se que após esse momento de troca de informações, houve um aumento geral na compreensão das problemáticas abordadas, fato observado qualitativamente após reaplicação do questionário respondido inicialmente. Observou-se que o grupo 1 apresentou um percentual menor de acertos antes do treinamento,



demonstrando assim um menor domínio de conhecimentos prévios relativos à farmácia. Esse fato pode ser justificado pela composição dos integrantes deste grupo, sendo formado em sua maioria por funcionários novatos no cargo ou mesmo recém-contratados por empresas terceirizadas. Dessa forma, é possível verificar que esse grupo apresentou o maior incremento (37%) na capacidade de solucionar os problemas propostos com o questionário após a capacitação, demonstrando a importância desse momento.

Apesar de nenhum dos grupos terem chegado a 90% de acertos, vale salientar o grupo 2, que obteve a maior média dos grupos. Identifica-se, portanto, dentre os constituintes desse grupo um maior número de funcionários que apresentam maior tempo na função, maior domínio das problemáticas relativas à farmácia e um maior comprometimento com a unidade. Os resultados apresentados demonstram a importância dessa capacitação, como uma atribuição farmacêutica essencial dentre as etapas necessárias a uma Assistência Farmacêutica de qualidade. Segundo, o anexo I da resolução 539 do Conselho Federal de Farmácia (2010), fica claro a competência e importância do farmacêutico no que diz respeito à capacitação de gestores, profissionais de saúde e funcionários envolvidos no processo. Além destas, faz parte de suas atribuições elaborar materiais informativos, estudos e pesquisas que promovam o conhecimento científico e tecnológico, além de compartilhar tais informações.

#### **4. CONCLUSÃO**

Diante dos resultados apresentados, é comprovada a necessidade e importância do profissional farmacêutico no Sistema Único de Saúde e seu papel na responsabilidade da constante qualificação dos profissionais que estão à frente das farmácias das Unidades de Saúde, visando uma perspectiva de amenizar os erros no tocante à logística e à dispensação de medicamentos e outros insumos. É possível inferir qualitativamente a efetividade da capacitação realizada, uma vez que em todos os grupos trabalhados verificou-se um aumento na assimilação do real papel, atribuições e peculiaridades de sua função na farmácia, por parte dos atendentes. Observa-se, por fim, a necessidade da constante qualificação profissional e a realização de estudos como este, que fomentem o conhecimento científico e tecnológico e evidenciem a importância do farmacêutico dentro da cadeia da assistência, como um agente ativo e indispensável no cumprimento da integralidade das ações de saúde no que tange as políticas de Assistência Farmacêutica e de Medicamentos.

#### **5. REFERÊNCIAS**

- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Formulação de Políticas de Saúde. *Política Nacional de Medicamentos*. Brasília. 1999.
- CONSELHO NACIONAL DE SECRETÁRIOS DE SAÚDE - CONASS. *Para Entender a Gestão do SUS*. Brasília: CONASS. 2003.
- CONSELHO FEDERAL DE FARMÁCIA- *A assistência farmacêutica no SUS*. Brasília: Conselho Federal de Farmácia. 2010.
- CONSELHO FEDERAL DE FARMÁCIA. *Resolução 539 de 22 de outubro de 2010*. Dispõe sobre o exercício profissional e as atribuições privativas e afins do farmacêutico nos Órgãos de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. Diário Oficial da União. 2010.
- BRASIL. Secretaria de Saúde do Recife. *Plano Municipal de Saúde 2014-2017*. 2014.



## **6. AGRADECIMENTOS**

Prefeitura Municipal do Recife, Farmácia do Distrito Sanitário III/VII e Paulo Evandro Santana, por todo apoio e colaboração.



**BIOENSAIOS**



ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOENSAIOS – B 1

## NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE IL-17A DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO IRRADIADAS *IN VITRO*

A.G. NASCIMENTO<sup>1</sup>, G. F. SILVA<sup>1</sup>, E. DINIZ<sup>1</sup>, L. LEITE<sup>1</sup>, P.R.G. CARDOSO<sup>2</sup>, K. VILAR<sup>2</sup>, M.G.R PITTA<sup>2</sup>, M.J.B.M REGO<sup>2</sup>, T. S. FERNANDES<sup>1,3</sup>, E. BORGES DA SILVA<sup>1,4</sup>, A. AMARAL<sup>1</sup>, M. BRAYNER CAVALCANTI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Estudos em Radioproteção e Radioecologia - GERAR/DEN/UFPE

<sup>2</sup> Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas - LINAT/NUPIT SG/UFPE

<sup>3</sup> Departamento de Biofísica e Radiobiologia - DBR/UFPE

<sup>4</sup> Centro Acadêmico de Vitória- CAV/UFPE

E-mail: maribrayner@yahoo.com.br

**RESUMO** – *A exposição individual às radiações ionizantes (RIs) pode afetar o sistema imunológico, resultando em desequilíbrio na expressão de citocinas envolvidas na resposta inflamatória, podendo ser um fator limitante em tratamentos com RIs. Testes preditivos da resposta inflamatória associada a uma irradiação poderia resultar num indicador de radiosensibilidade individual. Amostras de sangue foram obtidas de 5 voluntários sendo uma alíquota irradiada e uma outra não irradiada, as células foram incubadas a 37° C e 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 e 48 horas. Realizou-se o MTT e quantificação de IL-17A pelo teste de ELISA. Houve um aumento dos níveis médios de IL-17A das amostras irradiadas, quando comparadas as não irradiadas, contudo os dados disponíveis não são suficientes para indicar uma diferença estatisticamente significativa. Nossos resultados sugerem que os níveis de IL-17A aumentam com o resultado da exposição à radiação ionizante, o que conseqüentemente pode significar que in vivo levaria a uma exacerbação do processo inflamatório radioinduzido.*

**Palavras-chave:** *Radiossensibilidade individual – Inflamação– Citocinas*

**ABSTRACT-** *The individual exposure to ionizing radiation (IRs) can affect the immune system, resulting in imbalance in the expression of cytokines involved in the inflammatory response and may be a limiting factor in treatments with IRs. The IL-17A plays a pro-inflammatory action having an important role. Therefore, it can represent an indicator of response to ionizing radiation. Blood samples were obtained from 05 subjects where a sample was irradiated and the other non-irradiated, and then cells were incubated at 37 °C 5% CO<sub>2</sub> for 24 and 48 hours. MTT was performed for the cell viability test and the quantification of IL-17A was carried out by ELISA. There was an increase in the mean of the levels of IL-17A in the irradiated samples, when compared to non-irradiated ones, although the available data were not sufficient to indicate a*



*statistically significant difference. Our results suggest that IL-17A levels increase with the result of exposure to ionizing radiation, which consequently can mean that in vivo would lead to an exacerbation of the inflammatory process radiation induced.*

*Keywords: Radiosensitivity individual - Inflammation – Cytokines*

## 1. INTRODUÇÃO

A radioterapia (RT) é uma estratégia de tratamento do câncer que utiliza a radiação ionizante (RI) como agente físico para causar o dano ao DNA e morte celular. Mais de 50% dos pacientes com câncer recebem este tipo de tratamento. Embora a eficácia da RT seja diretamente proporcional ao aumento da dose de radiação administrada no tumor, as chances de surgimento de efeitos adversos nos tecidos normais também aumentam (Barnett *et al.*, 2009).

Cerca de 10% dos pacientes submetidos à RT podem apresentar reações adversas atreladas à radiotoxicidade. Alguns pacientes submetidos à radioterapia apresentam os sinais típicos de um quadro inflamatório agudo (e.g.: edema, calor, rubor e dor). Esses sinais decorrem de uma cascata de transdução de mediadores celulares induzidos pela interação da radiação com o tecido sadio adjacente ao tumor. A instalação desse quadro inflamatório provém de uma exacerbção da resposta imunológica e é uma reação adversa limitante da radioterapia, apresentando-se de forma singular em cada indivíduo, determinando a sua radiosensibilidade (Barnett *et al.*, 2009).

A radiosensibilidade pode ser descrita como uma característica intrínseca a qual está associada ao surgimento dos efeitos adversos oriundos da RI sobre o corpo humano. Embora seja reconhecidamente um aspecto importante para a eficácia da RT, não há um indicador clínico ou laboratorial para definição de protocolos de tratamentos. Nesse sentido, pesquisas envolvendo metabólitos celulares vêm ganhando espaço como potenciais biomarcadores de radiosensibilidade (Barnett *et al.*, 2009).

Neste contexto, as citocinas estão intimamente associadas ao grau de lesão tecidual, sendo proteínas integrantes dos mecanismos inespecíficos de defesa, secretadas pelas células da imunidade inata e adquirida, e pelas células endoteliais. Sua produção em cascata é estimulada pela RI, apresentando um pico entre 4 e 24 h após irradiação, contribuindo significativamente para a radiosensibilidade celular e complicações teciduais após à RT (Di Maggio *et al.*, 2015).

No estado fisiológico basal, as citocinas são encontradas em concentrações muito baixas ou até indetectáveis. A elevação dos níveis dessas proteínas é sugestiva de ativação da resposta inflamatória decorrente de patologia associada, sendo, por essa característica, potenciais marcadores biológicos de distúrbios metabólicos característicos de estresse físico-químico (Stelmaszcyk-Emmel *et al.*, 2013).

Dentre as citocinas, a IL-17A possui um papel importante na resposta inflamatória. Esta citocina atua como um importante mediador nas reações inflamatórias. No entanto, ainda não se tem muitos esclarecimentos quanto ao seu papel frente à RT, mas devido ao seu caráter inflamatório a IL-17A pode ser uma das indutoras da radiodermite e dessa forma a sua quantificação é de extrema importância para prever efeitos adversos ocasionados pela exposição às RIs (Martin-Orozco *et al.*, 2009). Neste contexto, esta pesquisa avaliou os níveis de IL-17A produzidas pelas células mononucleares do sangue periférico irradiadas, *in vitro*.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Aspectos Éticos, Coleta e Irradiação das Amostras

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (parecer de nº1.084.387). Amostras de sangue periférico (SP) de 5 voluntários, com idades entre 23-25 anos, foram utilizadas neste estudo. De cada voluntário, foram coletados 12 mL de SP em tubos contendo heparina. Para cada amostra, foram separadas duas alíquotas de 6 mL: uma alíquota não foi irradiada (controle), enquanto a outra alíquota foi irradiada com 2 Gy a partir de um Acelerador Linear de 6 MV.

### 2.2. Obtenção das Células Mononucleares e Cultura de Células

As Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMCs), foram obtidas a partir de um gradiente de densidade (Ficoll- Paque Plus). Após a obtenção das PBMCs, essas foram lavadas e o botão celular foi ressuscitado em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF).

### 2.3. Teste de Citotoxicidade

Para avaliar a citotoxicidade radioinduzida foi realizado o teste MTT. As células foram incubadas a 37° e 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas e após este tempo, a solução de MTT- sal de tetrazolium (0,5 mg/mL) foi adicionado e as placas retornaram à incubadora por mais 3 horas. Em seguida, foram adicionados 120 µL da solução de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) 20% para dissolução do precipitado. A leitura das placas foi realizada, 24 horas depois, em um espectrofotômetro (Elx808, Biotek, EUA) a um comprimento de onda de 570nm.

### 2.4. Quantificação da IL-17<sup>a</sup>

Para a quantificação da IL-17A foi utilizado o sobrenadante da cultura celular composta de 1x10<sup>6</sup> PBMCs/ml incubadas a 37° C e 5% de CO<sub>2</sub>, com estímulo de PMA e Ionomicina, durante 24 e 48 horas. Para quantificação da IL-17A foi empregado o ELISA sanduíche seguindo as recomendações do fornecedor (eBioscience, limite de detecção 500 - 3,096 pg/mL). As placas foram lidas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 450 e 570 nm.

### 2.5. Análise estatística

Os resultados foram expressos em mediana e amplitude (mínima - máxima). O teste ANOVA, para dados pareados, foi utilizado para comparar as diferenças na produção, antes e após a irradiação, de citocina de PBMCs, nos tempos considerados. O teste foi considerado estatisticamente significativo quando  $p < 0,05$ .

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A viabilidade média das amostras não irradiadas foi de 82,69% ± 17,02, enquanto que para as amostras irradiadas foi de 98,03% ± 4,05. Mediante os resultados obtidos, percebe-se que a dose de 2 Gy não afetou a viabilidade das células (≥ 80%) nestas condições.

Para células cultivadas por 24 horas e não irradiadas, a mediana da expressão de IL-17A foi de 36,68 pg/mL (14,86 - 96,08 pg/mL), enquanto para as amostras irradiadas, foi de 83,96 pg/mL (3,09 - 180,92 pg/mL). Já para as células cultivadas por 48 horas, o valor da mediana foi de 3,09 pg/mL, tanto para as amostras irradiadas quanto não irradiadas. As amplitudes foram de (3,09 - 60,92 pg/mL) e de (3,09 - 41,53 pg/mL) para as amostras não irradiadas e irradiadas, respectivamente (Figura 1).

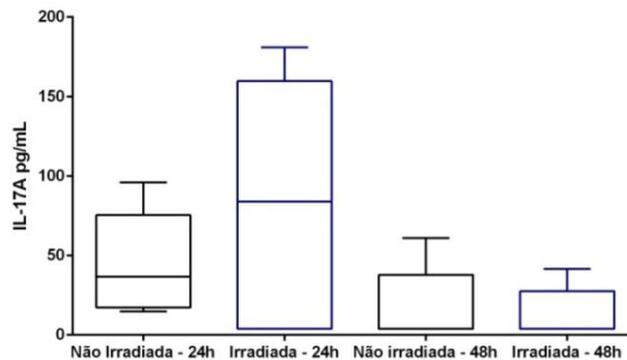


Figura 1 - Níveis de IL-17A (pg/mL) de células irradiadas e não irradiadas, cultivadas por 24 e 48 horas.

Embora seja possível observar um aumento de expressão da IL-17A nas células irradiadas e cultivadas por 24 horas, não foi possível observar diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados.

Com os resultados, acima observa-se uma indução de expressão de IL-17A produzidas pelas células irradiadas nas primeiras 24 horas. Essa produção decai com o tempo, como é observado nas culturas de 48 horas. A IL-17A é uma citocina pró-inflamatória recentemente descoberta e implicada em numerosas reações inflamatórias. Esta citocina pode estimular uma variedade de células a produzir fatores inflamatórios e quimiocinas. Estudos recentes têm demonstrado uma relação entre os níveis de expressão de IL-17A e pneumonite e fibrose pulmonar radioinduzida (Wang *et al.*, 2014). Os resultados obtidos nesta pesquisa indicam uma diferença interindividual dos níveis de expressão de IL-17A o que pode estar relacionado com a radiosensibilidade individual. Com isso, espera-se que os indivíduos que expressam maiores níveis de IL-17A sejam os mais predispostos a sofrer efeitos indesejáveis decorrentes de uma radioexposição, a exemplo do surgimento de fibrose pulmonar.

#### 4. CONCLUSÃO

A dosagem de IL-17A em amostras irradiadas e cultivadas por 24 horas melhor evidenciaram diferenças de expressão desta citocina entre os indivíduos. A confirmação desses resultados pode permitir a avaliação preditiva da resposta imunológica individual frente a uma exposição à radiação ionizante, contribuindo no estabelecimento de protocolos específicos para cada paciente na radioterapia.

#### 5. REFERÊNCIAS

- BARNETT, G. C.; WEST, C. M. L.; DUNNING, A. M.; ELLIOTT, R. M.; COLES, C. E.; PHAROAH, P. D. P.; BURNET, N. G. Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. *Nat. Rev. Cancer*, v. 9, n. 2, p. 134–142, 2009;
- DI MAGGIO, F.M.; MINAFRA, L.; FORTE, G.I.; CAMMARATA, F. P.; LIO, D.; MESSA, C.; GILARDI, M. C.; BRAVATÀ, V. Portrait of inflammatory response to ionizing radiation treatment. *Int. J. Radiat. Res.*, v. 12, n. 14, p. 1-11, 2015;



MARTIN-OROZCO, N.; MURANSKI, P.; CHUNG, Y.; YANG, X.O.; YAMAZAKI, T.; LU, S.; HWU, P.; RESTIFO, N.P.; OVERWIJK, W. W.; DONG, C. T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity*, v. 31, p. 787–798, 2009.

STELMASZCZYK-EMMEL, A.; ZAWADZKA-KRAJEWSKA, A.; SZYPOWSKA, A.; KULUS, M.; DEMKOW, U. Frequency and Activation of CD4+CD25<sup>high</sup> FoxP3+ Regulatory T Cells in Peripheral Blood from Children with Atopic Allergy. *Int. Arch. Allergy Immunology*, v. 162, p. 16–24, 2013.

WANG, L. P.; WANG, Y. W.; WANG, B. Z.; SUN, G. M.; WANG, X. Y.; XU, J. L. Expression of Interleukin-17A in Lung Tissues of Irradiated Mice and the Influence of Dexamethasone. *Scientific World Journal*. V .2014

## 6. AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo e Apoio a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT - UFPE), Centro de Radioterapia do Instituto de Medicina Integrada Prof. Antônio Vieira (IMIP).



ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOENSAIOS – B 4

## AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE IFN- $\gamma$ EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO IRRADIADAS *IN VITRO*

A.G. NASCIMENTO<sup>1</sup>, E. C. DINIZ<sup>1</sup>, G. F. SILVA<sup>1</sup>, L. L. B. LEITE<sup>1</sup>, P.R.G. CARDOSO<sup>2</sup>, M.F. CORDEIRO<sup>2</sup>, M.G.R PITTA<sup>2</sup>, M.J.B.M REGO<sup>2</sup>, S.C. DANTAS<sup>3</sup>, T. S. FERNANDES<sup>1,4</sup>, E. BORGES DA SILVA<sup>1,5</sup>, A. AMARAL<sup>1</sup>, M. BRAYNER CAVALCANTI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Estudos em Radioproteção e Radioecologia - GERAR/DEN/UFPE

<sup>2</sup>Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas - LINAT/NUPIT SG/UFPE

<sup>3</sup>Setor de Radioterapia do Instituto Medicina Integrada Prof. Antônio Figueira -IMIP

<sup>4</sup>Departamento de Biofísica e Radiobiologia - DBR/UFPE

<sup>5</sup>Centro Acadêmico de Vitória- CAV/UFPE

E-mail: maribrayner@yahoo.com.br

**RESUMO** – Alguns indivíduos ao serem expostos as radiações ionizantes (RIs) podem apresentar efeitos adversos exacerbados de origem inflamatória e que podem estar relacionados com a radiosensibilidade individual. Existem vários mediadores envolvidos no processo inflamatório e dentre estes, as citocinas são de grande importância. Estas proteínas podem ter sua expressão aumentada pela interação das RIs com o tecido vivo, portanto, podem se apresentar como potenciais biomarcadores de exposição às RIs. Logo, este trabalho objetivou avaliar os níveis de IFN- $\gamma$  em células mononucleares do sangue periférico irradiadas *in vitro*. Para tal, amostras de sangue periférico de 8 voluntários foram irradiadas (2 Gy) e processadas, em seguida as células mononucleares foram obtidas e cultivadas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas. Realizou-se o ensaio de citotoxicidade MTT e a quantificação de IFN- $\gamma$  foi realizada em sobrenadante das culturas pela técnica de ELISA. Houve um aumento dos níveis médios de IFN- $\gamma$  na maioria das amostras irradiadas, quando comparadas as não irradiadas, embora os dados disponíveis não tenham sido suficientes para indicar uma diferença estatisticamente significativa.

**Palavras-chave:** Biomarcador. Radiossensibilidade. Citocinas. Inflamação

**ABSTRACT** – Some patients when submitted to radiation therapy (RT) may present exacerbated adverse effects in terms of inflammatory response which may be related to the individual radiosensitivity. There are mediators related to the inflammatory process and among them, cytokines are of great importance. These proteins may have its expression increased by the interaction of IRs with living tissue, therefore, it can present as a potential biomarker of exposure to IRs. With this, this work aimed to evaluate the levels of IFN-  $\gamma$  in



*mononuclear cells of the in vitro peripheral blood. For such, samples from peripheral blood of 8 volunteers were irradiated (2 Gy) and processed, and then cells were incubated at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> during 48 hours. MTT cytotoxicity assay was performed and the quantification of IFN- $\gamma$  was carried out in the supernatant of cell cultures by the ELISA technique. There were an increase of the mean levels of IFN-  $\gamma$  in the majority of irradiated samples, when compared to the non-irradiated ones, although the data available were not sufficient to indicate a statistically significant difference.*

*Keywords: Biomaker. Radiosensitivity. Citokynes. Inflammation*

## 1. INTRODUÇÃO

Diversos estudos propõem que o espectro de reações adversas que ocorrem no tecido normal, após a exposição às radiações ionizantes (RIs), é função da radiosensibilidade individual. O conceito de radiosensibilidade pode ser descrito como uma característica intrínseca associada ao surgimento dos efeitos adversos que surgem no corpo humano após exposição às RI's (Burnet *et al.*, 1992;1996).

As respostas às RIs são bastante variadas dentre a população, cada individuo pode responder clinicamente e fisiologicamente diferente e, diversos são os fatores que podem contribuir para esta heterogeneidade de resposta, dentre eles tem-se: idade, fatores ambientes, doenças de base e diferenças genéticas (Carl and Sprung *et al.*, 2015).

A base genética da radiosensibilidade envolve muitos fatores e, conseqüentemente, inviabiliza atualmente sua determinação direta. As diferentes funções celulares, como a sobrevivência da célula, capacidade de reparo, formação de aberrações de cromossômicas e a apoptose influenciam na radiosensibilidade individual (Twardella; Chang-Claude, 2002; Borgmann *et al.*, 2008).

Ademais, a exposição às RIs pode estimular a atividade imunológica ativando o processo inflamatório e conseqüentemente a produção de citocinas. Portanto, pesquisas envolvendo citocinas na área da radiobiologia vêm sendo propostas no intuito de se relacionar citocinas pró e anti-inflamatória com a radiosensibilidade. Neste contexto, esta pesquisa objetivou avaliar os níveis de IFN- $\gamma$  produzidos pelas células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) irradiadas, *in vitro*.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (parecer de nº1.084.387). Amostras de sangue periférico (SP) de 8 voluntários (4 homens e 4 mulheres), com idades entre 23 e 62 anos, foram utilizadas neste estudo. De cada voluntário, foram coletados 18 mL de SP em tubos contendo heparina. Para cada amostra, foram separadas duas alíquotas de 9 mL: uma alíquota foi não irradiada (controle), enquanto a outra alíquota foi irradiada com 2 Gy a partir de um Acelerador Linear de 6MV.

Para avaliar a citotoxicidade radioinduzida foi realizado o MTT (3-(4,5- dimetiliazol-2- il)-2,5- difenil brometo tetrazólico). As células foram incubadas a 37° e 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas, foi adicionado a solução de MTT- sal de tetrazolium (0,5mg/mL) e as placas retornaram à incubadora

por mais 3 horas. Em seguida, foram adicionados 120 $\mu$ L da solução de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) 20% para dissolução do precipitado. A leitura das placas foi realizada, 24 horas depois, em um espectrofotômetro a um comprimento de onda de 570nm.

Para a quantificação de IFN- $\gamma$  foi realizada a técnica do ELISA seguindo as recomendações do fabricante (BD Bioscience - limite de detecção 9,375 - 600 pg/mL). Utilizou-se sobrenadante de cultura celular composta de 1x10<sup>6</sup>PBMCs/ml incubadas a 37° C e 5% de CO<sub>2</sub>, com estímulo de PMA e Ionomicina, durante 48 horas.

Os resultados foram expressos em mediana e amplitude (mínima - máxima). O teste ANOVA, para dados pareados, foi utilizado para comparar as diferenças na produção, antes e após a irradiação, de citocina de PBMCs, nos tempos considerados. O teste foi considerado estatisticamente significativo quando  $p < 0,05$ .

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A viabilidade média das amostras não irradiadas foi de 82,69%  $\pm$  17,02, enquanto que das amostras irradiadas foi de 98,03%  $\pm$  4,05. Mediante os resultados obtidos, percebe-se que a dose de 2Gy não afetou a viabilidade das células ( $\geq 80\%$ ).

A mediana da expressão de IFN- $\gamma$  para as células não irradiadas foi de 2853,6 pg/mL (1392,80 - 11169,60 pg/mL), enquanto para as amostras irradiadas foi de 3603,4058 pg/mL (543,50 - 8587,00 pg/mL). Embora seja possível observar um aumento de expressão de IFN- $\gamma$  nas células irradiadas, não foi possível observar diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados (Figura 1).

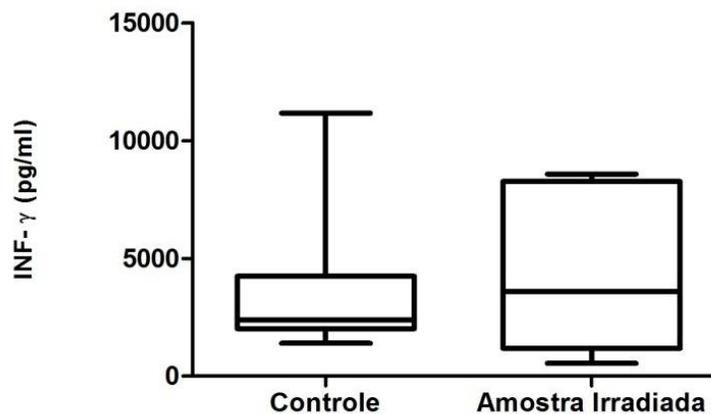


Figura 1 - Níveis de IFN- $\gamma$  de amostras não irradiadas (controle) e irradiadas.

O IFN- $\gamma$  é uma das primeiras citocinas a serem produzidas na resposta inflamatória, com múltiplas ações, dentre elas a ação pró-inflamatória esta citocina é responsável por coordenar vários mecanismos celulares como ações citotóxicas (Mesquita júnior *et al.*, 2010; Souza; Junior; Araújo, 2010). Li e colaboradores (2014) realizaram uma pesquisa em trabalhadores de minas de Urânio, expostos à baixas doses de radiação ( $\leq 20$  mSv), tendo observado altos níveis de IFN- $\gamma$  nestes indivíduos.



Verifica-se uma diferença interindividual dos níveis de expressão de IFN- $\gamma$  nas amostras irradiadas, estes dados, acrescidos de outros dados clínicos e laboratoriais, podem contribuir significativamente para prever complicações teciduais após a exposição às RIs.

#### 4. CONCLUSÃO

Os níveis medianos de expressão do IFN- $\gamma$  das amostras irradiadas foram maiores do que o controle. Observou-se uma diferença dos níveis de IFN- $\gamma$  intraindividual o que pode estar relacionada com a resposta imunológica individual frente a uma exposição à radiação ionizante.

#### 5. REFERÊNCIAS

- BORGMANN, K.; HOELLER, U.; NOWACK, S. et al. Individual radiosensitivity measured with lymphocytes may predict the risk of acute reaction after radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* v.71, p. 256-264, 2008.
- BURNET, N. G.; NYMAN, J.; TURESSON, I.; WURTN, R.; YAMOLD, J. R.; PEACOCK, J. H. Prediction of normal-tissue tolerance to radiotherapy from in-vitro cellular radiation sensitivity. *Lancet*, v. 339, p. 1570–1571, 1992.
- BURNET, N. G.; WURM, R.; NYMAN, J.; PEACOCK, J. H. Normal tissue radiosensitivity - how important is it? *Clinical Oncology*, v. 8, p. 25-34, 1996.
- LI, K.; YISHUI C.; LI X.; LEI S.; CHEN Q.; LIU J.; SUN Q. Alteration of cytokine profiles in uranium miners exposed to long-term low dose ionizing radiation. *Scientific World J*, v. 2014, p. 216408, 2014.
- SOUZA, A.W.S.; DE; JUNIOR, D. M.; ARAÚJO, J. A. P. Sistema Imunitário – Parte III O delicado equilíbrio do sistema imunológico entre os pólos de tolerância e autoimunidade. *Rev Bras Reumatol* v. 55, n. 11, 2010.
- SPRUNG C.; IVASHKEVICH A.; FORRESTER H.; REDON C.; GEORGAKILAS A. Martin O. Oxidative DNA damage caused by Inflammation may link to stress-induced non-targeted Effects. *Cancer lett.*, v. 356, p. 72–81, 2015.
- TWARDELLA, D.; CHANG-CLAUDE, J. Studies on radiosensitivity from an epidemiological point of view—overview of methods and results. *Radiother oncol.*, v. 62, n. 3, p. 249–260, 2002.

#### 6. AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo e Apoio a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT - UFPE), Setor de Radioterapia do Instituto Medicina Integrada Prof. Antônio Figueira (IMIP).



ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOENSAIOS – B 5

## **AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL CITOTÓXICO DOS ÓLEOS DE *Alpinia speciosa*, *Ageratum conyzoides* e *Dysphania ambrosioides* NA LINHAGEM CELULAR DE CÂNCER DE PÂNCREAS MIA PACA-2**

V.A.S. SILVA<sup>1</sup>; M. A. B. CORREIA<sup>1</sup>, M. J. B. M. RÊGO<sup>1</sup>, M. C. PEREIRA<sup>1</sup>, R. D. SÁ<sup>2</sup>, R. F. SANTOS<sup>2</sup>, T. G. J. SILVA<sup>2</sup>, K. P. RANDAU<sup>2</sup> e M. G. R. PITTA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Laboratório de Inovação Terapêutica (LINAT), Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT)

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Farmacognosia

E-mail para contato: vitinhoalfredo85@hotmail.com

**RESUMO:** *O câncer de pâncreas figura como a oitava causa de morte por neoplasias, e até o presente não há tratamento eficaz. Diante disso, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito citotóxico do óleo das folhas de *Alpinia speciosa*, *Ageratum conyzoides* e *Dysphania ambrosioides* em células mononucleares do sangue periférico e em célula de linhagem de câncer pancreático. Para isso, após o isolamento de células mononucleadas do sangue periférico e cultivo de células tumorais, realizamos a ensaio de citotoxicidade pelo método do MTT. Os resultados indicam que o óleo da espécie *A. speciosa* na concentração 0,025% apresenta ação tóxica em células tumorais na linhagem MIA PaCa-2, mas não apresentou efeito citotóxico para células mononucleares do sangue periférico. Por outro lado, o óleo da espécie *D. ambrosioides* foi tóxica apenas na concentração de 0,5% para as células mononucleares no sangue periférico sendo a mesma toxicidade não observada na linhagem de câncer de Pâncreas. Enquanto que a *A. conyzoides* não apresentou toxicidade em nenhuma das células. Logo, são necessários mais estudos para avaliar os mecanismos de ação do óleo de *A. speciosa* em linhagens tumorais.*

**Palavras chaves:** *Citotoxicidade, plantas medicinais, antitumoral.*

**ABSTRACT:** *The pancreatic cancer figures as the eighth leading cause of death from neoplasias and to date, there is no effective treatment. Thus, the aim of the study has been to evaluate the cytotoxic effect of *Alpinia speciosa*, *Ageratum conyzoides* and *Dysphania ambrosioides* leaves oil on peripheral blood mononuclear cells and on*



*pancreatic cancer cell line. For this, after the isolation of peripheral blood mononuclear cells and cultivation of tumor cells, we have performed a cytotoxicity assay by the MTT method. The results indicate that oil from the species *Alpinia speciosa*, in a concentration of 0.025%, presents toxic action on tumor cells in the line MIA PaCa-2, but it did not show cytotoxic effect on mononuclear cells from peripheral blood. Otherwise, the oil of the species *D. ambrosioides* was found toxic only in a concentration of 0.5% for mononuclear cells in peripheral blood, while *A. conyzoides* showed no toxicity in any of the cells from pancreatic cancer lineage. Therefore, more studies are needed to evaluate the *A. speciosa* oil's mechanisms of action in tumor cell lines. This is the first report of *Alpinia speciosa* plant oil in MIA PaCa-2 strain.*

*KeyWords: Cytotoxicity, medicinal plants, antitumor.*

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de pâncreas figura como a oitava causa de morte, em virtude de seu diagnóstico tardio (Teague *et al.*, 2015). Substratos naturais provenientes de plantas têm despertado grande interesse na busca por tratamento para diversos tipos de doenças, incluindo o câncer (Greenwell; Rahman, 2015). As plantas medicinais têm sido extensivamente pesquisadas, em virtude de sua disponibilidade natural e como alternativa de baixo custo para o tratamento de diversas doenças, incluindo as cancerígenas (Tabassum; Hamdani, 2014).

Extratos de *Alpinia speciosa* apontam que essa planta apresenta propriedades antimicrobianas, antiparasitária e diurética (Correia *et al.*, 2010; Ghosh; Rangan, 2012) e *Dysphania ambrosioides* possui amplo espectro como anti-inflamatório, antifúngicas e cicatrizantes (Oliveira *et al.*, 2014; Sá *et al.*, 2015), contudo, o efeito antineoplásico de ambos ainda precisa ser investigado. *Ageratum conyzoides* possui ação anti-inflamatória e atualmente sua ação antitumoral vem sendo relatado na literatura (Momesso *et al.*, 2009; Adebayo *et al.*, 2010). O objetivo do estudo foi avaliar o efeito citotóxico dos óleos de *Alpinia speciosa*, *Ageratum conyzoides* e *Dysphania ambrosioides* em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e em linhagem de câncer de pâncreas (MIA PaCa-2) através do ensaio de MTT.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

**2.1. Cultivo de células tumorais:** A linhagem de câncer pancreático humano (MIA PaCa-2) (ATCC CRL-1420) foi mantida à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> em meio DMEM High Glucose (3,7g/L de bicarbonato de sódio, 1% penicilina e estreptomicina) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 2,5% de soro de cavalo.

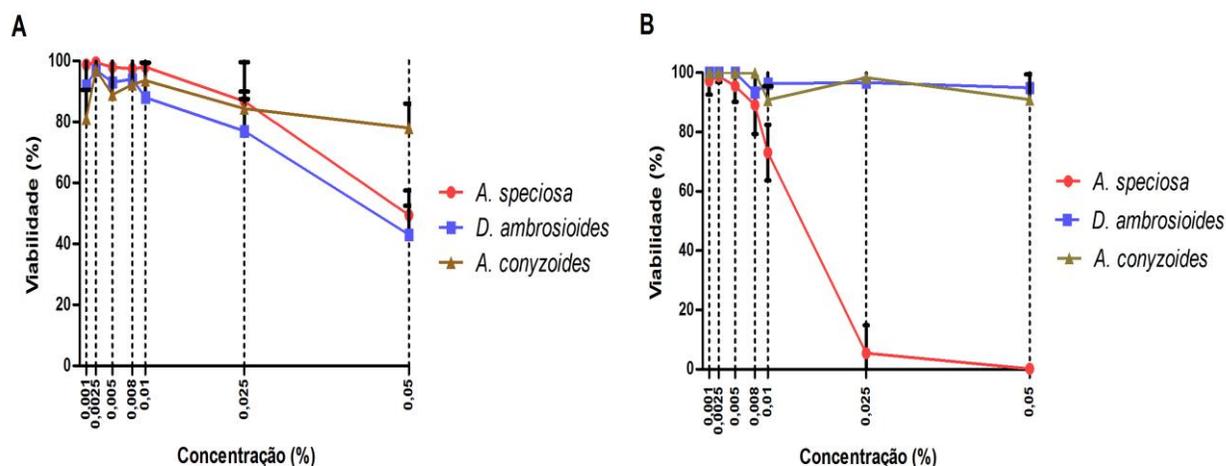
**2.2. Ensaio de viabilidade celular por MTT:** Ensaio de citotoxicidade (MTT) em células do sangue periférico (PBMC) de três voluntários sadios foram separadas com Ficoll, contadas em câmara de Neubauer com o corante azul de Tripán e plaqueadas na concentração de 3x10<sup>5</sup> células por poço. Células de linhagem tumoral MIA PaCa-2 foram plaqueadas na concentração de 1x10<sup>6</sup>, em placas de

96 poços. Os óleos das folhas das plantas (*A. speciosa*, *A. conyzoides* e *D. ambrosioides*) nas porcentagens de 0,001%, 0,0025%, 0,005%, 0,008%, 0,01%, 0,025% e 0,05% foram utilizados para o tratamento das células no período de 48 horas para PBMC e 72 horas para tumoral. As placas foram mantidas em estufa à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período foi adicionado 20µL de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina), após 3 horas de incubação 130 µL SDS (dodecil sulfato de sódio) e mantidas em temperatura ambiente por 24 horas. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (Biotek EL808) em 570nm. Os experimentos foram realizados em triplicata, os voluntários assinaram o formulário de livre consentimento aprovado pelo comitê de ética (23076.041556/2015-62).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas medicinais têm sido extensivamente pesquisadas, em virtude de sua disponibilidade natural e como alternativa de baixo custo para o tratamento de diversas doenças, incluindo o câncer. (Tabassum; Hamdani, 2014). Em PBMCs os óleos de *A. speciosa*, *D. ambrosioides* e *A. conyzoides* na concentração de 0,05%, foram citotóxicos com viabilidade celular de 49,42%, 43,46% e 78,06%, respectivamente (Figura 1A). As demais concentrações destes óleos foram menos tóxicas em PBMCs. Esses dados sugerem uma relação dose-resposta dos óleos em PBMCs e que concentrações abaixo de 0,05% apresentam menos toxicidade. (Figura 1A).

Em MIA PaCa-2, câncer de pâncreas, o óleo de *A. speciosa* foi o único citotóxico. A viabilidade celular após tratamento com este óleo foi 5,44% na concentração de 0,025%. Os demais óleos não foram citotóxicos em nenhuma das concentrações testadas (Figura 1 B). Além disso, foi calculado IC<sub>50</sub> (concentração capaz de matar 50% das células) do óleo de *A. speciosa* em MIA PaCa-2. O valor médio obtido do IC<sub>50</sub> foi de 0,014 %. Esses resultados sugerem que o óleo de *A. speciosa* foi o que apresentou os melhores resultados, pois é pouco tóxico para as células normais e apresenta elevada citotoxicidade para a linhagem tumoral de câncer de pâncreas testada.



**Figura 1.** (A) Efeito citotóxico dos óleos de *A. speciosa*, *A. conyzoides* e *D. ambrosioides* em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e (B) linhagem (MIA PaCa-2) de câncer pancreático.



Estudos já relataram o potencial antineoplásico do gênero *Alpinia* em alguns tipos de linhagens neoplásicas como MCF-7 (tumor de mama), HepG2 (tumor de fígado) (Ghosh; Rangan, 2012). *D. ambrosioides* tem sido referido como eficiente **KeyWords:** znte na inibição de células de câncer de mama (Jia-liang et al., 2013), enquanto *Ageratum conyzoides* na inibição de tumor de Ehrlich (Momesso et al., 2009).

#### 4. CONCLUSÃO

Dentre os óleos das espécies testadas, apenas o óleo de *A. speciosa* mostrou-se promissor, uma vez que apresentou citotoxicidade para linhagem de câncer pancreático humano (MIA PaCa-2) e não apresentou em células de PBMC na concentração de 0,025%. Estudos para elucidar este mecanismo devem ser realizados com os compostos naturais bioativos isolados com o propósito de desenvolver um agente terapêutico alvo para o câncer de pâncreas.

#### 5. REFERÊNCIAS

- ADEBAYO A. H. et al., Anticancer and antiradical scavenging activity of *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). *Pharmacogn Magazine*. v. 6, p. 62-66, Março, 2010.
- CORREIA et al., *Alpinia zerumbet* (Pers.) B. L. Burtt & R. M. Sm. (Zingiberaceae): levantamento de publicações nas áreas farmacológica e química para o período de 1987 a 2008. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. v. 12, p. 113-119, Outubro, 2010.
- GHOSH; RANGAN. *Alpinia*: the gold mine of future therapeutics. *Biotech*. v. 3, p. 173–185, Setembro, 2012.
- GREENWELL; RAHMAN. Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment. *Int J Pharm Sci Res*. v. 6, p. 4103-4112, Novembro, 2015.
- JIA-LIANG et al., Cytotoxicity of Essential Oil of *Chenopodium ambrosioides* L against Human Breast Cancer MCF-7 Cells. *Tropical Journal of Pharmaceutical*. v. 12, p. 929-933, Dezembro, 2013.
- MOMESSO L.S, *Atividade antitumoral do Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 19, p. 660-663, Setembro, 2009.
- OLIVEIRA et al., Erva de Santa Maria (*Chenopodium ambrosioides* L.): Aplicações clínicas e formas tóxicas – Revisão de literatura Herb Santa Maria (*Chenopodium ambrosioides* L.): Clinical applications and toxic forms – A review. *Jornal Brasileiro de Ciência Animal*. v.7, p. 464 - 499, 2014.
- SÁ et al., Óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L.: estado da arte. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. v. 36, p.267-276, 2015.
- TEAGUE A. et al., Advanced pancreatic adenocarcinoma: a review of current treatment strategies and developing therapies. *Ther Adv Med Oncol*. v.7, p. 68–84, Março, 2015.
- TABASSUM E HAMDANI, Plants used to treat skin diseases. *Pharmacogin*. v. 8, p. 52-60, Junho, 2014.

#### 6. AGRADECIMENTOS

CAPES, FACEPE, INCT\_if.



ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOENSAIOS – B 7

## ANÁLISE SOROLÓGICA COMPARATIVA EM INDIVÍDUOS COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA)

A.M. S. PEREIRA<sup>1</sup>, B. C. OLIVEIRA<sup>1,2</sup>, A. P.O. MENDES<sup>1</sup> e V. R. A. PEREIRA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Recife, Pernambuco, Brasil

<sup>2</sup> Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil

E-mail para contato: allanamariasp@gmail.com

**RESUMO** - *O objetivo do estudo foi avaliar por citometria de fluxo, a participação da resposta imune humoral no desenvolvimento de lesões cutâneas e na resposta ao tratamento em indivíduos infectados com L. (V.) braziliensis, principal espécie causadora da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). Soros inativados foram utilizados para imunofluorescência indireta (IFI), ensaio imunoenzimático (ELISA) e citometria de fluxo. Na análise das curvas ROC, a área sobre a curva da IFI (ASC=0,879; IC<sub>95%</sub>= 0,754-0,954) foi semelhante à citometria de fluxo (ASC= 0,890; IC<sub>95%</sub>=0,767-0,961). O mesmo foi observado comparando o ensaio de ELISA (ASC=0,808; IC<sub>95%</sub>= 0,652-0,915) com citometria de fluxo (ASC= 0,896; IC<sub>95%</sub>= 0,758-0,970). Na padronização de IgG3, a diluição 1:200 foi a que melhor discriminou os grupos avaliados. A análise da curva de titulação do anticorpo IgG3 anti-formas promastigotas de L.(V.) braziliensis em soros controles foi expressa como valores da porcentagem de parasitas fluorescentes positivos (PPFP), onde a diluição 1:256 foi a região (R) de melhor reatividade. Dessa forma sugere-se que a citometria de fluxo aplica-se ao diagnóstico da LTA, por apresentar resultados positivos na presença da doença, assim como os dois testes utilizados na rotina laboratorial. O uso do isotipo IgG3 também pode se aplicar ao diagnóstico da LTA, uma vez que distinguiu pacientes e controles, porém são necessários mais estudos em relação a sua aplicabilidade.*

**Palavras-chave:** *Leishmania (V.) braziliensis – LTA – Citometria de Fluxo – IFI – ELISA*

**ABSTRACT** - *The aim of this study was to evaluate, through flow cytometry, the participation of the humoral immune response in the development of cutaneous lesions and in response to treatment in individuals infected with L. (V.) braziliensis, principal species which causes the American Tegumentary Leishmaniasis (ATL). Inactivated serum samples were used in the tests of indirect immunofluorescence (IFA), enzyme-*



*linked immunosorbent assay (ELISA) and flow cytometry. The analyses of the ROC curves showed that the area under the curve of IFA (ASC=0.879; IC 95%= 0,754-0,954) was similar to flow cytometry's (ASC= 0.890; IC 95%= 0,767-0,961). The same was observed comparing ELISA (AsC=0.808; IC 95%= 0,652-0,915) with flow cytometry (ASC= 0.896; IC 95%= 0,758-0,970). To assess the reactivity of IgG3, dilutions 1:50 to 1:800 were tested. 1:200 was the dilution which best distinguished the two groups. The analysis of the titration curves of IgG3 anti-promastigotes of *L. (V.) braziliensis* present in the controls sera, meaning values of the percentage of positive fluorescent parasites (PPFP), indicate that 1:256 is the region (R) of reactivity. In this sense, it is possible to suggest that flow cytometry can be applied to the diagnosis of ATL, as it has presented positive results in the presence of the disease, such as the two tests used in the laboratorial routine for ATL. Although the use of the isotype IgG3 might be applied to the diagnosis of ATL, since it distinguished patients and controls, it is necessary to perform more studies regarding its applicability.*

*Keywords: Leishmania (V.) braziliensis - LTA - Flow cytometry – IFI – ELISA*

## 1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) pode ser causada por diversas espécies de protozoários parasitas do gênero *Leishmania*. No Brasil, a principal espécie causadora é a *Leishmania (Viannia) braziliensis*. A resposta imune celular é essencial para a eliminação de patógenos intracelulares, e se aceita, de uma maneira geral, que o mecanismo protetor da LTA é dependente das células T (Trujillo et al., 2000; Souza et al., 2005). Diversos perfis e níveis de imunoglobulinas específicas para *Leishmania* têm sido detectados em pacientes com LTA. (Gutierrez Y et al., 1991). Na leishmaniose cutânea e mucocutânea a resposta do tipo Th1 tem sido associada com a presença de isotipos IgG1, IgG2 e IgG3, já a resposta do tipo Th2 está atrelada com a presença de IgG4 na leishmaniose cutânea difusa (Souza et al., 2005). Para o diagnóstico sorológico de LTA, as técnicas mais utilizadas são a reação de imunofluorescência indireta (IFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA), porém esses métodos possuem algumas limitações, como baixa sensibilidade e especificidade. (Kar, K., 1995). Um dos principais fatores para esse menor desempenho é pela falta de correlação entre os níveis de anticorpos circulantes com o estágio da doença (Kar, 1995). E a constante presença de reações cruzadas com outros tripanosomatídeos como a *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi* (Vexenat et al, 1996). Devido a essas limitações, diversas abordagens imunológicas alternativas vêm sendo estudadas. Uma delas é a citometria de fluxo, que promove a análise simultânea de diversas características físicas de partículas individuais, conforme o fluxo de fluido desloca-se através de um feixe de luz, assim possibilitando a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* (Rocha et al., 2006). Esta técnica apresenta várias vantagens para os imunoenaios, tais como, a possibilidade de quantificação do analito, volume reduzido de amostra, grande reprodutibilidade e sensibilidade, uma ampla faixa dinâmica e a capacidade para multiplexagem (Jani et al., 2002).

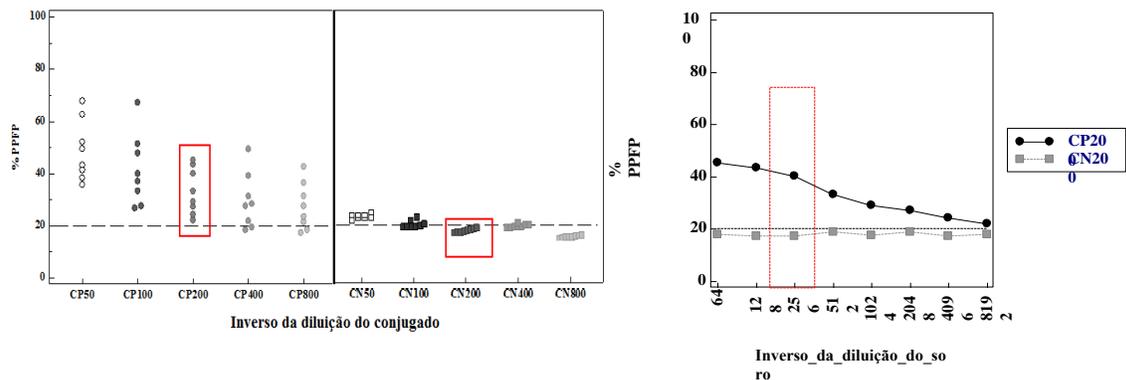


## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram selecionados 15 pacientes portadores de lesões ativas, que receberam atendimento no ambulatório do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), onde ficaram cientes do objetivo do estudo e concordaram em assinar o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (TCLE). Os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética do CPqAM/FIOCRUZ, parecer nº 011/2013, registro no CAEE 11083812.7.0000.5190. A partir do sangue coletado, o soro foi obtido após centrifugação em temperatura ambiente, e depois inativado em banho-maria a 57°C por 30 minutos. Formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* foram obtidas a partir da cepa de referência, expandidas em meio Schneider’s até atingir a fase exponencial. Em seguida, os parasitas foram processados e a concentração ajustada para os ensaios de citometria de fluxo.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos ao analisar a reatividade de IgG nos ensaios de IFI e ELISA foi feita uma análise comparativa do desempenho dos respectivos testes com a citometria de fluxo, através da construção das curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*). Os valores dos resultados dos títulos de IFI e citometria de fluxo, na diluição do soro de 1:256, foram utilizados a fim de se construir as curvas ROC e observamos que área sobre a curva (ASC) da IFI (ASC=0,879; IC<sub>95%</sub>= 0,754-0,954) diferiu daquele observado para o teste de citometria de fluxo (ASC= 0,890; IC<sub>95%</sub>= 0,767-0,961). Com isso, percebeu-se um desempenho do teste de IFI semelhante à citometria de fluxo. Os valores dos resultados dos títulos de ELISA e citometria de fluxo foram utilizados a fim de se construir as curvas ROC para os testes e observamos que área sobre a curva (ASC) do ELISA (ASC=0,808; IC<sub>95%</sub>= 0,652-0,915) também foi semelhante daquele observado para o teste de citometria de fluxo (ASC= 0,896; IC<sub>95%</sub>= 0,758-0,970). A curva ROC permitiu também confirmar o ponto de corte ideal para o ensaio de citometria de fluxo, que foi de 20% de Porcentagem de parasitos fluorescentes positivos (PPFP); obtido pela construção das curvas de sensibilidade e especificidade em função dos diferentes pontos de corte. Em relação à padronização do isotipo IgG3, apenas os soros que apresentaram PPFP > 50% foram considerados positivos. A reatividade do ensaio de citometria de fluxo foi expressa a partir das diluições testadas do conjugado IgG3 (1:50 a 1: 800), obtidas após incubação com os soros controle positivo (CP) e controle negativo (CN) nas diluições de 1:64 a 1:8192, em condições previamente padronizadas. A diluição do conjugado que melhor discriminou os grupos avaliados foi a diluição de 1:200 e a análise da curva de titulação do anticorpo IgG3 anti-formas promastigotas de *L.(V.) braziliensis* presentes em soros dos pacientes controles, sugere que a diluição 1:256 é a região (R) de reatividade, correspondendo ao primeiro título de reação diferencial entre os indivíduos AT como descrito na Figura 1.



**Figura 1** - Gráfico de avaliação da aplicabilidade do isotipo IgG3 e Curvas de titulação do isotipo IgG3 na diluição 1:200

## 4. CONCLUSÃO

Através desse trabalho foi observado que a citometria de fluxo aplica-se ao diagnóstico da LTA, uma vez que apresentou resultados positivos na presença da doença; e através das análises das curvas ROC, verificou-se que a citometria apresenta resultados semelhantes aos dois testes utilizados na rotina laboratorial para LTA. Ainda se constatou a possibilidade de utilizar a metodologia como critério de cura, uma vez que foi possível, através do ponto de corte empregado, distinguir pacientes com doença ativa dos curados. Embora sejam necessários mais estudos com relação à avaliação da aplicabilidade do isotipo IgG3, através dos dados obtidos neste trabalho, pode-se sugerir que a sua utilização pode ser aplicada ao diagnóstico da LTA, por apresentar resultados positivos na presença da doença, podendo contribuir para o alcance de uma técnica mais sensível e específica.

## 5. REFERÊNCIAS

- BRITO, M. et al. Dynamics of the antibody response in patients with therapeutic or spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 95, n. 2, p. 203-206, 2001.
- GUTEERREZ Y et al. Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 45: 281-289, 1991.)
- JANI, I. V. et al. Multiplexed immunoassays by flow cytometry for diagnosis and surveillance of infectious diseases in resource-poor settings. *The Lancet infectious diseases*, v. 2, n. 4, p. 243-250, 2002.
- KAR, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. *Critical reviews in microbiology*, v. 21, n. 2, p. 123-152, 1995.
- ROCHA, R. et al. Clinical value of anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* immunoglobulin G subclasses, detected by flow cytometry, for diagnosing active localized cutaneous leishmaniasis. *Tropical Medicine & International Health*, v. 11, n. 2, p. 156-166, 2006.
- SOUZA MA, et al. Perfil de isotipos de imunoglobulinas e subclasses de IgG na leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38(2): 137-141, 2005.
- TRUJILLO, C. et al. The humoral immune response to the kinetoplastid membrane protein-11 in patients with American leishmaniasis and Chagas disease: prevalence of IgG subclasses and mapping of epitopes. *Immunology letters*, v. 70, n. 3, p. 203-209, 2000.
- VEZENAT, A. D. C.; SANTANA, J. M.; TEIXEIRA, A. R. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 38, n. 3, p. 177-185, 1996.

## 6. AGRADECIMENTOS

CNPq, CAPES, FACEPE, FIOCRUZ, UFPE.



ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOENSAIOS - B 9

## **AVALIAÇÃO DE EFEITOS HEPATOTÓXICOS DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *Kalanchoe brasiliensis* Cambess EM CAMUNDONGOS Swiss**

H. H. G. de CARVALHO<sup>1</sup>, A. G. da FONSECA<sup>1</sup>, L. L. S. FERNANDES<sup>1</sup>, S. M. Z LANGESSNER<sup>2</sup>,  
L. A.L Soares<sup>3</sup> e T. M. A. M. LEMOS<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Laboratório de Pesquisa em Bioquímica Clínica e Experimental

<sup>2</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Farmácia, Laboratório de Farmacognosia.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Farmácia

E-mail para contato: hargila\_haglay@hotmail.com

**RESUMO** – *O objetivo do presente estudo foi avaliar exposição por via oral de camundongos a um extrato hidroalcoólico de folhas de Kalanchoe brasiliensis. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (nº protocolo 002/2013). Assim, os animais (total de 48) foram divididos em grupos de 12 (6 machos e 6 fêmeas) para avaliação aguda; o grupo controle recebeu solução salina 0,9 %. Os grupos teste foram tratados com doses de 250 mg/Kg, 500 mg/Kg e 1000 mg/Kg. Os animais foram observados por 14 dias para avaliação aguda e nesse período analisou-se o aparecimento de possíveis sinais clínicos. Após o período de observação, foram realizadas a análise histopatológica dos órgãos, as concentrações séricas bioquímicas e parâmetros hematológicos. Dessa forma, as análises histopatológicas demonstraram algumas alterações compatíveis com baixa toxicidade aguda hepática. Logo, os resultados mostraram que o extrato de K. brasiliensis apresenta baixa toxicidade aguda nas doses utilizadas e não apresenta toxicidade aguda relevante. Isto destaca a importância desta espécie como futuro e promissor candidato a fitoterápico, assim que tenha seus ensaios farmacológicos concluídos.*

*Palavras-chaves: Extrato, fitoterápico, toxicidade.*

**ABSTRACT** -. *This work proposes the oral exposure of mice to a hydroalcoholic extract of leaves of Kalanchoe brasiliensis. Accordingly, the animals (48 in total) were divided into groups of 12 (6 males and 6 females) for acute assessment; the control group received saline 0.9, already subchronic. Test groups were treated with doses of 250 mg / kg, 500 mg*



/ kg and 1000 mg / kg. The animals were observed for 14 days for acute assessment during which time it was analyzed the possible onset of clinical signs. After the observation period, there were the histopathology of the organs, biochemical serum and hematological parameters. Thus, histopathological analysis showed some changes consistent with liver low acute toxicity. Thus, the results showed that the *K. brasiliensis* extract has low acute toxicity at the doses used and no acute toxicity relevant. This highlights the importance of this species as future promising candidate for phytotherapy, so has their pharmacological tests completed.

*Keywords: extract, herbal medicine, toxicity.*

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Kalanchoe* (Crassulaceae) está presente em todo o nordeste brasileiro e tem seu uso bem amplo em diversas indicações populares. Além disso, uma das espécies da *Kalanchoe* (*Kalanchoe pinnata*) está descrita na RENISUS (2009) o que mostra o potencial terapêutico (Costa, 2008). A espécie *Kalanchoe brasiliensis* proveniente da flora nordestina, é um exemplo de planta que vem sendo utilizada em diversas pesquisas e tem apresentado atividades satisfatórias, principalmente com ação anti-inflamatória e antiulcerogênica. Estudos mostram também que o extrato de suas folhas apresenta potencial efeito analgésico e anti-inflamatório (Trevisan *et al.*, 2006; Costa I, 2008), antifúngico, bactericida (Silva, 2009), antiulcerogênico (Cruz, 2011) e antituberculose (Leitão *et al.*, 2013). O objetivo do presente estudo foi avaliar hepatotoxicidade, in vivo, do extrato hidroetanólico das folhas de *Kalanchoe brasiliensis* em camundongos *Swiss*.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

As folhas de *Kalanchoe brasiliensis* foram disponibilizadas pela Prof. Dra. Silvana Maria Zucolotto Langessner, do Laboratório de Farmacognosia da UFRN.

Camundongos machos e fêmeas da linhagem *Swiss* (*Mus musculus*), idade de 6-8 semanas pesando  $\pm 30$  g, mantidos no biotério do Centro de Ciências da Saúde da UFRN em condições de iluminação (12 h ciclo claro/escuro) e temperatura ( $23 \pm 2$  °C) controladas, receberam água e comida comercial *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (n ° protocolo 002/2013).

Os animais, em um total de 48, foram divididos em quatro grupos de 12 (6 machos e 6 fêmeas) para avaliação da toxicidade aguda. Ao grupo controle foi administrado 0,5 ml de solução salina a 0,9%. O grupo teste (T1) foi tratado com doses de 0,5ml do extrato hidroetanólico das folhas de *Kalanchoe brasiliensis* Cambess 250 mg/kg. Já ao grupo teste seguinte (T2) administrou-se 0,5 ml do extrato hidroetanólico das folhas de *Kalanchoe brasiliensis* Cambess 500mg/Kg. Por fim, ao último grupo teste (T3) administrou-se 0,5ml do extrato a 1000 mg/Kg. A dose foi única.

Dessa forma, observou-se os animais por 14 dias e constatou-se o aparecimento de possíveis sinais clínicos de toxicidade aguda, nas análises histopatológicas dos órgãos, nas concentrações séricas bioquímicas e parâmetros hematológicos.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A AST e a ALT são enzimas intracelulares responsáveis pela síntese e degradação dos aminoácidos, presentes em grandes quantidades no citoplasma dos hepatócitos. Lesões ou destruição das células hepáticas liberam estas para a circulação. Na fase tóxica aguda a ALT, geralmente, apresenta atividade maior que a AST (Motta, 2009; Michael *et al.*, 2010). Dessa forma, observa-se na tabela 1 que os parâmetros bioquímicos foram avaliados. Dentre eles, podemos citar que ALT apresentou-se mais alterada nos camundongos em que foram administrados 0,5ml do extrato na dose de 1000 mg/kg em relação ao grupo controle, indicando um possível dano hepatocelular (Tabela 1).

Tabela 1: Resultados das determinações bioquímicas nos grupos controle e nos grupos tratados com as doses do extrato de *K. brasiliensis*

Doses	Glicose	Triglicérides	Colesterol	PT	AST	ALT	Ureia	Creatinina
<b>Macho</b>								
Controle	75,73 ± 43,52	139,07 ± 85,03	120,53 ± 26,93	4,45 ± 0,79	147,73 ± 75,97	56,70 ± 15,88	74,80 ± 6,18	0,45 ± 0,053
250 mg/kg	202,00 ± 75,16*	81,20 ± 20,85	202,60 ± 64,10*	2,16 ± 1,69	148,60 ± 31,11	55,40 ± 13,22	82,20 ± 12,26	0,48 ± 0,33
500 mg/kg	215,80 ± 56,44	78,20 ± 14,57	114,40 ± 45,77	5,08 ± 1,57	148,00 ± 18,55	70,80 ± 7,60	70,60 ± 8,08	0,24 ± 0,22
1000 mg/kg	190,60 ± 67,77	73,20 ± 14,24*	116,40 ± 15,34	4,64 ± 0,83	152,40 ± 56,29	46,80 ± 15,47	76,00 ± 6,96	0,40 ± 0,00
<b>Fêmea</b>								
Controle	99,45 ± 55,56	160,45 ± 64,28	102,00 ± 24,48	4,04 ± 1,22	229,45 ± 41,97	70,40 ± 2,07	51,00 ± 22,16	0,55 ± 0,16
250 mg/kg	226,20 ± 53,27*	144,60 ± 44,50	106,60 ± 19,19	5,46 ± 0,55	201,60 ± 195,69	53,00 ± 14,76	59,00 ± 7,91	0,42 ± 0,04
500 mg/kg	126,80 ± 41,14	81,40 ± 18,15	75,00 ± 14,88	3,76 ± 0,91	127,40 ± 6,88	72,20 ± 5,76	53,20 ± 7,79	0,24 ± 0,22
1000 mg/kg	234,60 ± 38,60	72,00 ± 8,19*	102,20 ± 10,85	3,64 ± 0,46	147,20 ± 57,84	38,20 ± 12,05	54,80 ± 11,88	0,22 ± 0,16*

Dados expressos em média ± desvio padrão.

\*Grupos que apresentam diferença com relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

Além disso, após a análise histopatológica do fígado podemos perceber que animais em que foram administrados 0,5 ml do extrato na dose 1000mg/kg o tecido hepático apresentou apoptose, hematopoiese extramedular e degeneração hidrópica. No entanto, por estas lesões serem histopatologicamente pontuais, significa que podem ser reversíveis (Figura 1).

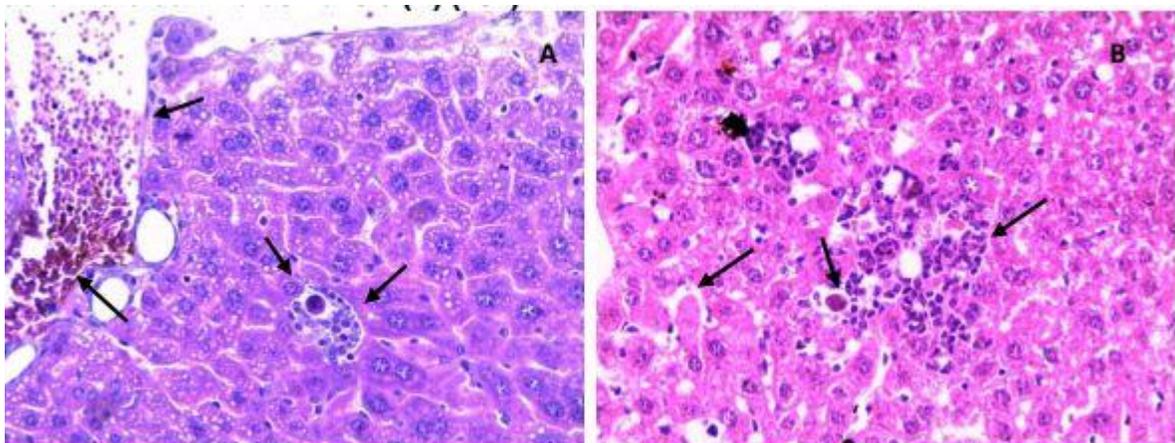




Figura 1 - Tecido hepático com presença de apoptose, hematopoese extra medular, esteatose hepática e congestão em animal submetido à dose de 500 mg/Kg da *K. brasiliensis* (A) e tecido hepático com presença de apoptose, hematopoiese extramedular e degeneração hidrópica em animal submetido à dose de 1000 mg/Kg do extrato da *K. brasiliensis* (B) (10x).

## 4. CONCLUSÃO

As análises histopatológicas em conjunto com as dosagens bioquímicas, demonstraram algumas alterações compatíveis com baixa toxicidade aguda hepática nas doses de 1000 mg/kg do extrato. Porém, há grandes indícios desta espécie como futuro e promissor candidato a fitoterápico, assim que tenha seus ensaios farmacológicos concluídos.

## 5. REFERÊNCIAS

- BRASIL, 2009. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS – RENISUS.
- COSTA, S. S., MUZITANO, M. F., CAMARGO, L. M. M., COUTINHO, M. A. S. Therapeutic Potential of *Kalanchoe* species: Flavonoids and other Secondary Metabolites. *Natural Product Communications*. Westerville, v. 3, p. 2151 - 2164, 2008.
- CRUZ B. P.; CHEDIER L. M.; R L. FABRI; PIMENTA D. S. Chemical and agronomic development of *Kalanchoe brasiliensis* Camb. And *Kalanchoe pinnata* (Lamk.) Pers under light and temperature levels. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 83, n. 4, p. 1435-1441, 2011.
- LEITÃO, F.; LEITÃO, S. G.; ALMEIDA, M. Z.; CANTOS, J.; COELHO, T.; SILVA, P. E. Medicinal plants from open-air markets in the State of Rio de Janeiro, Brazil as a potential source of new antimycobacterial agents. *Journal of Ethnopharmacology*. Rio de Janeiro. v. 149, n.2, p. 513–521. Set., 2013
- LEITTE CARTAXO, S.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, Pernambuco, v. 131, n. 2, p.326-342, 17 jul. 2010.
- MOTTA, Valter T. *Bioquímica Clínica: Princípios e Interpretações: Enzimas*. 5ª Brasil: Medbook, 2009. p. 90.
- SILVA, J. G.; PEREIRA, M. S. V.; GURGEL, A. P. D.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; SOUZA, I. A. Atividade inibitória das folhas e caule de *Kalanchoe brasiliensis* Cambess frente a microrganismos com diferentes perfis de resistência a antibióticos. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy*. v.19, n. 3, p. 790-794, Jul./Set. 2009, 2009), anti-ulcerogênico (CRUZ, 2011) e antituberculose (LEITÃO et al, 2013).
- TREVISAN, M. T. S.; BEZERRA, M. Z. B.; SANTIAGO, G. M. P.; FEITOSA, C. M.; VERPOORTE, R.; BRAZ FILHO, R. Atividades larvicida e anticolinesterásica de plantas do gênero *Kalanchoe*. *Química Nova* [online], São Paulo. v. 29, n.3, p. 415 - 418, 2006.
- TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* [online], São Paulo. v. 42, n.2, p. 289-306, 2006.

## 6. AGRADECIMENTOS

À Capes, à UFRN, à toda a equipe do Laboratório de Pesquisa em Bioquímica Clínica e Experimental. Ao Laboratório de Farmacognosia e a prof. Cláudia do Departamento de Patologia da UFRN.



**BIOLOGIA  
MOLECULAR**



ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOLOGIA MOLECULAR – BM 1

## MICRORNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DA INFÂNCIA NO BRASIL: POTENCIAIS BIOMARCADORES PARA DISTINÇÃO ENTRE OS SUBTIPOS T E B

R. S. ALMEIDA<sup>1</sup>, S. C. S. ANDRADE<sup>2,3</sup>, L. L. COUTINHO<sup>2</sup>, E. A. DONADI<sup>4</sup>, N. LUCENA-SILVA<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Departamento de Imunologia

<sup>2</sup> Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Departamento de Biotecnologia Animal

<sup>3</sup> Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências

<sup>4</sup> Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Divisão de Imunologia Clínica

<sup>5</sup> Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira, Serviço de Oncologia Pediátrica  
E-mail para contato: renatabiologia@gmail.com

**RESUMO** – *Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não-codificantes envolvidos em vias de carcinogênese e cujo perfil de expressão permite a identificação de marcadores de diagnóstico e prognóstico de doenças, como a leucemia linfoblástica aguda (LLA) infantil de células B e T. O objetivo deste trabalho foi determinar o perfil de expressão de miRNAs de LLA-T e LLA-B da infância para avaliação de novos biomarcadores. Foram utilizadas amostras de medula óssea de 8 crianças com cada tipo de doença. Foi realizada construção de bibliotecas pelo kit TruSeq® Small RNA Library Preparation e sequenciamento em plataforma HiSeq 2500. Foram utilizadas ferramentas de bioinformática para determinação de expressão diferencial. A predição de alvos, anotação funcional e análise de curva ROC para seleção do melhor preditor de subtipo leucêmico foram realizadas. A análise de expressão revelou 77 miRNAs diferencialmente expressos entre LLA-T e LLA-B, sendo selecionados os miRNAs hsa-miR-708-3p e -5p, hsa-miR-497-5p, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-151a-5p e -3p, hsa-miR-151b, hsa-miR-371b-5p, hsa-miR195-5p e hsa-miR-629-3p, todos com  $P \leq 4 \times 10^{-5}$ . O hsa-miR-629-3p foi o melhor preditor do subtipo de doença com uma sensibilidade e especificidade de 100% e 99% ( $P=0,001$ ), podendo ser aplicado para distinção da LLA-B da LLA-T. Mais estudos são necessários para validação dessa molécula como biomarcador, a fim de aplicá-la diagnóstico.*

*Palavras-chave: Sequenciamento; Bioinformática; Diagnóstico*

**ABSTRACT** – *MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs with a role in several cancer pathways. Its expression pattern allows identification of disease diagnostic and prognostic markers, like childhood B- and T-cell acute lymphoblastic leukemia (ALL). Our aim was describing miRNA expression profiles of childhood B- and T-cell ALL to uncover new disease biomarkers. Bone marrow (BM) samples from eight patients of each disease were used in the study. Total RNA extracted from BMs were used for microRNA library construction (TruSeq® Small RNA Library Preparation Kit) and sequencing was performed in HiSeq 2500 platform. Bioinformatic tools were used for differential expression analysis. Target prediction, functional annotation and ROC curve analysis for selection of miRNA disease predictor were performed. Expression analysis revealed 77 differentially expressed between T- and B-ALL of which hsa-miR-708-3p e -5p, hsa-miR-497-5p, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-151a-5p and -3p, hsa-miR-151b, hsa-miR-371b-5p, hsa-miR195-5p and hsa-miR-629-3p were selected, all with  $P \leq 4 \times 10^{-5}$ . According with ROC curve analysis, hsa-miR-629-3p was the best disease subtype predictor with 100% and 99% of sensitivity and specificity ( $P = 0.001$ ), respectively. More studies are necessary to validate this molecule as biomarker for diagnostic application.*

*Keywords: Sequencing; Bioinformatics; Diagnosis.*

## 1. INTRODUÇÃO

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) corresponde a 25% dos cânceres pediátricos, sendo 85% dos casos decorrente da linhagem de células B (LLA-B), e 15% da linhagem de células T (LLA-T) (Pui *et al.*, 2012). Diversas alterações genéticas têm sido descritas nessas leucemias, como translocações cromossômicas, deleções, inserções e expressão anormal de genes e moléculas, por exemplo microRNAs. Estes são pequenas moléculas de RNA (22 nucleotídeos) que não codificam proteínas e cuja expressão alterada foi relacionada a leucemia linfocítica crônica de células B (LLC-B) como resultado de uma deleção no cromossomo humano 13q14 (Calin *et al.*, 2002). Os miRNAs atuam diretamente na 3' UTR de RNAs mensageiros regulando a tradução em proteínas (Shah *et al.*, 2016). O perfil de expressão diferencial destas moléculas tem sido utilizada para identificar miRNAs específicos da doença e de seus subtipos, servindo como biomarcadores para diagnóstico e prognóstico. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi determinar o perfil de expressão diferencial de miRNAs da medula óssea de crianças com LLA-T e LLA-B, a fim de identificar aqueles com maior potencial de distinguir os dois subtipos de leucemia.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

**População do Estudo e Aspectos Éticos:** Estudo foi conduzido em 16 crianças com LLA tratadas no Serviço de Oncologia Pediátrica do Hospital IMIP (Recife, Pernambuco, Brasil), sendo 8

diagnosticadas com LLA-B (7 H; 1 M; mediana = 5,5 anos) e 8 com LLA-T (7 H; 1 M; mediana = 11,5 anos). Amostras de medula óssea coletadas ao diagnóstico foram utilizadas para caracterização morfológica, imunológica e molecular para definição de leucemia, e utilizadas para os ensaios com RNAs. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do CPqAM/Fiocruz-PE (CAAE: 13296913.3.0000.5190). **Extração de RNA:** O RNA total foi obtido utilizando o reagente TRIzol (Life Technologies) seguindo o protocolo do fabricante. Apenas as amostras livres de proteínas e íntegras foram consideradas no estudo. **Construção de Bibliotecas e Sequenciamento de MicroRNAs:** As bibliotecas foram preparadas de acordo com o *TruSeq® Small RNA Library Prep Guide* (Illumina) e o sequenciamento realizado utilizando o HiSeq® Rapid Cluster Kit v2 (Illumina) em plataforma HiSeq 2500 (Illumina). **Análise dos Dados:** Foram utilizadas ferramentas de bioinformática como o FastQC, Cutadapt, miRDeep2, Bowtie, EdgeR e bancos de dados (miRBase e miRTarBase) para predição de alvos. Na avaliação de expressão diferencial foi considerado um *P*-valor ajustado  $\leq 0,05$ . Para anotação funcional dos alvos, a ferramenta DAVID V.6.7 (*KEGG Pathways*) foi utilizada. Análise de curva ROC foi realizada em SPSS V.20 para os miRNAs com  $P \leq 4 \times 10^{-5}$ , a fim de identificar um miRNA capaz de distinguir as duas leucemias.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise do perfil de expressão dos miRNAs revelou um grupo de 77 diferencialmente expressos (DE) entre LLA-T e LLA-B, sendo 46 deles induzidos em LLA-B e 31 deles induzidos em LLA-T. Dos 77 miRNAs DE, 10 deles apresentaram alta significância estatística com  $P \leq 4 \times 10^{-5}$ . A Tabela 1 mostra os 10 miRNAs mencionados.

Tabela 1- miRNAs diferencialmente expressos entre LLA-T e LLA-B com *P*-ajustado  $\leq 4 \times 10^{-5}$ .

miRNA (precursor)	logFC	<i>P</i>
hsa-miR-708-3p (hsa-mir-708)	-8,97	$< 1 \times 10^{-5}$
hsa-miR-708-5p (hsa-mir-708)	-8,16	$< 1 \times 10^{-5}$
hsa-miR-497-5p (hsa-mir-497)	-5,73	$< 1 \times 10^{-5}$
hsa-miR-455-3p (hsa-mir-455)	-5,69	$4 \times 10^{-5}$
hsa-miR-151a-5p (hsa-mir-151a)	-5,40	$< 1 \times 10^{-5}$
hsa-miR-151a-3p (hsa-mir-151a)	-5,08	$< 1 \times 10^{-5}$
hsa-miR-151b (hsa-mir-151b)	-4,94	$< 1 \times 10^{-5}$
hsa-miR-371b-5p (hsa-mir-371b)	-4,85	$< 1 \times 10^{-5}$
hsa-miR-195-5p (hsa-mir-195)	-4,27	$< 1 \times 10^{-5}$
hsa-miR-629-3p (hsa-mir-629)	3,00	$< 1 \times 10^{-5}$

Legenda: Modulação se refere à LLA-T em relação à LLA-B.

A predição de alvos identificou 1.298 genes cuja anotação funcional revelou 44 vias biológicas ( $P \leq 0,05$ ) relacionadas à câncer e ao sistema imunológico. hsa-miR-151a-5p já foi reportado com expressão induzida em LLA-B (Schotte *et al.*, 2009) e hsa-miR-195 foi descrito superexpresso em LLC-B (Zanette *et al.*, 2007). Em relação ao potencial como biomarcador, o miRNA que se revelou melhor preditor de subtipo foi o hsa-629-3p, apresentando área sob a curva



(AUC) de 1,0; sensibilidade de 100%; especificidade de 99%; cut-off de 0,8 (contagem de reads normalizada) ( $P= 0.001$ ). Esse miRNA tem sido descrito como preditor de câncer gástrico (Shin *et al.*, 2015) e preditor de prognóstico de pacientes com glioblastoma tratados com temozolomida (Hui-Yuan *et al.*, 2014).

#### 4. CONCLUSÃO

A expressão aumentada do miRNA hsa-miR-629-3p na leucemia linfoblástica poderá prever a linhagem celular comprometida, tendo sido aumentada em células T e ausente em células B. A validação desses achados será realizada através de estudos funcionais.

#### 5. REFERÊNCIAS

CALIN, G. A.; DUMITRU, C. D.; SHIMIZU, M. *et al.* Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v.99, n. 24, p. 15524-9, 2002.

HUI-YUAN, C.; WEN-BIN, L.; CHUAN-BAO, Z. *et al.* miR-629-3p level significantly predicts prognosis in glioblastoma patients treated with temozolomide chemotherapy. *Curr. Signal Transduct. Ther.*, v. 9, n. 1, p. 9-14, 2014.

SHAH, M. Y.; FERRAJOLI, A.; SOOD, A. K. *et al.* microRNA Therapeutics in Cancer – An Emerging Concept. *EBioMedicine*, v. 12, p. 34-42, 2016.

PUI, C. H.; MULLIGHAN, C. G.; EVANS, W. E. *et al.* Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood*, v. 120, n. 6, p. 1165-1174, 2012.

SCHOTTE, D.; CHAU, J. C.; SYLVESTER, G. *et al.* Identification of new microRNA genes and aberrant microRNA profiles in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, v. 23, n. 2, p. 313-322, 2009.

SHIN, V. Y.; NG, E. K.; CHAN, V. W. *et al.* A three-miRNA signature as promising non-invasive diagnostic marker for gastric cancer. *Mol. Cancer.*, v. 14, n. 202, 2015.

ZANETTE, D. L.; RIVADAVIA, F.; MOLFETTA, G. A. *et al.* miRNA expression profiles in chronic lymphocytic and acute lymphocytic leukemia. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 40, n. 11, p. 1435-1440, 2007.

#### 6. AGRADECIMENTOS

CPqAM/Fiocruz-PE, CAPES-PROCAD2013, FACEPE-APQ-0040-4.00/13, USP/RP e ESALQ/USP.



ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOLOGIA MOLECULAR – BM 2

## INFLUÊNCIA DO MICROAMBIENTE HIPÓXICO E PRIVADO DE NUTRIENTES NA EXPRESSÃO GÊNICA DE PAR-4 (*PROSTATE APOPTOSIS RESPONSE 4*) EM CÉLULAS DE CÂNCER DE PÂNCREAS

W. L. B. SENA<sup>1</sup>, A. F. SILVA-FILHO<sup>1</sup>, L. B. TAVARES<sup>1</sup>, M.G. R. PITTA<sup>1</sup>, M. C. PEREIRA<sup>1</sup>, M. J. B. M. RÊGO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT/UFPE)

E-mail para contato: wanessasena@live.com

**RESUMO** – *O câncer de pâncreas é caracterizado por um fenótipo agressivo. A presença de regiões de hipóxia confere elevada capacidade adaptativa às células tumorais e são responsáveis por aumentar a resistência à terapia. PAR-4 é uma proteína capaz de mediar uma resposta pró-apoptótica através de diversas vias, sendo apontada como uma molécula promissora para a terapia. O presente estudo tem como objetivo avaliar a expressão gênica de PAR-4 em células de câncer de pâncreas submetidas a condições de privação. A linhagem tumoral pancreática PANC-1 foi submetida a condições de normóxia ou hipóxia ( $pO_2 < 1\%$ ), associada a condições normais de nutrientes (N10 e H10, 10% SBF) ou de privação nutricional (N1 e H1, 1% SBF) e incubadas por diferentes tempos (2, 6, 12 e 24 horas). A expressão gênica de PAR-4 foi avaliada por PCR em tempo real. A exposição prolongada à hipóxia e/ou privação nutricional (12 e 24 horas) induziu uma redução significativa nos níveis do transcrito de PAR-4 quando comparadas à condição controle N10 [no tempo de 12 horas, N1 ( $p=0,0023$ ), H10 ( $p=0,0002$ ) e H1 ( $p=0,0042$ ); em 24 horas, H10 ( $p=0,0072$ ) e H1 ( $p<0,0001$ )]. Os resultados indicam adaptação das células tumorais pancreáticas às condições de privação por longos períodos através da redução da expressão de PAR-4.*

**Palavras-chave:** *Adenocarcinoma ductal pancreático. Inovação Terapêutica. PCR em tempo real.*

**ABSTRACT** - *Pancreatic cancer is characterized by an aggressive phenotype. The presence of hypoxic areas provides a high adaptive capacity to tumor cells and are responsible for increased resistance to therapy. PAR-4 is a protein that can mediate a pro-apoptotic response through activation of several pathways, and has been defined as a promising target molecule for therapy. This study aims to assess PAR-4 gene expression*



*in pancreatic cancer cells submitted to deprivation conditions. Pancreatic cell line PANC-1 was submitted to normoxic or hypoxic conditions ( $pO_2 < 1\%$ ) associated with normal (N10 and H10, 10% FBS) or nutritional deprivation (N1 and H1, 1% FBS) and incubated with different times (2, 6, 12 and 24 hours). PAR-4 gene expression was evaluated by Real-Time PCR. Prolonged exposed to hypoxia and/or nutritional deprivation (12 and 24 hours) induced a significant reduced of PAR-4 transcripts when compared to control condition N10 [N1 ( $p=0,0023$ ), H10 ( $p=0,0002$ ) and H1 ( $p=0,0042$ ) for 12 hours; in 24 hours, H10 ( $p=0,0072$ ) and H1 ( $p < 0,0001$ )]. Results indicate an adaptation of pancreatic tumor cells to deprivation conditions for long periods through the reduction of PAR-4 levels.*

*Keywords: Pancreatic ductal adenocarcinoma. Therapeutic Innovation. Real Time PCR.*

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de pâncreas corresponde a um conjunto de neoplasias com diferentes propriedades clínicas e patológicas, com taxas de mortalidade semelhantes às taxas de incidência. De acordo com dados do projeto GLOBOCAN, aproximadamente 330.372 pacientes morreram com a doença no mundo em 2012 (Stewart & Wild, 2014). A alta taxa de mortalidade dos tumores pancreáticos está associada a características biológicas que contribuem para um perfil mais agressivo (Hussain, 2016). A presença de regiões com baixas pressões de oxigênio (ou hipóxia) está relacionada a resistência à terapia, sendo considerado um fator prognóstico negativo. Em resposta à hipóxia, as células tumorais ativam múltiplas respostas adaptativas, incluindo a estabilização de HIF-1 $\alpha$  (fator induzido por hipóxia 1 alfa) (Wojtkowiak *et al.*, 2015). Por conta do seu perfil mais agressivo, o desenvolvimento de alternativas que tenham como alvo células submetidas a condições de privação é uma estratégia que visa aumentar a eficácia das terapias atualmente disponíveis para o câncer de pâncreas.

PAR-4 codifica uma proteína pró-apoptótica, capaz de ativar diversas vias que induzem a morte celular. Em células normais é necessário um segundo estímulo pró-apoptótico para induzir a morte celular; em células tumorais, porém, apenas a sua superexpressão é suficiente para induzir apoptose (Azmi *et al.*, 2010). Em células tumorais pancreáticas, a presença de mutações em KRAS está associada à diminuição dos níveis ou perda de expressão de PAR-4, promovendo a progressão tumoral (Ahmed *et al.*, 2008). Devido à sua capacidade de induzir apoptose de forma seletiva e sua relação com fatores biológicos do câncer de pâncreas, PAR-4 se apresenta como uma molécula promissora para o desenvolvimento de novas terapias. O objetivo do presente estudo consiste, portanto, em avaliar a expressão gênica de PAR-4 em células de câncer de pâncreas submetidas a condições de privação (de oxigênio e/ou de nutrientes).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ENSAIO DE EXPOSIÇÃO À HIPÓXIA E PRIVAÇÃO NUTRICIONAL. Células da linhagem PANC-1 (adenocarcinoma ductal pancreático) foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) e mantidas em estufa de atmosfera úmida a



37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>. Quatro condições foram utilizadas no presente estudo: N10 (normóxia sem privação nutricional, 10% SBF), N1 (normóxia associada à privação nutricional, 1% SBF), H10 (hipóxia sem privação nutricional, 10% SBF) e H1 (hipóxia associada à privação nutricional, 1% SBF). Para a realização dos ensaios, as células foram distribuídas em placas de cultura de 6 poços (1x10<sup>6</sup> células/poço) e submetidas a uma atmosfera composta por 95% de N<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub> em câmaras de hipóxia, onde pO<sub>2</sub><1%. Após 5 minutos de exposição, as câmaras foram seladas e mantidas a 37°C durante diferentes tempos de incubação (2, 6, 12 e 24 horas).

**2.2 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA.** Após incubação, as células foram coletadas e o pellet celular foi utilizado para a extração de RNA total com o reagente TRIzol® (Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação das amostras de RNA foi realizada por leitura espectrofotométrica em NanoDrop™ 2000/2000c e a integridade do RNA avaliada por eletroforese em gel de agarose (1%). O kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems™) foi utilizado para síntese de cDNA de acordo com instruções do fabricante. A análise quantitativa dos transcritos foi realizada por PCR em tempo real, utilizando o sistema de detecção por sonda de hidrólise (TaqMan® Master Mix, Applied Biosystems™) e sondas específicas para os genes PAR-4 e 18S (gene de referência). Foram realizados dois experimentos independentes em duplicata, onde a expressão relativa do gene foi calculada pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

**2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.** Os dados foram analisados com o software GraphPad Prism® versão 6 utilizando o Teste t-Student, sendo as diferenças consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A modulação de PAR-4 pela exposição à hipóxia e/ou privação de nutrientes apresentou diferenças a depender do tempo de incubação. Em tempos de exposição precoces (2 e 6 horas), foi observado um aumento de PAR-4 em condições de privação em relação à condição controle N10, porém este não foi significativo (Figura 1A e 1B). O desvio padrão elevado possivelmente impediu a obtenção de significância estatística, sendo necessária a realização de outros experimentos com a finalidade de caracterizar o perfil de expressão de PAR-4 nestas condições. A exposição prolongada à hipóxia e/ou privação de nutrientes foi capaz de modular negativamente a expressão de PAR-4. No tempo de 12 horas, foi observada uma redução significativa dos níveis de transcritos nas condições N1 ( $p=0,0023$ ), H10 ( $p=0,0002$ ) e H1 ( $p=0,0042$ ) quando comparadas à condição controle N10 (Figura 1C). A exposição por 24 horas induziu uma modulação negativa significativa de PAR-4 nas condições de hipóxia H10 ( $p=0,0072$ ) e H1 ( $p<0,0001$ ) quando comparadas à condição controle N10 (Figura 1D).

Algumas alterações moleculares permitem o estabelecimento e progressão tumoral, como a redução de moléculas pró-apoptóticas. A expressão reduzida de PAR-4 está associada a fatores como recorrência do tumor e baixa resposta à terapia em diferentes tipos de câncer (Ahmed *et al.*, 2008; Alvarez *et al.*, 2013). Ahmed e colaboradores (2008) avaliaram a expressão gênica de PAR-4 em diferentes linhagens tumorais pancreáticas (incluindo a linhagem PANC-1), onde foi observada uma expressão reduzida quando comparada à expressão em células do tecido normal. Porém, não há estudos que avaliem a expressão de PAR-4 considerando a influência de baixas pressões de oxigênio ou nutricionais no microambiente tumoral pancreático. Bobrovnitchaia (2014) avaliou o efeito da hipóxia na expressão de PAR-4 em células de câncer de mama. Na linhagem MDA-MB-231, triplo

negativa, foi observado um efeito dual na expressão dos transcritos de PAR-4, com um aumento no tempo de exposição à hipóxia de 6 horas e redução no tempo de 24 horas, corroborando com os resultados obtidos neste estudo. A expressão gênica de PAR-4 reduzida em períodos prolongados de exposição à hipóxia e/ou privação nutricional sugere que esta característica pode promover vantagens adaptativas às células em condições de privação, já que impede sejam ativadas as diversas vias pró-apoptóticas moduladas por PAR-4.

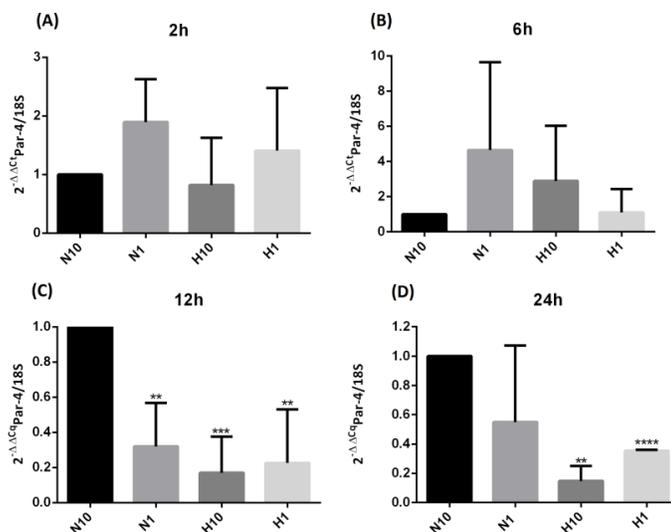


Figura 1 – Efeitos da exposição à hipóxia e/ou privação nutricional por diferentes tempos na expressão gênica de PAR-4 em células da linhagem PANC-1. \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,005 \*\*\*\*p<0,0001

## 4. CONCLUSÃO

No presente estudo foi observada uma redução da expressão gênica de PAR-4 em células da linhagem PANC-1 quando expostas a condições de privação durante períodos prolongados, indicando a adaptação destas células às condições adversas.

## 5. REFERÊNCIAS

- AHMED, M. M. et al. Downregulation of PAR-4, a pro-apoptotic gene, in pancreatic tumors harboring K-ras mutation. *Int J Cancer*, v. 122, n. 1, p. 63–70, 2008.
- ALVAREZ, J. V. et al. Par-4 Downregulation Promotes Breast Cancer Recurrence by Preventing Multinucleation following Targeted Therapy. *Cancer Cell*, v. 24, n. 1, p. 30–44, 2013.
- AZMI, A. S. et al. PAR-4 as a possible new target for pancreatic cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*, v. 14, n. 6, p. 611–620, 2010.
- HUSSAIN, S. P. Pancreatic Cancer: Current Progress and Future Challenges. *Int J Biol Sci*, v. 12, n. 3, p. 270-272, 2016.
- STEWART, B. W.; WILD, C. World cancer report 2014. *World*, 2014.
- WOJTKOWIAK, J. W. et al. Pyruvate sensitizes pancreatic tumors to hypoxia-activated prodrug TH-302. *Cancer Metab*, v. 3, n. 1, p. 2, 2015.



## **6. AGRADECIMENTOS**

FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco).



ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOLOGIA MOLECULAR – BM 3

## ANÁLISE FUNCIONAL DE POLIMORFISMOS DO ONCOGENE E7 DOS PAPILOMAVÍRUS HUMANO TIPOS 16 E 31 EM AMOSTRAS CLÍNICAS DO NORDESTE BRASILEIRO.

R. C. PEREIRA L, R. C. de OLIVEIRA SILVA, M. N. CORDEIRO, D. L. SANTOS, C. SALGADO, K. C. GOMES. N, A. P ALMEIDA DINIZ GURGEL, T. H. ARAUJO, B. S. CHAGAS, A. C. FREITAS,

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Genética.

E-mail para contato: ruanycristyne@hotmail.com

*RESUMO – O câncer cervical é considerado o quarto tipo de câncer a ocasionar mortes entre mulheres em todo o mundo. A atividade transformante dos HPVs de alto risco é promovida pelas oncoproteínas E6 e E7. Neste estudo, procurou-se realizar uma análise funcional do oncogene E7 polimórfico da variante do HPV-16 e HPV-31 no modelo de avaliação da via de sinalização NF-κB em cultura celular. Os genes E7 polimórficos de uma variante de HPV-16, que contém polimorfismos nas posições 647, 789 e 795, e E7 de uma variante de HPV-31, que contém polimorfismos nas posições 626, 695 e 743, foram amplificados a partir de amostras clínicas positivas HPV-16 e HPV-31 e clonados no vetor de expressão de célula de mamífero. 24 horas após a transfecção, as células foram incubadas com TNFα durante 6 horas. A atividade de NF-κB foi medida por GloMax® (Promega®). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA. P < 0,05 foi considerado significativo. O gene E7 do HPV-16 polimórfico, que inclui os polimorfismos de nucleotídeo único, exibiu uma forte atividade repressiva na via do factor nuclear-kappaB (NF-κB) na linha celular HEK-293, enquanto que o oncogene E7 HPV-31 não tem tal efeito. Os ensaios em curso devem fornecer dados que permitam uma melhor caracterização do perfil das variantes do HPV e dos seus polimorfismos relevantes para o desenvolvimento de lesões cervicais associadas ao HPV.*

*Palavras-chave: papilomavírus humano, E7, polimorfismo, factor-kappaB nuclear*

*ABSTRACT - Cervical cancer is considered the fourth type of cancer to cause deaths among women worldwide. The transforming activity of high-risk HPVs is promoted by oncoproteins E6 and E7. In this study, we sought to perform a functional analysis of polymorphic E7 oncogene from HPV-16 and HPV-31 variant in NF-κB signaling pathway evaluation model in cell culture. Polymorphic E7 genes from HPV-16, which contains polymorphisms in positions 647, 789 and 795, and E7 from HPV-31 contains polymorphisms in positions 626, 695 and 743, has been amplified from HPV-16 and*

*HPV-31 positive clinical samples and cloned into pGEM-T cloning vector and subcloning on mammal expression vector. Cell transfection. 24 hours after transfection, cells were incubated with TNF $\alpha$  during 6 hours. NF- $\kappa$ B activity was measured by GloMax® (Promega®). Statistical analysis was performed using ANOVA.  $P < 0.05$  was considered significant. Polymorphic HPV-16 E7 gene, which includes the single nucleotide polymorphisms, exhibited strong repressive activity on nuclear factor-kappaB (NF- $\kappa$ B) pathway in HEK-293 cell line, whereas the E7 oncogene HPV-31 has no such effect. Ongoing trials should provide data that allow a better characterization of HPV variants profile and their polymorphisms relevance to develop HPV-associated cervical lesions.*

*Keywords: human papillomavirus, E7, polymorphism, nuclear factor-kappaB*

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer cervical é considerado o quarto tipo de câncer a ocasionar mortes entre as mulheres no mundo, a infecção persistente pelo Papilomavírus Humano (HPV) de alto risco é o principal fator de risco para o desenvolvimento de câncer cervical (zur Hausen, 1996; Baseman & Koutsky, 2005). A atividade transformante dos HPVs de alto risco é promovida pelas oncoproteínas E6 e E7 (McLaughlin-Drubin & Munger, 2009), as quais funcionalmente inativam os produtos de dois importantes genes supressores de tumor, *TP53* e *pRb*, respectivamente. Ambas as oncoproteínas induzem a proliferação, imortalização e transformação maligna das células infectadas pelo vírus (Boulet *et al.*, 2007). Regiões polimórficas nos oncogenes E6 e E7 são importantes no desenvolvimento de diagnósticos. As proteínas E6 e E7 do HPV são importantes para várias propriedades virais sendo que variações na sequência do gene de uma ou ambas as proteínas podem levar a função biológica alterada e, portanto, afetar o resultado clínico.

O presente projeto realizou uma avaliação funcional de polimorfismos dos oncogenes E7 do HPV-16 e E7 do HPV-31 com a finalidade de identificar o potencial dessas variantes e a importância clínica com relação ao desenvolvimento dos cânceres associados ao HPV em mulheres da região Nordeste do Brasil.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os genes E7 polimórficos dos HPV-16 e HPV-31 e as sequências protótipos (genes E7 sem polimorfismos) foram amplificados por PCR e clonados em vetor de expressão em células de mamíferos, e, em seguida, sequenciados. O DNA dos genes E7 de HPV-16 e 31 foram isolados por extração plasmidial e posteriormente utilizados nos ensaios de transfecção.

Células eucarióticas HEK-293 (Célula embrionária de rim humano) foram transfectadas com os plasmídios. Todos os grupos de células foram co-transfectadas com 1  $\mu$ g de plasmídio contendo gene-repórter de luciferase (*firefly*), cuja expressão depende da atividade da via NF- $\kappa$ B. A região promotora do gene apresenta três sítios de ligação ao fator de transcrição NF- $\kappa$ B, sendo denominado (kB)<sup>3</sup>-Luc (BCCMTM / LMBP, Gent, Bélgica). Ainda, todos os grupos celulares foram transfectados com 1 ng de plasmídeo contendo o gene luciferase (*Renilla*) como normalizador da luminescência.

Cada grupo de células HEK-293 foi transfectado com 1,5  $\mu$ g dos plasmídios contendo os genes E7 polimórficos do HPV-16, do HPV-31, o gene E7 protótipo ou vetor pCI neo (Promega) vazio como

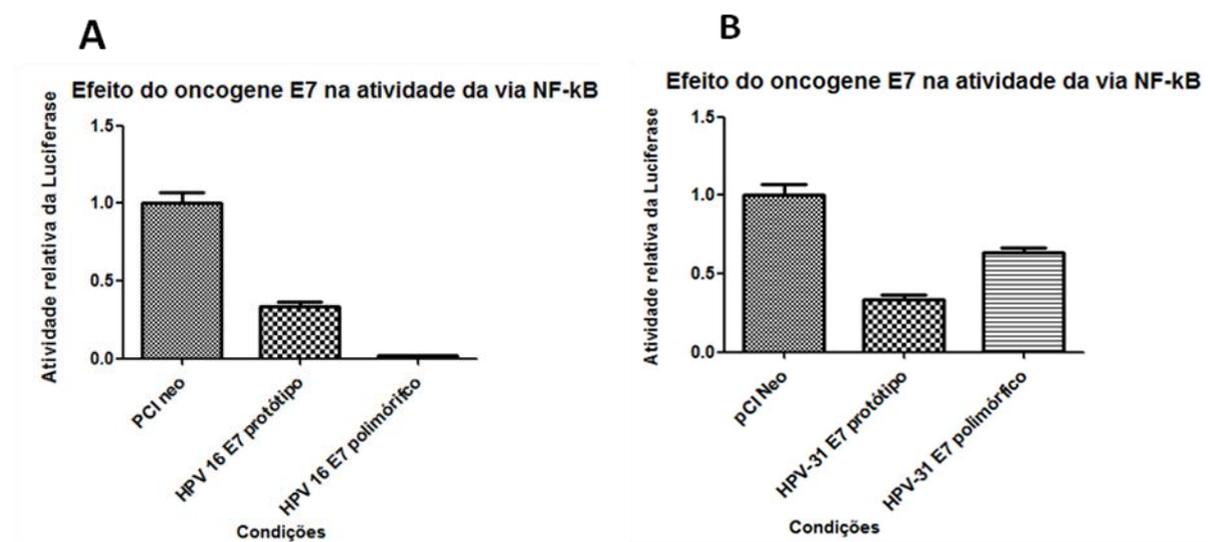
controle positivo da via. Após 24 horas da transfecção, as células foram incubadas com TNF $\alpha$  (10 ng/ml) durante 6 horas para estimulação da via. Após esse período foi adicionado às células uma solução de PBS gelado e realizada a lise celular utilizando o *ReporterLysis Buffer* (Promega). As leituras de unidades relativas de luciferase foram realizadas pelo sistema GloMax® 96 Microplate Luminometer w/Dual Injectors (Promega).

A análise estatística foi realizada utilizando o teste *one-way analysis of variance* (ANOVA), seguido pela correção de Bonferroni, sendo  $p < 0,05$  considerado significativo.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para investigarmos os efeitos dos polimorfismos presentes em E7 do HPV-16 e 31 na via NF- $\kappa$ B, os efeitos de ambos sobre a via foram comparados com os efeitos observados durante a expressão dos genes protótipos ou com a via sem interferências (controle positivo). Ambos os genes E7 apresentaram atividade repressora na via, sendo esta mais intensa no gene E7 polimórfico do HPV-16 (Figura 1A) e menos intensa no E7 polimórfico do HPV-31 (Figura 1B).

A análise estatística mostrou diferença significativa entre E7 polimórfico do HPV-16 e o controle (vetor vazio) e não significativo entre o gene polimórfico e o gene protótipo, e entre o protótipo e o controle. Para o E7 do HPV-31, a análise estatística mostrou diferença significativa entre E7 polimórfico e o controle (vetor vazio) e não significativo entre o polimórfico e o protótipo, e entre o protótipo e o controle.



**Figura 1:** Efeito do oncogene E7 dos HPV16 (A) e 31 (B) na ativação da via NF- $\kappa$ B.

Estudos demonstram que o gene E7 do HPV-16 interfere com a via NF- $\kappa$ B interagindo diretamente com a subunidades do complexo IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ , causando redução nesta via em células U2OS (Spitkovsky *et al.*, 2002). Nossos dados obtidos com o E7 corroboram com os dados de Byg *et al.*, 2012 nos quais mesmo sob estimulação com TNF- $\alpha$  as células mostraram-se menos responsivas. Finalmente, o mecanismo pelo qual os E7 polimórficos interferem com a via NF- $\kappa$ B requerem mais estudos.



#### **4. CONCLUSÕES**

O estudo apresentado amplia o conhecimento sobre as variantes do HPV, com base em polimorfismos identificados nos oncogenes E7 dos tipos de alto risco, os HPV-16 e HPV-31, circulantes no Estado de Pernambuco, região Nordeste do Brasil. Neste estudo foi observado que o oncogene E7 polimórfico do HPV-16 exerce forte atividade repressora na via NF- $\kappa$ B, enquanto que o oncogene E7 do HPV-31 não apresenta tal efeito.

#### **5. REFERÊNCIAS**

- ZUR HAUSEN H. 1996. Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1288:F55-F78.
- BASEMAN JG AND KOUTSKY LA. 2005. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol* 32S:S16-S24.
- MCLAUGHLIN-DRUBIN ME AND MUNGER K. 2009. Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Res* 143:195-208.
- BOULET G, HORVATH C, BROECK DV, SAHEBALI S, BOGERS J. 2007. Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *Inter Jour of Biochem & Cell Biol* 39:2006-2011.



ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOLOGIA MOLECULAR – BM 5

## MODULATION OF PROSTATE APOPTOSIS RESPONSE-4 (PAR-4) EXPRESSION BY NOVEL OXAZOLIDINE DERIVATIVES IN ACUTE T CELL LEUKEMIA

C.G.B MARTINS<sup>1</sup>, W.L.B. SENA<sup>1</sup>, M.J.B.M. RÊGO<sup>1</sup>, M.G.R. PITTA<sup>1</sup>, M.R. GALDINO-PITTA<sup>2</sup>, I.R. PITTA<sup>2</sup> e M.C. PEREIRA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica – Suely Galdino, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica – Suely Galdino, Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos

Email para contato: cgomesde@gmail.com

**RESUMO** – *De acordo com o Instituto Nacional do Câncer, o tratamento de leucemias ainda envolve inúmeras dificuldades como a alta taxa de mortalidade. Ademais, as altas doses na quimioterapia, sua toxicidade e a resistência dos tumores ainda são problemas a serem contornados, dessa forma, torna-se importante estudar novas drogas que tenham apenas o câncer como alvo. Prostate Apoptosis Response-4 (PAR-4), uma proteína supressora tumoral é a molécula alvo do atual estudo. Os derivados oxazolidínicos são novas drogas que têm sido amplamente estudadas e demonstrado diversas propriedades farmacológicas. Portanto, o objetivo deste estudo é avaliar a modulação de PAR-4 em células de leucemias aguda de células T após tratamento com novos derivados oxazolidínicos. A atividade dos derivados LPSF/NB-2, LPSF/NB-4, LPSF/NB-5 e LPSF/NB-6 foram avaliadas através de PCR em tempo real após tratamento com as respectivas doses de IC<sub>50</sub> e a amsacrina foi utilizada como controle positivo. Os resultados mostraram que apenas os derivados LPSF/NB-4 e LPSF/NB-6 foram capazes de induzir a superexpressão de PAR-4, levando as células à apoptose. Portanto, os derivados oxazolidínicos demonstraram efeito apoptótico induzido por PAR-4 demonstrando uma possível seletividade para o câncer.*

**Palavras-chave:** *Fármacos anticâncer. Expressão gênica. Apoptose.*

**ABSTRACT** – *According to the National Institute of Cancer (INCA), treatment of leukemia still involves many difficulties such as high mortality rates. Additionally, high doses of chemotherapy, toxicity and tumour resistance are problems yet to be resolved. Thus, it is important to study new drugs capable of targeting specifically cancer. Prostate Apoptosis Response-4 (PAR-4), a tumor suppressor protein is the target of the current study. Oxazolidinone derivatives are new drugs that have been extensively studied and demonstrated various pharmacological properties. Therefore, the objective of this study is to evaluate the modulation of PAR-4 in acute T cell leukemia cells after treatment with new oxazolidinone derivatives. The activity of the derivatives LPSF/NB-2, LPSF/NB-4, LPSF/NB-5 and LPSF/NB-6 were evaluated through real time PCR after treatment with the respective IC<sub>50</sub> doses and amsacrine was used as positive control. The results showed that only the derivatives LPSF/NB-4 and LPSF/NB-6 were capable of inducing PAR-4 overexpression, leading the cells to apoptosis. Therefore, the oxazolidinone derivatives demonstrated PAR-4 induced apoptotic effect demonstrating a possible selectivity for cancer.*



*Response-4 (PAR-4), a tumour suppressor protein, is the targeted molecule of this study. Oxazolidine derivatives are novel drugs that have been widely studied and have presented several pharmacological properties. Therefore, the aim of this study is to evaluate PAR-4 expression in acute T cell leukemia after treatment with oxazolidine derivatives. The activity of LPSF/NB-2, LPSF/NB-4, LPSF/NB-5 and LPSF/NB-6 derivatives were assessed by real-time PCR after treatment with IC<sub>50</sub> doses and amsacrine was used as positive control. Results showed that only LPSF/NB-4 and LPSF/NB-6 were able to upregulate PAR-4, leading cells to apoptosis. The same derivatives were also to increase other genes related to apoptosis and, therefore, may be drugs for selective treatment of cancer.*

*Key-words: anticancer drugs. Gene expression. Apoptosis.*

## 1. INTRODUCTION

According to the World Organization of Health, T cell lymphoblastic leukemia is classified as 25% of lymphoblastic leukemia cases in adults and 15% in pediatric patients. Only 40% and 70% of these patients, respectively, survive for long terms (Schrappe *et al.*, 2011). The treatment of leukemia may be successful, however, there are still many difficulties related to this disease. In Brazil, there were 6.316 registered cases of death in 2013 (INCA, 2013).

As reported by the American Cancer Society, high doses of drugs used in chemotherapy, toxicity and tumour resistance are still problems that must be resolved. Additionally, targeting specifically cancer cells with drugs is the main concern about cancer treatment. Therefore, it is important to study and develop new drugs that target cancer specifically in order to overcome such problems.

Studies have shown that oxazolidine derivatives present many pharmacological roles such as anticancer activity (Singh *et al.*, 2011; Tadasse *et al.*, 2011). Nevertheless, it is important to evaluate the specificity of these drugs and its capacity to induce cell death specifically in cancer.

Recent studies have shown that the prostate apoptosis response-4 (PAR-4), a tumour suppressor agent, is able to induce apoptosis specifically in many different types of cancer cells but not in normal cells, leaving these unaffected (Alvarez *et al.*, 2013). Thus, the present study objective is to evaluate the ability of four novel oxazolidine derivatives to induce apoptosis by activating PAR-4, a target for therapy innovation.

## 2. MATERIALS AND METHODS

Acute T cell leukemia cells (Jurkat) were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum and incubated in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C. The treatment was performed using the following oxazolidine derivatives in IC<sub>50</sub> doses previously determined by our group (CAMPOS, 2013): 5-(4-bromo-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona (LPSF/NB-2, IC<sub>50</sub> = 24.18 µM), 3-etil-5-(4-pirrolidin-1-il-benzilideno)-2-tioxo-oxazolidin-4-ona (LPSF/NB-4, IC<sub>50</sub> = 15.19 µM), 5-(3,4-bis-benzilóxi-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona (LPSF/NB-5, IC<sub>50</sub> = 22.54 µM), 3-etil-5-(4-piperidin-1-il-benzilideno)-2-tioxo-oxazolidin-4-ona (LPSF/NB-6 IC<sub>50</sub> = 28.99

$\mu\text{M}$ ) and amsacrine ( $1 \mu\text{M}$ ) as positive control for apoptosis. All oxazolidine derivatives were gently offered by Dr. Ivan Pitta from the Laboratory of Synthesis and Drug Design (NUPIT-SG).

For gene expression analysis, Jurkat cells were seeded in 6-well plates with density of  $10^6$  cells/mL, treated for 8h with all derivatives and collected by centrifugation. Total RNA was extracted using Trizol® reagent, the integrity of the extract was analyzed by agarose (1%) gel electrophoresis and quantified with Qubit® fluorimeter. cDNA synthesis was performed using high-capacity cDNA reverse transcriptase kit (Applied Biosystems). Amplification of cDNA was carried out by real-time qPCR. The comparative expression was carried out by the  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  method. The initial step is to obtain the  $\Delta\text{Ct}$  index which is characterized by the relation between the reference gene (18S) and the target gene (PAR-4) for all samples. Then, the  $-\Delta\Delta\text{Ct}$  was obtained by the comparison of  $\Delta\text{Ct}$  values of the non-treated (NT) control sample with all samples treated with oxazolidine derivatives. Raw data was initially analyzed by normalization test and Mann-whitney non-parametric test was also applied (One-way ANOVA). Statistically different values were determined by  $p \leq 0.05$ .

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

Oxazolidine derivatives has been widely studied and its known to present many different pharmacological properties such as anticancer activity (Singh *et al.*, 2011; Tadasse *et al.*, 2011). Rodrigues *et al.* also showed that new oxazolidine derivatives are promising drugs with anticancer activity.

PAR-4 (Prostate Apoptosis Response-4) is a tumour suppressor gene that was initially discovered in mouse prostate cells induced to apoptosis (Sells *et al.*, 1994). The upregulation of this gene in breast cancer cells showed to reduce cellular proliferation whereas its silencing was able to reduce cell death significantly.

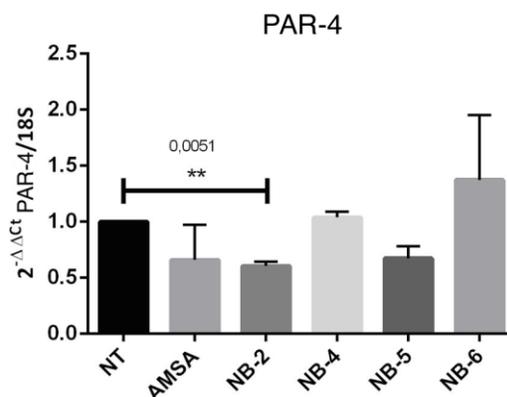


Figure 1 – Comparative analysis of PAR-4 expression modulated by oxazolidine derivatives and amsacrine. 18S was used internal control and two independent experiments were performed.

In Jurkart cell line (Acute T cell leukemia), as shown in figure 1, only the LPSF/NB-6 derivative was able to induce a 1.5-fold increase in levels of PAR-4. However, when compared to Amsacrine, the current drug of choice for the treatment of most hematopoietic malignancies, PAR-4 modulation by



LPSF/NB-4 and LPSF/NB-6 were the most effective. These findings were found to be in conformity to other studies performed by our group which show that LPSF/NB-4 and LPSF/NB-6 were able to most effectively induce cell death through apoptosis. However, only LPSF/NB-2 showed statistically significant values with  $p = 0.0051$  (\*\*).

#### 4. CONCLUSION

Novel oxazolidine derivatives are promising candidates for cancer therapy, two out of four derivatives tested (LPSF/NB-4 and LPSF/NB-6) were able to increase expression of PAR-4, a tumour suppressor gene. Nevertheless, other studies should be carried out in order to improve these findings and compare rate of cell death and PAR-4 influence in apoptosis of cancer and normal cells.

#### 5. REFERENCES

- ALVAREZ, J.V., PAN, T.C., RUTH, J., FENG, Y., ZHOU, A., PANT, D., *et al.* Par-4 downregulation promotes breast cancer recurrence by preventing multinucleation following targeted therapy. *Cancer Cell*. v. 24, p. 30–44, 2013.
- CAMPOS, J.F. Síntese e Atividade Anticâncer de Novos Derivados 2-tioxo-oxazolidínicos. 2013. Universidade Federal de Pernambuco.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Tipos de Câncer: Leucemias. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. 2013.
- RODRIGUES, F. A. R., BOMFIM, I.S., CAVALCANTI, B.C., PESSOA, C., GOLCALVES, R.S.B., WARDELL, J. L., WARDELL, S.M.S.V., SOUZA, M.V.N. Mefloquine-Oxazolidine Derivatives: A New Class of Anticancer Agents. *Chem Biol Drug Des*. v. 83, p. 126-131. 2014.
- SCHARPPE, M. *et al.* Late MRD response determines relapse risk overall and in subsets of childhood T-cell ALL: results of the AIEOP-BFM-ALL 2000 study. *Blood*. v. 118, p. 2077–2084, 2011.
- SINGH, A. *et al.* 3,4-Disubstituted oxazolidin-2-ones as constrained ceramide analogs with anticancer activities. *Bioorg Med Chem*. v.1;19(21), p.6174-81, 2011.
- TADESSE, M. *et al.* Synoxazolidinone C; a bicyclic member of the synoxazolidinone family with antibacterial and anticancer activities. *Tetrahedron Letters*. v. 52, p. 1804–1806, 2011.,

#### 6. ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by grants from UFPE, CNPq, INCT-if and FACEPE.



ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOLOGIA MOLECULAR – BM 6

## CUSTO BENEFÍCIO NA ESCOLHA DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA PARA A DETECÇÃO DO GENOMA DE HPV EM AMOSTRAS CLÍNICAS

F. S. MEDEIROS<sup>1</sup>, S. A. V. de OLIVEIRA<sup>1</sup> e N. LUCENA-SILVA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fiocruz, Recife PE, Brasil, Departamento de Imunologia, Laboratório de Imunogenética

<sup>2</sup> Hospital de Ensino, Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira, Recife, PE, Brasil, Departamento de Oncologia Pediátrica, Laboratório de Biologia Molecular

E-mail para contato: norma.lucena@hotmail.com

**RESUMO** – *Testes de investigação molecular para diagnóstico de papilomavírus humano (HPV) têm sido largamente estudados, sendo a extração de DNA uma etapa limitante para a reação em cadeia da polimerase (PCR), devido a qualidade da amostra. Com base nessas informações, objetivo deste trabalho foi comparar duas diferentes técnicas de extração de DNA em amostras de células cervicais para o diagnóstico do HPV. Para análise molecular utilizou-se dois protocolos, sendo um baseado no método de extração por Proteinase K e o outro baseado em Kit comercial da Illustra Blood genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare®). O rendimento e pureza de DNA foram medidos e a sua qualidade avaliada pelo gel de eletroforese. A partir do mesmo número de células, foi observado que o método por Proteinase K teve o menor rendimento na quantificação de DNA (50 µL a 0,48 µg) quando comparado ao Kit da Illustra (200 µL a 9,0 µg). O grau de pureza do DNA pelo Kit foi superior ao DNA extraído pelo método da Proteinase K e purificação pelo fenol. Portanto, o rendimento e pureza do método de extração de DNA por Kit da Illustra é maior do que o método por Proteinase K para a finalidade de diagnóstico molecular de HPV.*

**Palavras chave:** *Kit de extração de DNA; Proteinase K; Purificação de DNA; Amostra cervical*

**ABSTRACT** – *Molecular Research tests for diagnostic human papillomavirus (HPV) have been largely studied, wherein DNA extraction is a limiting step in the polymerase chain reaction (PCR), due to sample quality. Based on this information, objective of this study was to compare two different DNA extraction techniques in cervical cell samples for diagnosis of HPV. For molecular analysis was used two protocols, one based on the extraction method by Proteinase K and the other based on Illustra Blood genomicPrep*

*Mini Spin Kit (GE Healthcare®). The DNA yield and purity were measured and the quality was evaluated by gel electrophoresis. From same number of cells it has been observed that the method Proteinase K, had the lowest yield DNA quantification (50  $\mu$ L to 0.48  $\mu$ g) when compared to the Illustra Kit (200  $\mu$ L to 9.0  $\mu$ g). The purity of the DNA kit is higher than the DNA extracted by the method of proteinase K and purification by phenol. Therefore, the yield and purity of DNA extraction by Illustra Kit is greater than the Proteinase K method for the determination of HPV molecular diagnosis.*

*Keywords: DNA extraction kit; DNA purification; cervical sample; Proteinase K.*

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de colo uterino (CCU) é a terceira neoplasia maligna mais comum em mulheres e a quarta causa de morte relacionada ao câncer, no Brasil (INCA, 2016), onde no país o investimento tanto no rastreamento quanto no diagnóstico no setor privado é maior do que no setor público (Novaes *et al.*, 2015). O papilomavírus humano (HPV) tem sido apontado como um fator etiológico de cânceres cervicais, com mais de 120 tipos. Alguns tipos virais de baixo grau (tipos 6, 11, 61, 54, entre outros) estão relacionados à etiologia de lesões benignas como verrugas comuns e condilomas, enquanto os de alto grau (tipo 16, 18, 45, 58, entre outros) têm sido identificados como agentes causais do CCU (Bouvard *et al.*, 2009). O HPV é vírus DNA, sendo a variabilidade genética do gene *L1* responsável pela classificação dos diferentes tipos virais (Klingelutz; Roman, 2012). A biologia molecular tem sido um instrumento importante para o diagnóstico de HPV (Kenne *et al.*, 2014; Castro *et al.*, 2015). A escolha do método de extração do DNA, visando obter melhor rendimento, rapidez e além de evitar etapa adicional com purificação das amostras, é uma etapa importante que precede a reação em cadeia da polimerase (PCR). Com base nessas informações, o objetivo deste trabalho foi comparar duas diferentes técnicas de extração de DNA em amostras de células cervicais de mulheres visando a recomendação para o protocolo de diagnóstico molecular do HPV.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

**Extração de DNA:** Para a extração de DNA genômico foram utilizados 200  $\mu$ L da suspensão de células cervicais coletadas por meio da *Cytobrushes*® e ressuspensas em PBS. A extração de DNA foi realizada primeiro por digestão enzimática com Proteinase K seguida por purificação com fenol/clorofórmio adaptado de Martins *et al.* (2014); e por meio do *Kit* da *Illustra Blood genomicPrep Mini Spin* (GE Healthcare®), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de DNA foram quantificadas pela densidade ótica a 260 nm em equipamento NanoDrop® (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA). A razão das absorbâncias (A260/A280) entre 1,7 a 2,0 foi considerada como indicativo de pureza das amostras. **Deteção de HPV:** A presença de DNA viral na amostra clínica foi detectado por PCR utilizando iniciadores degenerados MY09 e MY11 para amplificação de fragmento de 450 pb da região do gene *L1* de HPV. O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose corado com SYBR safe sob luz ultravioleta (Fotodocumentador – LOCCUS®). A qualidade do DNA extraído foi avaliada pela capacidade de amplificação do gene humano constitutivo *GAPDH* (que codifica a enzima gliceraldeído fosfato desidrogenase). **Considerações éticas:** Este estudo foi

aprovado em 09/06/2014, sob o registro CAEE 23698513.0.0000.5190.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método de extração por Proteinase K, embora amplamente utilizado (Barea *et al.*, 2004; Kenne *et al.*, 2014; Martins *et al.*, 2014), quando comparado com o *Kit da Illustra*, apresenta menor rendimento, maior tempo de execução, e menor pureza mesmo após a purificação por fenol-clorofórmio como mostra o Quadro 1. O custo do método por proteinase K é menor, mas não inclui o valor da hora trabalhada do técnico.

Parâmetros	Proteinase K + purificação com fenol	Kit da <i>Illustra Blood genomicPrep Mini Spin</i>
DNA (ng/µl)	9,5	44,9
Pureza (260/280)	1,6	1,7
Rendimento (µg)	0,5	8,9
Custo direto (R\$)	1.358,25	1.600,00
Número de amostras extraídas	250	250
Tempo de execução	2 dias	30 min

Quadro 1 - Comparação entre dois protocolos de extração de DNA.

Nota: o valor da concentração do DNA foi calculado avaliando a média de três leituras.

A qualidade e quantidade do DNA é importante para diagnóstico molecular por PCR (Kenne *et al.*, 2014), dentre outros para afastar resultado falso negativo (Figura 1).

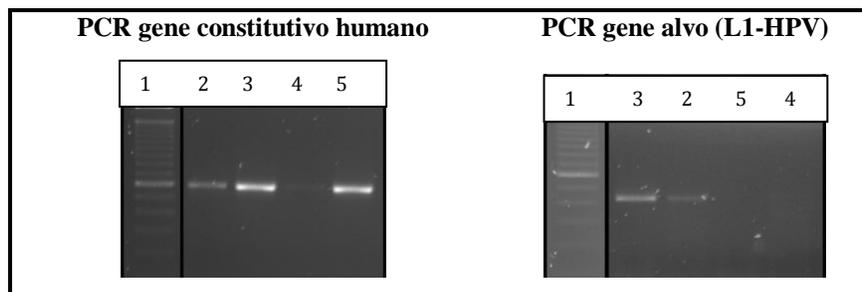


Figura 1 - Análise em gel de agarose 2% dos fragmentos de DNA amplificados após PCR.

Legenda: 1. Padrão de peso molecular (100 pb *Leader*); 2. Extração por proteinase K (amostra A); 3. Extração por KIT (amostra A); 4. Extração por proteinase K (amostra B); 5. Extração por KIT (amostra B).

### 4. CONCLUSÃO

Os benefícios associados a escolha do método de extração de DNA de amostra clínica para diagnóstico molecular inclui o maior rendimento, pois permite análises moleculares múltiplas no caso de amostras raras, e também a pureza da preparação, pois reduz a possibilidade de falsos negativos na PCR. A escolha também é condicionada a um custo acessível composto pelas despesas diretas e indiretas, e nesse caso o tempo de execução é um componente importante, devido a hora trabalhada do



técnico. Por fim, a escolha do método de extração de DNA será a resultante do balanço entre os benefícios providos pelo rendimento e qualidade do DNA produzido considerando a posterior utilização do DNA, e os custos.

## 5. REFERÊNCIAS

- BAREA, J.A.; PARDINI, M.I.M.C.; GUSHIKEN, T. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). *Rev. bras. hematol. hemoter.*, v. 26, n. 4, p. 274-281, 2004.
- BOUVARD V.; BAAN R.; STRAIF K.; GROSSE Y.; SECRETAN B.; EL GHISSASSI F. *et al.* A review of human carcinogens—Part B: biological agents. *Lancet Oncol*, v. 10, p. 321-322, 2009.
- CASTRO, F.A.; KOSHIOL, J.; QUINT, W.; WHEELER, C.M.; GILLISON, M.L.; VAUGHAN, L.M.; *et al.* Detection of HPV DNA in paraffin-embedded cervical samples: a comparison of four genotyping methods. *BMC Infect Dis.*, v. 15, n. 1, p. 544, 2015.
- KENNE, E.; GASSEN, M.; SANTOS, C.E.D.; REIS, L.N.; BULLÉ, D. J.; RENNER, J.D.P. Diagnóstico molecular de HPV em amostras cérvico-vaginais de mulheres que realizam o Papanicolaou. *Cinergis*, v. 15, n. 4, p. 201-206, 2014.
- KLINGELHUTZ, A.J.; ROMAN, A. Cellular transformation by human papillomaviruses: Lessons learned by comparing high- and low-risk viruses. *Virology*, v. 424, n. 2, p. 77-98, 2012.
- MARTINS, A.E.S.; LUCENA-SILVA, N.; GARCIA, R.G.; WELKOVIC, S.; BARBOZA, A.; MENEZES, M.L.B.; *et al.* Prevalence of human papillomavirus infection, distribution of viral types and risk factors in cervical samples from human immunodeficiency virus-positive women attending three human immunodeficiency virus-acquired immune deficiency syndrome reference centres in northeastern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 109, n. 6, p. 738-747, 2014.
- NOVAES, H.M.; ITRIA, A.; SILVA, G.A.; SARTORI, A.M.; RAMA, C.H.; DE SOÁREZ, P.C. Annual national direct and indirect cost estimates of the prevention and treatment of cervical cancer in Brazil. *Clinics*, v. 70, n. 4, p. 289-295, 2015.

## 6. AGRADECIMENTOS

Este teste-piloto é um desdobramento do projeto intitulado “*Biossensor para diagnóstico de infecção cervical por HPV: ferramenta para rastreamento e seguimento de mulheres sob risco de desenvolver câncer de colo*”, que foi contemplado com o edital: MCTI/FINEP/MS/SCTIE/DECIT-CT-SAUDE e FNS (Desenvolvimento de inovações para prevenção e/ou tratamento do câncer 01/2013 – ref: 1299/13).



ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOLOGIA MOLECULAR – BM 7

## PAPEL DE GALECTINA-3 NA MOTILIDADE DO CÂNCER DE PÂNCREAS

A. F. da SILVA FILHO<sup>1</sup>, M. G. R. PITTA<sup>1</sup>, M. J.B. M. RÊGO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas.

E-mail para contato: tonifelix4@gmail.com

**RESUMO** – *O estudo em questão teve como objetivo avaliar a importância de galectina-3 para a motilidade de células representativas do câncer pancreático em microambiente fidedigno. As linhagem PANC-1 e Mia PaCa-2 foram submetidas ao ensaio de fissura tecidual e incubadas em condições de hipóxia associada ou não à privação nutricional. Para a inibição inespecífica e específica da galectina-3, foram utilizadas, lactose pura e M338, respectivamente, sendo sacarose utilizada como controle negativo. A incubação durou 24 horas e a análise das imagens foi realizada em software image J. Os resultados mostraram que a atividade migratória das células tumorais diminuiu na condição de hipóxia associada à privação nutricional. Em Mia PaCa-2, a adição de M338 parece inibir a migração celular nas condições de cultivo normal e privação nutricional, porém todos os resultados não foram significativos diante do pequeno número de repetições experimentais. Deste modo, em condições miméticas do microambiente tumoral pancreático, galectina-3 pode vir a desempenhar influência sobre a atividade migratória das células.*

**Palavras-chave:** *Glicobiologia, câncer de pâncreas, migração celular.*

**ABSTRACT** - *The present study evaluated the galectin-3 importance for motility of pancreatic cancer in mimetic microenvironment. PANC-1 and Mia PaCa-2 cell lines were submitted to migration assay and incubated in hypoxic conditions with or without nutritional deprivation. For nonspecific and specific inhibition of galectin-3, were used pure lactose and M338, respectively. The best time for incubation was 24 hours, and image analysis was performed in Image J software. We found that the migratory activity of tumor cells decreases in hypoxic condition associated with nutritional deprivation. In Mia PaCa-2, the M338 addition appears to inhibit cell migration in normal cultivation and nutritional deprivation conditions, but both results were not significant due to the small number of experimental replicates. Thus, in mimetic conditions of the pancreatic tumor microenvironment, galectin-3 could play relevant influence on the cells*

*migratory activity.*

Key-words: *Glycobiology, pancreas cancer, cell migration.*

## 1. INTRODUÇÃO

O estudo da participação de glicoproteínas no processo da carcinogênese vem sendo aprofundado ao longo das últimas décadas (Pan, *et al.*, 2014). Dentro deste contexto, a galectina-3 (Gal-3), membro vem tendo considerável relevância devido a sua implicação em diversas instâncias da tumorigênese, como por exemplo, adesão e migração celular (Kobayashi *et al.*, 2011). Algumas pesquisas têm apontado que o transcrito de Gal-3 é superexpresso em câncer de pâncreas e sua produção, aumentada em pancreatite crônica, o que pode estar envolvido nas interações tumor-estromal (Song, *et al.*, 2012).

Carcinomas e adenocarcinomas de pâncreas são caracterizados pelo fenótipo altamente maligno, com rápida progressão, metástase antecipadas e uma resposta limitada a radio e quimioterapia (Schulte, *et al.*, 2016). Excessiva desmoplasia em câncer de pâncreas mantém a condição hipóxica e contribui para o mau prognóstico, para resistência à quimioterapia, e o aumento do potencial metastático (Eguqui, *et al.*, 2012). A hipóxia intratumoral por sua vez, representa um das características mais relevantes do microambiente tumoral ao influenciar o seu comportamento, tornando-o biologicamente mais agressivo. Gradualmente, se estabelecem condições propícias à produção de espécies reativas de oxigênio causando a estabilização do Fator Induzível por Hipóxia – 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), o qual estimula a expressão de genes pró-tumorais, incluindo galectinas (Cardoso, *et al.*, 2016).

Gal-3 é reconhecida por regular a metástase, inibindo moléculas de adesão e aumentando o desprendimento de células de câncer de mama e próstata. Além disso, a superexpressão de Gal-3 provocou o aumento da motilidade celular e invasão de células de carcinoma de mama e de pulmão (Kobayashi, *et al.*, 2011). O presente estudo teve como objetivo avaliar o papel de galectina-3 sobre a atividade migratória de linhagens representativas do câncer pancreático num microambiente tumoral mimético.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

**Cultivo de Células** – As células Mia PaCa e PANC-1 foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro. As mesmas foram mantidas em Dulbecco's modified Eagle's medium suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e antibiótico, com acréscimo de 2,5% de soro equino (Cultilab) para a linhagem Mia PaCa. A manutenção ocorreu em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C.

**Ensaio de Exposição à Hipóxia e Privação Nutricional** – As linhagens foram dispostas em placas ou garrafas próprias para o cultivo e submetidas às condições de normóxia ou hipóxia associadas ou não à privação de nutrientes, durante 24 horas. Logo, foram estabelecidas quatro condições experimentais: normóxia e hipóxia com níveis normais de soro fetal bovino (N10 e H10), e normóxia e hipóxia associada à privação de nutrientes (N1 e H1). A atmosfera foi estabelecida em câmara de hipóxia (Billupus-Rothenberg) à 37°C com 95% de N<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>, sendo PO<sub>2</sub><1%.

**Ensaio de Migração em Cultura Bidimensional.** Foi realizado através de uma fissura com auxílio de uma ponteira. Na sequência, sob um microscópio acoplado a um sistema de captura de imagens, as imagens foram feitas no tempo inicial zero (imediatamente à submissão das condições experimentais) e subsequentemente às 24h. A análise dos resultados foram realizados no software Image J.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade migratória das células é inversamente proporcional à porcentagem de área livre remanescente após as 24 horas de exposição às condições experimentais. Tal área foi maior na condição H1, para ambas as linhagens, evidenciando o nível de abrasividade da situação estabelecida (Figura 1A e B).

Os padrões de migração das linhagens se mostraram completamente distintos, de modo que, para PANC-1, o estabelecimento das condições experimentais não acarreta grandes variações na atividade migratória das células, sendo o contrário observado para Mia PaCa-2. Em PANC-1, a atividade migratória das células permanece praticamente inalterada, com diminuição já citada em H1, porém sem significância estatística (Figura 1A). Em Mia PaCa-2, a migração das células aumentou nas condições N10 e N1 somado ao tratamento com M338, porém também sem significância (Figura 1B). Vale salientar que o M338, utilizado como agente inibidor específico de Gal-3, se liga apenas a Gal-3 membranar não havendo interação com galectinas citoplasmáticas, enquanto a lactose pode facilmente adentrar a célula. Segundo Kobayashi e colaboradores (2011), o silenciamento gênico de Gal-3 provocou a inibição da e invasão migração celular, num modelo in vitro com linhagens pancreáticas (Kobaiashy, *et al.*, 2011).

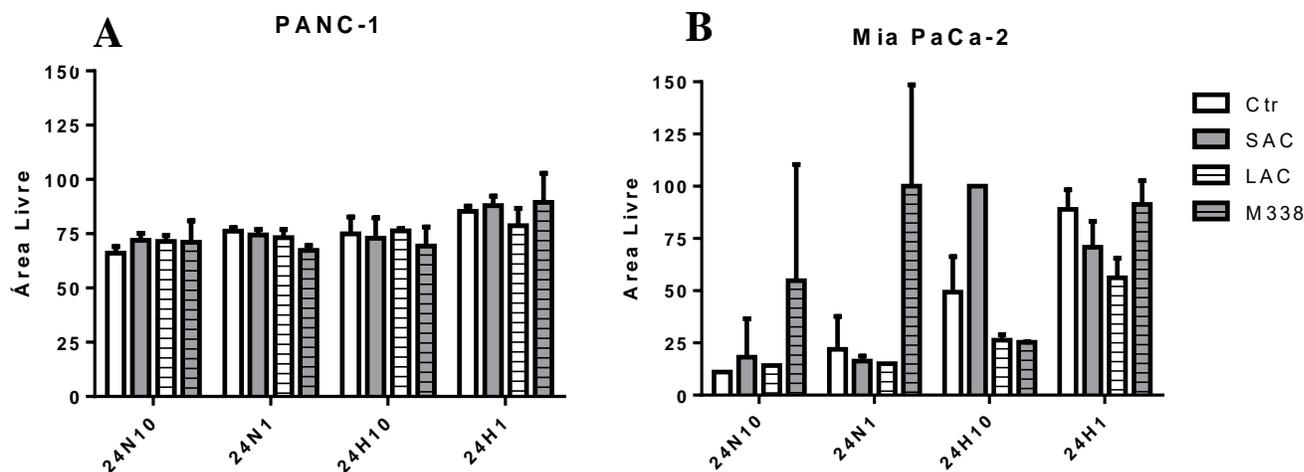


Figura 1- Análise quantitativa da porcentagem de área livre após 24h de migração das linhagem PANC-1 (1A) e Mia PaCa-2 (1B) em condições específicas de cultivo. Ctr – controle; SAC – sacarose; LAC – lactose; 24N10 – 24h em normóxia com 10% SFB; 24N1 – 24h em normóxia com 1% SFB; 24H10 - 24h em hipóxia com 10% SFB; 24H1 – 24h em hipóxia com 1% SFB.



#### 4. CONCLUSÃO

Em condições miméticas do microambiente tumoral pancreático, galectina-3 pode vir a desempenhar influência relevante sobre a atividade migratória das células. Contudo, o presente estudo trás resultados relevantes do ponto de vista científico e necessitam de maior aprofundamento.

#### 5. REFERÊNCIAS

- CARDOSO, A. C.; ANDRADE, L. N.; BUSTOS, S. O.; *et al.* Galectin-3 Determines Tumor Cell Adaptive Strategies in Stressed Tumor Microenvironments. *Front Oncol.* v. 6, p. 127. 2016.
- EGUCHI, D.; IKENAGA, N.; OHUCHIDA, K.; *et al.* Hypoxia enhances the interaction between pancreatic stellate cells and cancer cells via increased secretion of connective tissue growth factor. *Journal of Surgical Research*, E1-E9. 2012.
- KOBAYASHI, T.; SHIMURA, T.; YAJIMA, T.; *et al.* Transient silencing of galectin-3 expression promotes both in vitro and in vivo drug-induced apoptosis of human pancreatic carcinoma cells. *Clin Exp Metastasis*, v.28, p.367–376. 2011.
- PAN, S.; CHEN, R.; TAMURA, Y.; *et al.* Quantitative Glycoproteomics Analysis Reveals Changes in N-Glycosylation Level Associated with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J. Proteome Res.*, v.13, p. 1293–1306. 2014.
- SCHULTE, A.; PANDEYA, N.; FAWCETT, J.; *et al.* Association between family cancer history and risk of pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol.* v. 45, p. 145-150. 2016.
- SONG, S.; JI, B.; RAMACHANDRAN, V.; *et al.* Overexpressed Galectin-3 in Pancreatic Cancer Induces Cell Proliferation and Invasion by Binding Ras and Activating Ras Signaling. *Plos One*, v.4. 2012.
- YANG, X.; LIU, S.; YAN, Q.; *et al.* Role of fucosyltransferase IV in epithelial–mesenchymal transition in breast cancer cells. *Cell Death Dis*, v. 4, p. 735. 2013.

#### 6. AGRADECIMENTOS

Agradecimentos à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT).



**BIOTECNOLOGIA E  
NANOTECNOLOGIA EM SAÚDE**



ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOTECNOLOGIA E NANOTECNOLOGIA EM SAÚDE – BN 1

## RECENTES PERSPECTIVAS DO USO DE ESFINGOLIPÍDIOS COMO ALVO PARA AGENTES ANTIFÚNGICOS

D. B. G. do NASCIMENTO<sup>1</sup>, E. R. de SOUZA<sup>1,2</sup>, R. R. D. ALVES<sup>1</sup>, L. N. de ARAÚJO Nt<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro Universitário Maurício de Nassau, Departamento de Saúde

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Antibióticos  
E-mail para contato: dignabergham@gmail.com

**RESUMO** – *Os estudos sobre o uso esfingolipídios como alvo para agentes antifúngicos são crescentes, pois essas estruturas são importantes para a integridade da membrana dos fungos. Os mecanismos de síntese e regulação desses compostos são mediados por diversas enzimas e a inibição ou inativação dessas moléculas é capaz de alterar a fluidez da membrana e reduzir a patogenicidade dos fungos. Este trabalho objetivou verificar recentes perspectivas para a utilização de inibidores de esfingolipídios na terapia antifúngica. Foi realizada uma revisão de literatura contemplando apenas artigos científicos publicados entre 2011 e 2016, que relataram pelo menos três mecanismos eficientes para que ocorra depleção nos níveis de esfingolipídios.*

*Palavras Chave:* Inibição síntese esfingolipídios; alvo antifúngico; atividade antifúngica

**ABSTRACT** – *Studies on the sphingolipids use as target for antifungal agents are increasing, because these structures are important for the integrity of the fungal membrane. The mechanisms of synthesis and regulation of these compounds are mediated by various enzymes and inhibition or inactivation of these molecules is able to alter membrane fluidity and reduce the pathogenicity of fungi. This work aimed to check recent prospects for use of sphingolipids inhibitors in antifungal therapy. A literature review was conducted contemplating only scientific articles published between 2011 and 2016, which reported at least three efficient mechanisms for depletion occurs in sphingolipids.*

*Keywords:* sphingolipid synthesis inhibition; antifungal target; antifungal activity



## 1. INTRODUÇÃO

Os esfingolipídios são estruturas anfipáticas, cuja estrutura central é a esfingosina. Estes se encontram associados a esteróis e proteínas presentes nas membranas plasmáticas dos fungos. Podem ser apontados como um alvo para agentes antifúngicos, pois eles atuam como mensageiros ou moduladores da transdução de sinais, o que pode afetar a adesão, motilidade, crescimento celular e induzir a apoptose (Guimarães *et al.*, 2014). Além disso, sua estrutura apresenta particularidades em relação aos esfingolipídios de mamíferos: presença de (E)- $\Delta^8$ -insaturação e um radical metila ligado a esfingosina, e, (E)- $\Delta^3$ -insaturação e um grupo hidroxilo ligado ao C<sub>2</sub> do ácido graxo.

Apesar do número de fármacos antifúngicos ser relativamente grande, muitos problemas estão associados ao uso deles na clínica terapêutica, visto que as infecções fúngicas geralmente acometem pacientes com nível de vulnerabilidade imunológica elevado causado por oncopatologias, síndrome da imunodeficiência adquirida (Sida/VIH), doenças autoimunes e medicamentos imunossupressores (Lin, Shiau e Fang., 2015). Além disto, já existem registros de resistência fúngica frente às três principais, e mais eficientes, classes de antifúngicos (Pfaller, 2012). Diante dessa problemática este trabalho objetivou identificar novas perspectivas para utilização de esfingolipídios como alvo para terapia antifúngica.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo baseou-se em uma revisão de literatura cuja pesquisa bibliográfica foi realizada mediante a busca eletrônica de artigos científicos indexados nas bases de dados ScienceDirect, National Library of Medicine (Medline) e National Center for Biotechnology Information - U.S. National Library of Medicine (PubMed). Após consulta aos Descritores em Ciências da Saúde (DeCS), identificaram-se as palavras-chaves: *sphingolipids*, *sphingolipid synthesis inhibition*, *antifungal target* e *antifungal activity*. A pesquisa considerou os artigos publicados entre os anos de 2011 a 2016, incluindo-se publicações no idioma inglês. Foram lidos previamente os resumos dos artigos ou o texto completo, quando necessário, para avaliar abrangência. Foram utilizadas as referências que se identificaram com o objetivo do estudo. Uma vez escolhidos os artigos, iniciou-se a análise e síntese dos mesmos com uma leitura exploratória para reconhecimento dos artigos que interessavam à pesquisa de forma geral; uma leitura seletiva para selecionar os que seriam usados no estudo; uma leitura analítica dos selecionados e por último a leitura interpretativa com o intuito de conferir um significado mais amplo aos resultados escolhidos para uma melhor elaboração textual.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontrados estudos que contemplam análise de silenciamento genético e avaliação de inibição de enzimas envolvidas na síntese dos esfingolipídios.

Com a finalidade de interferir na expressão de esfingolipídios, uma tecnologia genética foi estudada, a RNA interferente (RNAi). Essa técnica consiste em introduzir um oligonucleotídeo complementar ao mRNA-alvo dentro de uma determinada célula, tal alteração pode bloquear a

ligação deste mRNA formado ao ribossomo ou ativar a degradação do mRNA-alvo, podendo bloquear a tradução de enzimas envolvidas na síntese e regulação dos esfingolipídeos. Conhecida como silenciamento genético, este método pode ser empregado em células de mamíferos, insetos e fungos. Mostrou-se eficiente para inibição da formação de hifas em *Candida albicans*, afetando a adesão e penetração do fungo nas células do hospedeiro (Moazeni *et al.*, 2012).

A homeostase dos esfingolipídios é regulada pelas proteínas da família ORM, que formam complexos com a serina palmitoil transferase, enzima precursora dos esfingolipídios, limitando a síntese desses compostos. Como resposta a depleção dos níveis de esfingolipídios as proteínas ORM são fosforiladas, o que permite um aumento compensatório desses níveis (Sun *et al.*, 2012). Roelants e colaboradores (2011) apontaram a enzima quinase YPK1 como a principal responsável pela fosforilação das enzimas ORM, o que sugere que a inibição da YPK1 previna essa compensação, mantendo baixos os níveis de esfingolipídios e diminuindo a patogenicidade fúngica.

Os estudos de Mor e colaboradores (2015) relataram que o composto (3-bromo-4-hidroxibenzilideno)-2-metilbenzo-hidrazida (BHBM) e o seu derivado, 3-bromo-*N*-(3-bromo-4-hidroxibenzilideno)benzo-hidrazida (DBHBM) (figura 1), apresentaram ação antifúngica *in vitro* com concentrações fungicidas mínimas (CFM) de 4 µg/ml e 1,2 µg/ml respectivamente e essa ação foi atribuída a inibição da síntese de glicosilceramidas em *Cryptococcus neoformans*. Os compostos foram altamente eficientes contra *Rhizopus oryzae*, *Histoplasma capsulatum*, *Pneumocystis murina*, e *Pneumocystis carinii* e apresentaram ação moderada contra *Candida* spp, *Aspergillus fumigatus*, e *Coccidioides* spp. Não foi observado danos para células de mamíferos.

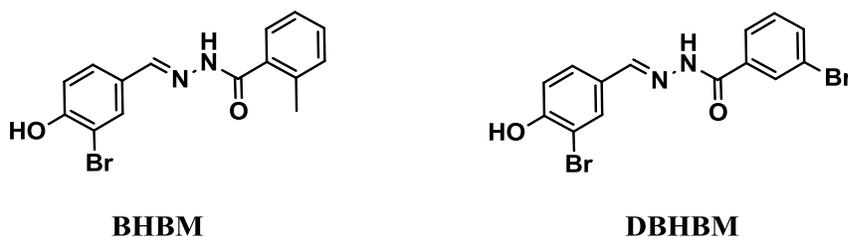


Figura 1 – Compostos hidrazidas com ação antifúngica

#### 4. CONCLUSÃO

A análise dos estudos selecionados evidenciou a inibição dos esfingolipídios como uma forma promissora para obtenção da ação fungicida. Porém, são necessários mais estudos referentes ao local específico de ação de moléculas inibidoras e a elucidação do conjunto de enzimas envolvidas na biossíntese dos esfingolipídios.



## 5. REFERÊNCIAS

- GUIMARÃES, L. L.; TOLEDO, M. S.; FERREIRA, F. A.; STRAUS, A. H.; TAKAHASHI, H. K. Structural diversity and biological significance of glycosphingolipids in pathogenic and opportunistic fungi. *Front. Cell. Inf. Micro.*, v. 4, p. 138, 2014.
- LIN, Y. Y.; SHIAU, S.; FANG, C. T. Risk factors for invasive *Cryptococcus neoformans* diseases: a case-control study. *PLoS one*, v. 10, n. 3, p. e0119090, 2015.
- MOAZENI, M.; KHORAMIZADEH, M. R.; KORDBACHEH, P.; SEPEHRIZADEH, Z.; ZERAATI, H.; NOORBAKHSH, F.; REZAIE, S. RNA-mediated gene silencing in *Candida albicans*: inhibition of hyphae formation by use of RNAi technology. *Mycopathologia*, v. 174, n. 3, p. 177-185, 2012.
- MOR, V.; RELLA, A.; FARNOUD, A. M.; SINGH, A.; MUNSHI, M.; BRYAN, A.; ASHBAUGH, A. Identification of a new class of antifungals targeting the synthesis of fungal sphingolipids. *MBio*, v. 6, n. 3, p. e00647-15, 2015.
- PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *T. Amer. J. Med.*, v. 125, n. 1, p. 3-13, 2012.
- ROELANTS, F. M.; BRESLOW, D. K.; MUIR, A.; WEISSMAN, J. S.; THORNER, J. Protein kinase Ypk1 phosphorylates regulatory proteins Orm1 and Orm2 to control sphingolipid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proce. Nat. Acad. Sci.*, v. 108, n. 48, p. 19222-19227, 2011.
- SUN, Y.; MIAO, Y.; YAMANE, Y.; ZHANG, C.; SHOKAT, K. M.; TAKEMATSU, H.; DRUBIN, D. G. Orm protein phosphoregulation mediates transient sphingolipid biosynthesis response to heat stress via the Pkh-Ypk and Cdc55-PP2A pathways. *Mol. Bio. Cell.*, v. 23, n. 12, p. 2388-2398, 2012.

## 6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Centro Universitário Maurício de Nassau e a Universidade Federal de Pernambuco.



ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOTECNOLOGIA E NANOTECNOLOGIA EM SAÚDE – BN 6

## DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA NANOSENSORA PARA TESTE RÁPIDO DE HIDRONEFROSE

E. K. G. TRINDADE<sup>1</sup> e R. A. F. DUTRA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Departamento de Engenharia Biomédica

E-mail para contato: erikaketlem@hotmail.com

**RESUMO** – *A hidronefrose é a alteração mais comum do trato urinário fetal e ocorre em aproximadamente 1% de todas as gestações, sendo capaz de causar danos permanentes nos rins quando não diagnosticada precocemente. O desenvolvimento de um teste rápido para a avaliação da função renal relacionada com esta condição é extremamente importante para neonatos. Assim, uma plataforma nanoestruturada para a detecção de cistatina C, marcador importante para a avaliação da taxa de filtração glomerular (TFG), foi desenvolvido. A plataforma elaborada mostrou-se estável quando utilizada sem sonda redox, possivelmente permitindo leituras diretamente em sangue do cordão umbilical. Isto pode permitir a avaliação rápida e confiável da função renal imediatamente após o nascimento, reduzindo o tempo para início do tratamento e os consequentes danos que a demora pode causar.*

*Palavras-chave: Imunossensor; óxido de grafeno; aminoferroceno; cistatina C, anti-cistatina C.*

**ABSTRACT** – *Hydronephrosis is the most common fetal urinary tract alteration and occurs in approximately 1% of all pregnancies, being able to permanently damage the kidney when not precociously diagnosed. The development of a rapid test for renal function evaluation related to this condition is extremely important for newborns. Thus, a nanostructured platform for cystatin C detection, an important marker for the assessment of glomerular filtration rate (GFR), was developed. The designed platform proved stable when used without redox probe, possibly allowing test readings directly from umbilical cord blood. This may enable fast and reliable evaluation of renal function immediately after birth, reducing initial treatment time and the consequent damage that delay may cause.*

*Keywords: Immunosensor; graphene oxide; amineferrocene; cystatin C, anti-cystatin C.*



## 1. INTRODUÇÃO

A hidronefrose é uma condição capaz de danificar o rim permanentemente, sendo definida como a dilatação do cálice e da pelvis renais. Esta é a alteração mais frequente no trato urinário fetal, ocorrendo em 1% de todas as gestações (Choi *et al.*, 2016; Vemulakonda; Yiee; Wilcox, 2014). O método mais utilizado na clínica para avaliar a função renal é a depuração de creatina com urina de 24 horas e a creatina sérica, mas por conta das limitações práticas e a relativa imprecisão do método, outros marcadores vêm sendo adotados. Entre eles, encontramos a cistatina C, a qual é secretada em todas as células nucleadas do nosso corpo. É livremente filtrada pelos glomérulos e sua concentração sérica é independente da idade, sexo, dieta, massa muscular e peso corporal (Shlipak *et al.*, 2013; Shlipak; Mattes; Peralta, 2013). A avaliação acurada da função renal através da taxa da filtração glomerular (TFG) é fundamental na rotina clínica, pois é parte decisiva do diagnóstico e da terapêutica. Neste contexto, é desejável o desenvolvimento de métodos de detecção que possam atender a esta demanda.

Imunossensores são dispositivos compostos basicamente por duas partes: um elemento biológico para identificação do analito pesquisado (antígenos ou anticorpos) e um elemento transdutor, capaz de transformar o sinal da ligação biológica em um sinal elétrico. Nas últimas décadas, diferentes nanomateriais e moléculas biológicas disponíveis ajudaram a criar um vasto campo para desenvolvimento destes sensores. Ainda assim, a maioria dos testes eletroquímicos produzidos exige a presença de sondas redox para sua realização. Para superar este obstáculo, foi utilizado o aminoferroceno (AFC), o qual possui uma atividade redox própria e, quando associado à nanomateriais, permite a leitura em meio inerte (como sangue ou soro). Sua funcionalização com amina permite a formação de ligações amida com nanomateriais. Nanomateriais como o óxido de grafeno (GO) permitem uma maior área eletroativa e para imobilização das biomoléculas, assim levando a uma maior sensibilidade do sensor (Zribi *et al.*, 2016). A plataforma sensora aqui proposta tem como vantagem a possibilidade de detecção em tempo real com baixo custo de produção. Como consequência, este projeto suporta forte contribuição no desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos envolvendo tecnologia simples e prática, com aplicações principalmente na área clínica.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

*Materiais:* Óxido de grafeno, aminoferroceno, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimide (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS) foram adquiridos da Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (Milli-Q), Millipore Corporation, Darmstadt, Alemanha. Os testes foram realizados em célula eletroquímica de vidro, em um potenciostato/galvanostato IviumCompactStat (Eindhoven, Netherlands) acoplado a um microcomputador e controlado pelo software IviumSoft.

*Metodologia:* Foram preparadas três soluções: 1) GO em água; 2) AFC em EDC/NHS e 3) GO funcionalizado com AFC (AFC-GO) em EDC/NHS. As três soluções foram depositadas em diferentes eletrodos de ouro e estes, colocados para secar em estufa, e em seguida foram testados utilizando as técnicas eletroquímicas de voltametria de onda quadrada e voltametria cíclica. Os testes foram

realizados em solução de KCl (0,1M), simulando o estado eletroquímico do sangue.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O AFC foi utilizado como forma de obter resultados em meios eletroquimicamente inertes, como o sangue e o KCl. A figura 1 (a) demonstra a diferença na área eletroativa quando comparando o eletrodo limpo (EAu) e o eletrodo funcionalizado com AFC. Não foi observada resposta do eletrodo sem o AFC, enquanto que após a sua imobilização, um pico de redução foi encontrado.

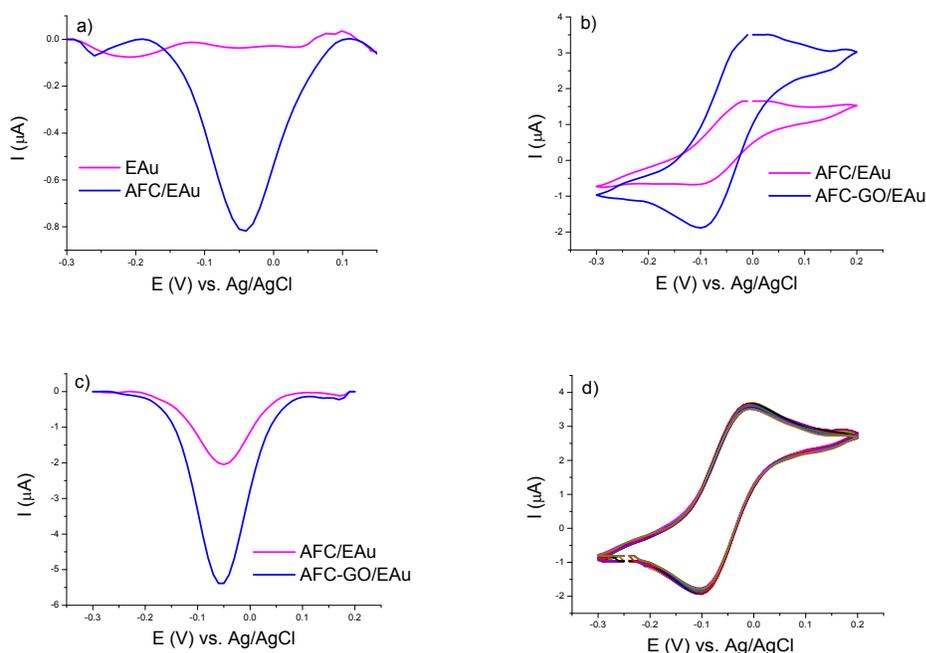


Figura 1 – Voltametria de onda quadrada do eletrodo limpo (EAu) e com AFC (a); voltametria cíclica (b) e de onda quadrada (c) do eletrodo com AFC e AFC-GO; e voltamogramas cíclicos do eletrodo com AFC-GO repetidos 20 vezes (d). Experimentos carreados em solução de KCl (0,1M).

Foram comparados os gráficos obtidos pela deposição do AFC e do AFC-GO (Fig.1 (b) e (c)), observando-se um aumento da área eletroativa nos gráficos do AFC-GO, quando comparados com os do AFC apenas. Apesar de o GO ser isolante quando utilizado sozinho, sua funcionalização com diversos materiais pode gerar um aumento na condutividade (RODRIGUEZ et al., 2015), como demonstrado pela funcionalização com o AFC.

Vinte voltamogramas cíclicos seguidos foram realizados no eletrodo contendo AFC-GO para observar a estabilidade desta matriz (Fig. 1 (d)). Com isso, foram obtidos os coeficientes de variação



relativos aos picos catódico e anódico, com valores de 3% e 2% respectivamente. Foi calculado ainda o desvio padrão de ambos os picos, obtendo-se 0,059 para o pico catódico e 0,068 para o pico anódico. Estes resultados demonstram a estabilidade da matriz, observando-se que o coeficiente de variação é aceitável até o valor de 10% (SILVA et al., 2014).

#### 4. CONCLUSÃO

A plataforma elaborada mostrou-se estável quando utilizada sem sonda redox, tornando-a ideal para a imobilização do anti-cistatina C, e possivelmente permitindo leituras diretamente no sangue do cordão umbilical de neonatos. Isto pode permitir a avaliação rápida e confiável da função renal imediatamente após o nascimento, reduzindo o tempo para início do tratamento e os consequentes danos que a demora pode causar.

#### 5. REFERÊNCIAS

- CHOI, Y. H. et al. Ultrasonography of the hydronephrosis in newborn: a practical review. *Ultrasonography*, v. 35, n. July, p. 198–211, 2016.
- RODRIGUEZ, B. A. G. et al. Nanomaterials for Advancing the Health Immunosensor. In: *Biosensors - Micro and Nanoscale Applications*. [s.l: s.n.]. p. 347–374.
- SHLIPAK, M. G. et al. Cystatin C versus creatinine in determining risk based on kidney function. *The New England journal of medicine*, v. 369, n. 10, p. 932–43, 2013.
- SHLIPAK, M. G.; MATTES, M. D.; PERALTA, C. A. Update on cystatin C: Incorporation into clinical practice. *American Journal of Kidney Diseases*, v. 62, n. 3, p. 595–603, 2013.
- SILVA, M. M. S. et al. A thiophene-modified screen printed electrode for detection of dengue virus NS1 protein. *Talanta*, v. 128, p. 505–510, 2014.
- VEMULAKONDA, V.; YIEE, J.; WILCOX, D. T. Prenatal hydronephrosis: Postnatal evaluation and management. *Current Urology Reports*, v. 15, n. 8, p. 1–7, 2014.
- ZRIBI, B. et al. A microfluidic electrochemical biosensor based on multiwall carbon nanotube/ferrocene for genomic DNA detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical isolates. *Biomicrofluidics*, v. 10, n. 1, p. 14115, jan. 2016.

#### 6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FACEPE e ao CNPq, que são os órgãos de fomento responsáveis pelo desenvolvimento deste trabalho.



ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOTECNOLOGIA E NANOTECNOLOGIA EM SAÚDE – BN 7

## DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO* DE NANOPARTÍCULAS DE PLA CONTENDO METOTREXATO

D.L. SOUSA<sup>1</sup>, L.C.S.T. PESSOA<sup>1</sup>, I.R. BARBOZA<sup>1</sup>, E.S. SILVA<sup>1</sup>, R.C. FEITOSA<sup>1</sup>, L.B. CALAND<sup>1</sup>, H. A. O. ROCHA<sup>2</sup>, A.A. da SILVA Jr<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Farmácia.

<sup>2</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica – PPgDBq

E-mail para contato: deiselidiane1@hotmail.com

*RESUMO - Metotrexato (MTX) é um fármaco antimetabólito usado na quimioterapia do câncer e em doenças autoimunes, porém seu uso é limitado devido as suas propriedades farmacocinéticas como tempo de meia-vida curto e não especificidade de ação. As nanopartículas (NP) possibilitam a passagem do fármaco através de barreiras biológicas, além de fornecer uma maior especificidade pelo no sítio alvo de ação. Este estudo teve como objetivo a obtenção e caracterização de NP catiônicas de poli (ácido láctico) (PLA) contendo MTX, para aumentar a eficácia antiproliferativa do fármaco nas células tumorais e diminuir a citotoxicidade em células normais. Após a otimização do método de obtenção das NP, o MTX foi incorporado, obtendo-se eficiência de incorporação de 83,89% ± 3,56. As NP contendo MTX apresentaram tamanho de 260 nm e potencial zeta de + 34 mV. Estudos preliminares realizados em linhagens de células normais e tumorais demonstraram um aumento da eficácia antitumoral do MTX encapsulado em NP.*

*Palavras-chave: Funcionalização; catiônica; atividade antiproliferativa.*

*ABSTRACT - Methotrexate (MTX) is an antimetabolite drug used in the chemotherapy of cancer and on autoimmune diseases. Its use is limited due to its pharmacokinetic properties as short half-life time and unspecific action. Nanoparticles (NP) can offer possibilities to across biological barriers and to target specific sites. This study aimed the obtainment and characterization of cationic poly (lactic acid) (PLA) NP and evaluation of MTX to improve its antiproliferative efficacy in tumor cells. MTX Drug loading study was performed, and the incorporation efficiency obtained was 83,89% ± 3,56. MTX-loaded nanoparticles exhibited size of 260 nm, zeta potential of +34 mV. The antiproliferative assays showed an increased antiproliferative effect to the functionalized NP MTX loaded, when compared to isolated MTX.*



*Keywords: Functionalization; cationic; antiproliferative activity.*

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer é a segunda causa de morte no mundo, superada apenas pelas doenças cardiovasculares (HERRERO et al, 2015). A terapia tradicional do câncer apresenta limitações devido aos efeitos secundários indesejáveis associados com os fármacos devido a não especificidade destes para o tecido neoplásico (WICKI et al, 2015). A nanotecnologia tem sido abordada como alternativa para superar as limitações da terapia tradicional. As nanopartículas (NP) possibilitam a liberação de fármacos e biomoléculas para o local desejado, superando as limitações de barreiras de membrana (SIEGAL, 2013). Alguns parâmetros como tamanho da partícula, forma e carga de superfície desempenham um papel essencial na interação entre a partícula e membranas biológicas e, consequente, internalização celular. Com o objetivo de aumentar a captação celular, foi realizada a funcionalização para tornar a superfície das nanopartículas positiva, para isso, foi utilizada a Polietilenoimina (PEI), essa funcionalização pode ser utilizada como ferramenta para o aumento da eficácia de fármacos quimioterápicos como o metotrexato (HUANG et al., 2010). Neste contexto, o objetivo deste trabalho consiste na obtenção e caracterização de nanopartículas catiônicas de PLA, para incorporação do metotrexato, com a finalidade de aumentar a eficácia antiproliferativa do MTX em células tumorais, bem como reduzir a citotoxicidade em células normais.

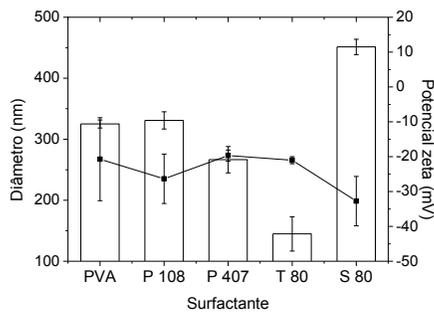
## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

A obtenção das nanopartículas ocorreu através da técnica de emulsificação com evaporação do solvente. O tipo e concentração dos surfactantes foram estudados, sendo os surfactantes não-poliméricos testados na faixa de 0,1 a 0,5% p/v, enquanto os surfactantes poliméricos foram testados no intervalo de 0,25 – 2.0% w/v. A formulação capaz de induzir a formação de partículas menores foi selecionada para a funcionalização catiônica com PEI. A atividade antiproliferativa das nanopartículas foi avaliada pelo ensaio colorimétrico do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenil tetrazolium bromide) (MOSMANN, 1983), sendo utilizadas duas linhagens celulares, a HEK-2937 (células renais não tumorais) e a 786-0 (células de adenocarcinoma renal).

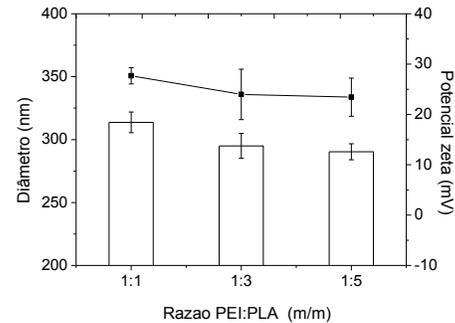
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o objetivo de observar o efeito da natureza do surfactante bem como do aumento de sua concentração, estudos com diferentes surfactantes foram conduzidos. O menor diâmetro médio foi obtido com o Tween 80 (fig. 1), porém devido a ocorrência de incompatibilidade entre polietilenoimina e polissorbatos, optou-se por prosseguir os estudos com o Polaxâmero 407

(266,49 nm), o qual permitiu o segundo menor tamanho de partícula entre os surfactantes estudados.

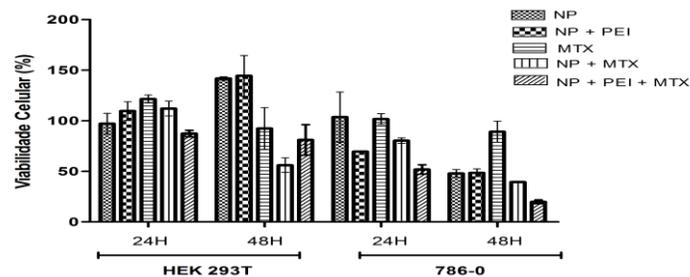


**Figura 1.** Efeito do tipo de surfactante no diâmetro e potencial zeta das partículas.



**Figura 2.** Efeito da funcionalização com PEI no diâmetro e potencial zeta das partículas.

A funcionalização catiônica das nanopartículas foi realizada, utilizando diferentes razões PEI:PLA 1:1, 1:3 e 1:5 (Fig. 2), foi observado a mudança do potencial zeta negativo ( $-34.56 \pm 8.56$  mV) para positivo em todas as concentrações de PEI testadas. A razão PEI:PLA de 1:5 selecionada para os estudos posteriores.



**Figura 3.** Viabilidade celular (%) em 24 e 48 horas de nanopartículas sem PEI (NP), nanopartículas com PEI (NP+P), fármaco livre (MTX), nanopartículas com MTX (NP+MTX) e nanopartículas com PEI e MTX (NP+PEI+MTX) em linhagens de células normais (HEK 293T) e tumorais (786-0) de rim.

Como pode ser observado na fig.3, através de ensaios preliminares de MTT realizados nas linhagens celulares normal e tumoral de rim, foi possível observar que em 24 horas com todos os sistemas testados ocorre pouca variação na viabilidade celular em ambas as células. Porém em 48 horas pode ser visualizado que o efeito do fármaco livre (MTX), ou seja, não encapsulado é semelhante para os dois tipos celulares, enquanto que o efeito do fármaco encapsulado em nanopartículas é maior, principalmente na linhagem 786-0. A maior interação do MTX encapsulado nas NP com as células tumorais pode ser explicada devido às alterações que ocorrem na fisiologia dessas células, sendo uma dessas modificações o aumento dos receptores de folato em alguns tipos de tumores, como o de rim (ASSARAF et al., 2014). Como o MTX é um fármaco antimetabólito



estruturalmente semelhante ao ácido fólico, um aumento na quantidade desses receptores possibilita uma maior interação do MTX nas células tumorais. Observou-se ainda que houve maior atividade antiproliferativa no sistema contendo nanopartículas funcionalizadas (NP+PEI+MTX) quando comparado ao sistema não funcionalizado, o que contribui para a hipótese de que a funcionalização catiônica aumenta a internalização das partículas por parte das células tumorais (GONG; NGAI, 2013).

#### 4. CONCLUSÃO

Nanopartículas de PLA-PEI contendo Metotrexato foram otimizadas e demonstraram ser capazes de melhorar a eficácia do fármaco em células tumorais em ensaios preliminares em culturas de células.

#### 5. REFERÊNCIAS

ASSARAF, Y.G. et al. The folate receptor as a rational therapeutic target for personalized cancer treatment. **Drug Resistance Updates**, v. 17, p. 89–95, 2014.

GONG, X.; NGAI, T. Interactions between solid surfaces with preadsorbed poly (ethylenimine) layers: effect of unadsorbed free PEI chains. **Langmuir**, v. 29, n. 20, p. 5974–5981, 2013.

HERRERO, et al. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. **European Journal of Pharmaceutics**, v. 93, p. 52–79, 2015.

HUANG, H. et al. Low molecular weight polyethylenimine cross-linked by 2-hydroxypropyl- $\gamma$ -cyclodextrin coupled to peptide targeting HER2 as a gene delivery vector. **Biomaterials**, v. 31, n. 7, p. 1830-1838, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

SIEGAL, T. Which drug or drug delivery system can change clinical practice for brain tumor therapy? **Neuro-Oncology**, v.15, 2013.

WICKI, A. et al., Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 200, p. 138–157, 2015.

#### 6. AGRADECIMENTOS

Ao suporte financeiro oferecido pela CAPES, e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas / UFRN.



ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOTECNOLOGIA E NANOTECNOLOGIA EM SAÚDE – BN 8

## ESTUDO DA SOBREVIDA DE CAMUNDONGOS SWISS COM SARCOMA-180, TRATADOS COM LIPOSSOMAS FURTIVOS CONTENDO ÁCIDO BARBÁTICO DE *Cladonia Salmannii* (Líquén)

C. A. TAVARES<sup>1</sup>; S. M. de F. R. dos S. MEDEIROS<sup>1</sup>; R. G. da SILVA<sup>1</sup>; M. M. da SILVA<sup>1</sup>; J. O. COSTA<sup>1</sup>; T. A. CAMPOS<sup>1</sup>; N. P. da S. SANTOS<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Nanotecnologia, Biotecnologia e Cultura de Células - Centro Acadêmico de Vitória CAV/UFPE.

E-mail: cybelletalves@gmail.com

**RESUMO** – *O ácido barbático (AB) é um metabólito liquênico que apresenta diversas atividades biológicas. Lipossomas furtivos são vesículas lipídicas que direcionam e controlam a liberação de fármacos. Esses carreadores são de fácil obtenção, biocompatíveis, além de encapsular fármacos hidrofílicos e lipofílicos e também são utilizados pela possibilidade de modificar suas superfícies para aumento de sua especificidade. O objetivo desse trabalho foi avaliar a sobrevida de camundongos com câncer, após o tratamento com lipossomas furtivos contendo do ácido barbático. Material e Métodos: Lipossomas foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico. Camundongos Swiss, machos, após a inoculação do tumor, foram tratados com uma dose de 20 mg/kg/dia durante 8 dias, por via intraperitoneal. O comportamento dos animais foi monitorado durante e após o tratamento e o tempo de sobrevivência registrado. Resultados e discussão: Lipossomas furtivos contendo ácido barbático foram obtidos com diâmetro médio de 109.3±2.82 nm. Dentre os animais tratados com AB-LF, 20% sobreviveram até o décimo sétimo dia e 10% conseguiram resistir até o 20º dia. Enquanto que o grupo de animais tratados com AB em suspensão atingiu 100% de mortalidade no 15º após a inoculação do tumor. Conclusão: O uso de lipossomas furtivos aumentou o tempo de sobrevivência destes animais quando comparado ao grupo de animais tratados com ácido barbático em suspensão.*

*Palavras chave: lipossomas furtivos; antitumoral; sobrevida, ácidos liquênico*

**ABSTRACT** - *barbático acid (AB) is a lichen metabolite that has several biological activities. Stealth liposomes are lipid vesicles that directs and controls the release of*



*drugs. These vesicles are easy to obtain, biocompatible, and encapsulate hydrophilic and lipophilic drugs and are also used by the possibility of modifying their surfaces to increase its specificity. The aim of this study was to evaluate the survival of mice with cancer after treatment with stealth liposomes containing the acid barbático. Materials and Methods: Liposomes were prepared by lipid film hydration method. Male Swiss mice after tumor inoculation, were treated with a dose of 20 mg / kg / day for 8 days intraperitoneally. The behavior of the animals was monitored during and after treatment and recorded the time of survival. Results and discussion: Stealth liposomes containing barbatic acid were obtained with an average diameter of  $109.3 \pm 2.82$  nm. Among the animals treated with AB-LF, 20% survived until the seventeenth day and 10% were able to hold out until the 20th day. While the group of animals treated with AB suspension reached 100% mortality after 15 after tumor inoculation. Conclusion: The use of stealth liposomes increased the survival time of the animals when compared to the group of animals treated with barbático acid in suspension.*

*Keywords: liposomes stealthy; antitumor; survival, lichen acid*

## 1. INTRODUÇÃO

O ácido barbático (AB), um dos principais metabólitos de *Cladonia salzmannii* (líquen), possui atividades descritas na literatura, tais como: antimicrobiana, inibidor da cadeia transportadora de elétrons, inibidor da síntese de leucotrieno B<sub>4</sub>(LTB<sub>4</sub>) e citotóxica frente a diferentes linhagens cancerígenas. Entretanto, existe uma limitação para o uso de alguns metabólitos secundários como protótipo para novas moléculas bioativas, devido principalmente a sua baixa hidrossolubilidade e seus efeitos tóxicos (Edwardes *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2010).

Pesquisas têm buscado continuamente superar esses problemas através do desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos. Os lipossomas representam uma abordagem avançada nesse contexto. Grande parte do interesse em explorar esses carreadores é devido às vantagens como a facilidade de obtenção, o seu tamanho e biocompatibilidade, a capacidade de encapsular fármacos hidrofílicos e lipofílicos e ainda pela possibilidade de modificar suas superfícies (Santos *et al.*, 2006).

Polímeros, tais como polietileno glicol (PEG) podem ser inseridos na bicamada lipídica, formando assim lipossomas furtivos, que demoram a ser reconhecidos pelo sistema imune, prolongando a circulação sanguínea desses sistemas peguilados, o que pode melhorar a eficácia terapêutica de muitas moléculas (Gabizon *et al.*, 2012). Diante do exposto o objetivo deste trabalho foi realizar um estudo de sobrevivência de camundongos Swiss portadores do tumor Sarcoma-180, tratados com ácido barbático livre e encapsulado em lipossomas furtivos (AB-LF).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Camundongos Swiss, machos, (35-45)g de peso corporal, 50-60 dias de idade, foram divididos aleatoriamente em três grupos com 10 animais cada. Uma suspensão de células Sarcoma 180 ( $5 \times 10^6$  células/ml/animal) foi inoculado via subcutânea na região axilar direita dos animais. Vinte e quatro horas após a inoculação do tumor, os animais receberam intraperitonealmente injeções diárias de AB

em suspensão ou lipossomas furtivos de ácido barbático a uma dose 20 mg/kg/dia durante 8 dias (Santos *et al.*, 2006). O grupo controle recebeu solução salina. A suspensão do AB foi preparada em solução estéril de NaCl a 0,9% contendo *Tween* 80 a 0,05% (v/v). Os lipossomas furtivos foram preparados pela técnica de hidratação do filme lipídico. O comportamento dos animais foi monitorado durante e após o tratamento e o tempo de sobrevivência registrado. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética, Processo nº 23076. 050904/2011-69.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Vesículas unilamelares pequenas (SUV) foram obtidas, a taxa de encapsulação do AB foi  $95,15 \pm 5,34\%$ . O diâmetro médio e o índice de polidispersão das vesículas foram  $109.3 \pm 2.82\text{nm}$  (0.307). A análise de sobrevivência dos camundongos com Sarcoma 180 revelou que o comportamento e os achados clínicos foram preservados na primeira semana de tratamento, tanto no grupo controle quanto nos grupos tratados com AB e AB-LF. A partir da segunda semana, os animais apresentaram pelos eriçados, redução dos reflexos, perda de peso e taquicardia e morte consequentemente.

Cinquenta por cento dos animais tratados com AB livre e 50% dos animais tratados com o AB-LF morreram no décimo primeiro dia após a inoculação do tumor. Contudo, 20% dos animais tratados com AB-LF sobreviveram até o décimo sétimo dia e 10% conseguiram resistir até 20º dia. O grupo de animais tratados com AB em suspensão atingiu 100% de mortalidade no 15º após a inoculação do tumor. No grupo controle, a taxa de mortalidade situou-se em 50%, 12 após a inoculação do tumor, atingindo 100% em 16 dias (Figura 1).

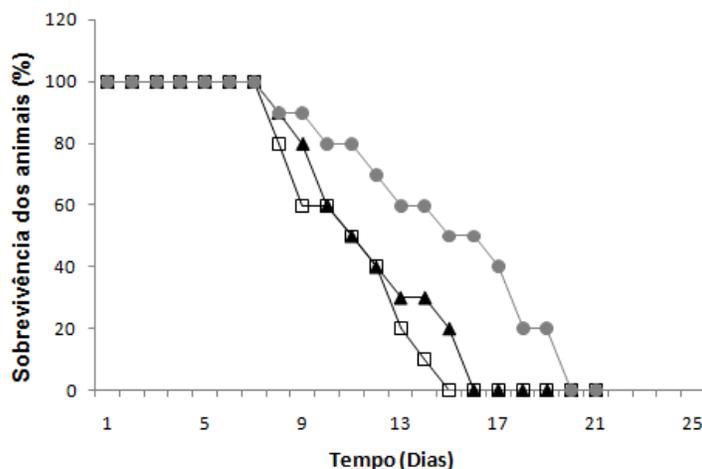


Figura 1. Avaliação da sobrevivência de camundongos Swiss implantado com células do tumor ascítico sarcoma-180 ( $5 \times 10^6$  cels/mL). Legenda: ▲ (Controle- Solução salina), □ (ácido barbático), ● (Lipossomas Furtivos contendo ácido barbático).

Estes resultados demonstram que os lipossomas apresentaram uma boa eficiência de encapsulação, sugerindo que tanto as proporções dos constituintes lipídicos quanto do polímero foram eficientes. Além disso, o tamanho dos lipossomas ( $109.3 \pm 2.82\text{nm}$ ) apresentou-se ideal para administração parenteral. A formulação apresentou-se estável, sem alterações significativas de pH, tamanho de partícula e aspecto macroscópico.



De fato, a encapsulação do AB, em lipossomas furtivos, promoveu um aumento de 31,25% no tempo de sobrevivência dos animais com tumor, comparado ao grupo tratado com a suspensão de AB. Esse aumento de sobrevida pode ser pelo tempo de circulação do metabólito, uma vez que os sistemas furtivos demoram mais na circulação sistêmica por demorarem mais a serem reconhecidos pelos macrófagos do fagocitário mononuclear. Outra justificativa plausível seria o fato de que a encapsulação, além de aperfeiçoar as propriedades farmacológicas da molécula, reduz sua toxicidade para outros órgãos, contribuindo assim para aumentar o tempo de sobrevivência do animal que está sendo submetido ao tratamento antitumoral.

#### 4. CONCLUSÃO

Além de aperfeiçoar a ação antitumoral do ácido barbático, o encapsulamento do referido composto também aumentou o tempo de sobrevivência dos animais quando comparado ao tratado com AB em suspensão, cujo tempo de sobrevivência foi ligeiramente inferior ou grupo controle. Isso sugere que a encapsulação em lipossomas furtivos promoveu uma redução da toxicidade extra-tumoral do ácido barbático.

#### 5. REFERÊNCIAS

- EG, H.; NM, E.; W-WD, D. Molecular Structural Studies of Lichen Substances II: Atranorin, Gyrophoric Acid, Fumarprotocetraric Acid, Rhizocarpic Acid, Calycin, Pulvinic Dilactone and Usnic Acid. *Journal of Molecular Structure*, Villeneuve d'Ascq, v. 651–653, p. 27–37, 2003.
- G, A.; A, Y.; T, D.; G, J.; S, H.; Z, S. Therapeutic efficacy of a lipid-based prodrug of mitomycin C in pegylated liposomes: Studies with human gastro-entero-pancreatic ectopic tumor models. *Journal of Controlled Release*, v. 160, n. 2, p. 245–253, 2012.
- MBM, C.; LJG, M.; SP, F.; SH, N.; PC, E. *Cladia aggregata* (lichen) from Brazilian Northeast: Chemical Characterization and Antimicrobial Activity. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, v. 53, n.1, p. 115-122, 2010.
- SPS, N.; NC, S.; WSO, M.; P-FT, N.; SF, J.; CMMB, C.; PC, E.; SH, N.; HK, N.; S-MS, N. Nanoencapsulation of usnic acid: Na attempt to improve antitumour activity and reduce hepatotoxicity. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* v. 64, p. 154-160, 2006.

#### 6. AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco – FACEPE



ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOTECNOLOGIA E NANOTECNOLOGIA EM SAÚDE – BN 9

## NANOPARTÍCULAS DE PLGA FUNCIONALIZADAS PARA LIBERAÇÃO MODIFICADA DE DOXORRUBICINA E ESTUDO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO*

I. R. BARBOZA<sup>1</sup>, R. C. FEITOSA<sup>2</sup>, D. L. SOUSA<sup>1</sup>, E. S. SILVA<sup>1</sup>, H. A. O. ROCHA<sup>3</sup>, R. G. PECCININI<sup>4</sup>, A. A. SILVA-JÚNIOR<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – PPgCF.

<sup>2</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia.

<sup>3</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica – PPgDBq.

<sup>4</sup> Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

E-mail para contato: [iaponirabarboza@outlook.com.br](mailto:iaponirabarboza@outlook.com.br)

*RESUMO* – Nanopartículas biodegradáveis (NP) podem oferecer a possibilidade de atravessar barreiras biológicas com maior facilidade e, conseqüentemente, direcionar fármacos e biomoléculas para locais específicos. Tal característica é vantajosa especialmente no que diz respeito ao tratamento de tumores na terapia do câncer. O objetivo deste estudo foi obter NPs de poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) com superfície positivamente carregada e tamanho inferior a 100 nm. Após a otimização do processo de obtenção de NPs, a doxorubicina (DOX), um antineoplásico amplamente utilizado contra uma gama de tumores sólidos, foi encapsulada, e uma eficiência de encapsulação de 50% foi alcançada. A encapsulação do fármaco em NPs foi capaz de prolongar sua liberação, como demonstrado pelo estudo de liberação *in vitro*. Estudos preliminares realizados em linhagens de células normais e tumorais demonstraram um aumento da eficácia do fármaco encapsulado em NPs, ao mesmo tempo em que houve diminuição de sua toxicidade em células normais.

*Palavras-chave:* internalização celular, funcionalização, target, sistemas de liberação

*ABSTRACT* - Biodegradable nanoparticles (NP) may offer possibilities to overcome biological barriers and to target specific sites, especially with respect to treatment tumors



*and cancer therapy. The aim of this study was to obtain poly (lactic acid-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles with surface positively charged with 100 nm undersized. After optimization process of obtaining NPs doxorubicin (DOX), a highly potent antineoplastic used against a wide spectrum of solid tumors, was encapsulated, and 50% encapsulation efficiency was achieved. Encapsulation within NPs was able to extend drug release, as demonstrated by the in vitro release study. Preliminary studies in normal and tumor cells showed an increase in drug efficacy after encapsulated NPs in tumor cells while that decreased toxicity in normal cells.*

*Keywords: cellular uptake, functionalization, target, drug delivery*

## 1. INTRODUÇÃO

Nanopartículas poliméricas têm a capacidade de proporcionar vantagens a diversas moléculas de uso terapêutico, melhorando a sua eficácia e reduzindo seus efeitos colaterais. Sobretudo pela sua capacidade em atravessar barreiras biológicas e direcionar essas moléculas para locais específicos. Parâmetros tais como tamanho da partícula, forma, e, especialmente, sua carga e composição química de superfície desempenham um papel essencial na interação entre a partícula e membranas biológicas e, conseqüente, internalização celular (FOREST; COTTIER; POURCHEZ, 2015). Esse efeito pode se constituir em uma ferramenta para o aumento da eficácia de fármacos quimioterápicos como a Doxorubicina. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo obter nanopartículas de PLGA com a superfície positivamente carregada e testar sua capacidade em melhorar a eficácia da Doxorubicina.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

As nanopartículas de PLGA foram obtidas pela técnica de nanoprecipitação. Com o objetivo de encontrar a melhor formulação com condições satisfatórias de tamanho de partícula e estabilidade para a etapa de funcionalização. Uma vez encontrada a melhor formulação, através de um estudo de otimização com diferentes surfactantes (Tween 80, Tween 85, Span 80, álcool polivinílico (PVA), Poloxamer 188 e Poloxamer 407), foi realizado um estudo de funcionalização com carga positiva, para esta finalidade foi utilizada uma polietilenoimina (PEI) de alto peso molecular (25kDa) em diferentes razões PEI:PLGA. Após o processo de otimização da produção de NPs com carga positiva foi feito um estudo de *drug loading* utilizando uma razão de 1:10 fármaco:polímero com a Doxorubicina onde foi obtida uma eficiência de encapsulação de 50%, determinada por um método indireto através de filtração/centrifugação de alíquotas em eppendorf com *cut-off* de 10kDa, sendo o fármaco livre quantificado espectrofotometricamente no UV-Visível a 500 nm. Um estudo de liberação do fármaco foi realizado utilizando um dispositivo do tipo células de Franz. Estudos preliminares de viabilidade celular foram realizados através do ensaio de MTT em células tumorais (786-0) e normais (HEK-2937) de rim, com o objetivo de avaliar o aumento da eficácia da DOX em células tumorais e diminuição da toxicidade em células normais.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o estudo de otimização utilizando diferentes tipos de surfactantes, a formulação que apresentou as melhores condições de obtenção foi o sistema contendo Poloxamer 188 como surfactante na concentração de 1% (p/v), tendo sido portanto o sistema de escolha para o teste de funcionalização com carga positiva utilizando PEI. Após testar diferentes razões PEI:PLGA, a razão de 1:5 foi escolhida para dar continuidade aos estudos. Esta formulação apresentava tamanho de partícula de  $159,25 \text{ nm} \pm 2,34$  e potencial zeta de  $-10,81 \text{ mV} \pm 2,63$  e após funcionalização na razão 1:5 PLGA:PEI houve uma diminuição do tamanho para  $82,22 \text{ nm} \pm 5,96$  e aumento do potencial zeta para  $0,00 \text{ mV}$ . A alteração de propriedades bem como tamanho de partícula e principalmente a mudança de potencial zeta de negativo para neutro demonstram a eficiente incorporação da polietilenoimina, tendo sido, por isto, alcançado o objetivo de funcionalizar as partículas como demonstrado por Chatterjee *et al* (CHATTERJEE *et al.*, 2014). Após a obtenção de nanopartículas PLGA-PEI procedeu-se com o estudo de incorporação do fármaco utilizando a Doxorubicina como fármaco quimioterápico modelo. Foi obtida uma eficiência de incorporação de 50% utilizando uma razão fármaco:polímero de 1:10, a qual foi considerada satisfatória de acordo com dados da literatura. O ensaio utilizando dispositivo de células de Franz foi realizado com o objetivo de investigar o mecanismo envolvido na liberação da DOX a partir de nanopartículas de PLGA-PEI. Após ajuste para modelos cinéticos, o modelo que melhor se aplicou ao perfil apresentado foi o modelo parabólico de difusão, como pode ser observado na figura 1A. Ocorre um *burst effect* motivado pelo fármaco que não está encapsulado, mas adsorvido à superfície do sistema matricial ou por alterações que se verificam na estrutura do sistema com consequente liberação imediata do fármaco seguido de uma fase mais lenta.

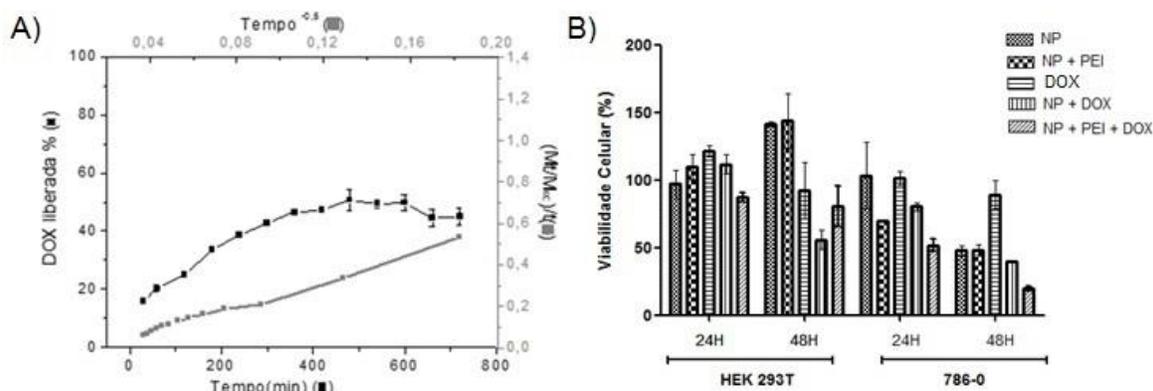


Figura 1 – A) Perfil de liberação *in vitro* de Doxorubicina a partir de nanopartículas de PLGA-PEI (■) e modelo parabólico de difusão (□)  $(M_t/M_\infty)/t = K_p T^{-0,5} + b$  aplicado ao mesmo sistema. B) Viabilidade celular (%) em 24 e 48 horas de nanopartículas sem PEI (NP), nanopartículas com PEI (NP+PEI), fármaco livre (DOX), nanopartículas com DOX (NP+DOX) e nanopartículas com PEI e DOX (NP+PEI+DOX) em linhagens de células normais (HEK 2937) e tumorais (786-0) de rim.

Conforme demonstrado na figura 1B, através de ensaios preliminares de MTT realizado com dois tipos de linhagens celular de rim, sendo uma normal (HEK 2937) e outra tumoral (786-0) foi



possível observar que, em 24 horas pouco efeito sobre a viabilidade celular de ambas as células é observado. Porém em 48 horas é mais evidente que o efeito do fármaco livre (DOX), ou seja, não encapsulado é semelhante para os dois tipos celulares, enquanto que o efeito do fármaco encapsulado em nanopartículas é discretamente menor em células normais (HEK 2937) e maior em células tumorais (786-0). Sobre a toxicidade observada em células tumorais ainda é possível observar que ocorre maior morte celular no sistema contendo nanopartículas com superfície carregada (NP+PEI+DOX) quando comparado ao sistema não funcionalizado, o que corrobora com a hipótese de que a funcionalização com carga positiva aumenta a internalização das partículas por parte das células tumorais (GONG; NGAI, 2013; SHI et al., 2014).

#### 4. CONCLUSÃO

Nanopartículas de PLGA-PEI contendo Doxorubicina foram obtidas e se demonstraram capazes de prolongar o tempo de liberação do fármaco e, em ensaios preliminares em culturas de células, melhorar a eficácia do fármaco em células tumorais e diminuir a toxicidade em células normais.

#### 5. REFERÊNCIAS

CHATTERJEE, K; SARKAR, S; JAGAJANANI RAO, K; PARIA, S. Core/shell nanoparticles in biomedical applications. *Adv Colloid Interface Sci*, v. 209, p. 8–39, 2014.

FOREST, V.; COTTIER, M.; POURCHEZ, J. Electrostatic interactions favor the binding of positive nanoparticles on cells : A reductive theory. *Nano Today*, v. 10, n. 6, p. 677–680, 2015.

GONG, X.; NGAI, T. Interactions between solid surfaces with preadsorbed poly(ethylenimine) (PEI) layers: effect of unadsorbed free PEI chains. *Langmuir*, v. 29, n. 20, p. 5974–5981, 2013.

SHI, X; LI, C; GAO, S; ZHANG, L; HAN, H; ZHANG, J; SHI, W; LI, Q. Combination of doxorubicin-based chemotherapy and polyethylenimine/p53 gene therapy for the treatment of lung cancer using porous PLGA microparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*, v. 122, p. 498–504, 2014.

#### 6. AGRADECIMENTOS

Aos autores e suporte financeiro oferecido pela CAPES, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas /UFRN.

ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOTECNOLOGIA E NANOTECNOLOGIA EM SAÚDE – BN 11

## NANOPARTÍCULAS DE PLGA FUNCIONALIZADAS PARA ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS DE CARÁTER ANIÔNICO

E. S. SILVA<sup>1</sup>, R. C. FEITOSA<sup>2</sup>, I. R. BARBOZA<sup>1</sup>, D. L. SOUSA<sup>1</sup>, M. F. FERNANDES-PEDROSA<sup>1,2</sup>, A. A. SILVA-JÚNIOR<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – PPgCF.

<sup>2</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia.

E-mail para contato: emanuell\_111@hotmail.com

*RESUMO – Nanopartículas de poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) são carreadores de substâncias que tem se mostrado promissor para o delineamento de sistemas de liberação modificada de fármacos e biomoléculas. O objetivo deste estudo foi obter nanopartículas de PLGA com superfície positivamente carregada e tamanho inferior a 200 nm a partir da técnica de nanoprecipitação. Durante a otimização utilizou-se poloxâmero 407 como surfactante para estabilizar as nanopartículas e polietilenimina como agente catiônico funcionalizante. Esta etapa foi capaz de obter nanopartículas com tamanho inferior a 150 nm e potencial zeta em torno de +40 mV. A proteína modelo utilizada para incorporação no sistema foi a albumina sérica bovina em solução tampão com pH 5,5. Após o período de adsorção da proteína, a quantificação foi obtida de forma indireta e os sistemas de nanopartículas apresentaram eficiência de adsorção superior a 95%.*

*Palavras-chaves: Funcionalização; albumina; sistema de liberação modificado.*

*ABSTRACT – Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles are carriers that have shown promise delivery system for drugs and biomolecules. The aim of this study was to obtain PLGA nanoparticles with positively charged surface and small size less than 200 nm for nanoprecipitation technique. During the optimization, poloxamer 407 was used as surfactant to stabilize the nanoparticles and polyethylenimine as a cationic functionalizing agent. This step was able to obtain nanoparticles with size below 150 nm and zeta potential about +40 mV. The model protein used for incorporation in the system was bovine serum albumin (BSA) in phosphate buffered saline pH 5.5. After the adsorption period, the protein quantification was indirectly obtained and nanoparticle systems showed higher adsorption*



*efficiency of 95%.*

*Keywords: functionalization; albumin; Modified release system.*

## 1. INTRODUÇÃO

O avanço no estudo de nanopartículas (NPs) a partir de biomateriais têm mostrado compatibilidade e biodegradabilidade de alguns polímeros utilizados em dispersões coloidais para vetorização, liberação sítio-específica, aumento da estabilidade, solubilidade e permeabilidade de moléculas bioativas em barreiras biológicas (Beck-Broichsitter et al., 2010). As nanopartículas possuem capacidade de ter sua superfície funcionalizada adicionando carga positiva promovendo a partícula um comportamento de sistemas furtivos e apresentarem fácil internalização celular por endocitose (Wu et al., 2012). A albumina sérica é a proteína mais abundante no sangue e possui importante papel fisiológico. A albumina sérica bovina (BSA) é homóloga e possui estrutura tridimensional semelhante a albumina sérica humana. Considerando essa relevância biológica, a BSA é constantemente utilizada como proteína modelo na interação de biomoléculas em sistemas de liberação modificada (Hao et al., 2016). Este estudo teve como objetivo preparar nanopartículas catiônicas por nanoprecipitação para adsorção de albumina.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

As NPs de PLGA foram obtidas pela técnica de nanoprecipitação. Nesse método, uma fase orgânica, contendo o polímero e o agente funcionalizante dispersos em acetona, é adicionada a uma fase aquosa contendo surfactante. Para otimizar a obtenção dessas NPs, foi necessário encontrar a melhor formulação com condições satisfatórias de tamanho de partícula e estabilidade para a etapa de funcionalização. A concentração do polímero foi variada entre 0,25-1,25% (p/v) e foi utilizado poloxâmero 407 como surfactante, também em diferentes concentrações variando de 0,25-2,00% (p/v). Para realizar a funcionalização catiônica das NPs foi utilizada uma polietilenimina (PEI) de alto peso molecular (25kDa) em diferentes razões PEI:PLGA. Após o processo de otimização da produção de NPs com carga positiva foi feita a eficiência de adsorção da albumina adicionando 0,5 e 1,0% (p/v), em relação a massa do polímero, de uma solução da proteína a 1 mg/ml. A eficiência de adsorção (EA) foi verificada através da BSA quantificada após centrifugação dos sistemas a 16.900g a 4°C por 30 minutos. Em seguida sobrenadante foi removido e submetido a análise de proteínas usando o Kit de Ensaio de Proteína BCA através do método ácido bicinronínico. Todos os sistemas tiveram tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta verificados através da técnica de espalhamento de luz dinâmica (DLS).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a obtenção das NPs, foi necessário verificar a influência das concentrações de polímero e surfactantes utilizadas na formulação. O tamanho de partícula em função da variação da concentração de polímero, fixando a concentração de poloxâmero 407 em 0,25%, ficou em uma faixa de 130-190 nm. O tamanho das partículas aumenta proporcionalmente ao aumento da concentração do polímero. Esse efeito é atribuído ao aumento da viscosidade da fase orgânica onde a resistência na transferência de massa leva a difusão lenta do solvente na fase aquosa e consequentemente a formação de gotas maiores durante a adição da fase (de Oliveira et al., 2013). A concentração de 0,75% de polímero foi escolhida para ser fixada durante a variação do surfactante. Durante o efeito no tamanho da partícula, com a variação das concentrações do surfactante, é possível observar um aumento linear do diâmetro da partícula e pode ser explicado devido ao acúmulo de moléculas de poloxâmero ao redor da partícula nas primeiras etapas do processo de nucleação. A formulação com melhores parâmetros foi a que a concentração de polímero foi de 0,75% e 0,5% de poloxâmero 407 que foram capazes de obter um sistema com diâmetro de 99nm. A etapa seguinte consistiu na funcionalização, atribuindo carga positiva a superfície das NPs. O agente funcionalizante, polietilenimina (PEI), foi adicionada a fase orgânica em razões crescentes da massa do polímero. O efeito da PEI no tamanho da partícula é indicado através de um discreto aumento das NPs, uma vez que a PEI utilizada possui alto peso molecular agregando maior massa polimérica na nucleação das NPs. A medida que a razão aumenta, o potencial zeta aumenta proporcionalmente, indo de 0-48 mV. Uma vez que a PEI participa da nucleação das NPs, as aminas livres desse composto promovem um *self-assembled* da superfície deixando-a catiônica (Shabanian et al., 2015). A razão de PEI:PLGA 1:5 foi utilizada para a etapa de incorporação da albumina no sistema. Para a adsorção da proteína na superfície das NPs, foi necessário diluir a suspensão coloidal preparada em razões de 1:2 e 1:4 (NPs:Água) utilizando água ultrapura. As concentrações utilizadas da solução de BSA a 1 mg/mL foram de 0,5% (p/v) e 1,0% (p/v) em relação a massa do polímero. A solução de proteína foi titulada nas suspensões coloidais sob agitação magnética de 700 rpm no período de 5 horas a 20°C.

Tabela 1 – Caracterização físico-químicas de NPs catiônicas com adsorção de BSA.

Suspensões coloidais diluídas (NPs:Água)	Diâmetro Médio (nm)	Índice de Polidispersão	Potencial Zeta (mV)	EA (%)
	158,3 ± 0,3	0,073 ± 0,01	26,70 ± 7,3	-
	159,4 ± 16,1	0,095 ± 0,01	14,97 ± 2,7	96,4 ± 0,4
	167,3 ± 0,9	0,102 ± 0,01	18,66 ± 12,7	95,4 ± 0,5
	165,4 ± 16,5	0,071 ± 0,01	20,61 ± 5,5	-
	170,1 ± 1,3	0,037 ± 0,03	21,91 ± 11,5	97,4 ± 0,3
	164,3 ± 4,4	0,117 ± 0,03	18,55 ± 4,6	97,8 ± 0,5



Após a diluição dos sistemas coloidais, os tamanhos de partícula dos sistemas tiveram um discreto aumento, como mostrado na tabela 1. Este efeito é esperado já que a proporção de surfactante necessário para estabilizar as NPs muda com a diluição em água. O índice de polidispersão indica uma homogeneidade na população das NPs já que os valores foram menores que 0,2. Houve também uma alta EA da BSA uma vez que os grupamentos negativos dos aminoácidos da albumina foram capazes de interagir com as amins livres da PEI, ancorando a proteína na superfície da partícula (Bekale et al., 2015). As NPs continuaram catiônicas mesmo após adsorção da albumina, o que sugere uma alta densidade de carga positiva capaz de interagir com membranas celulares, sendo esse o foco de estudos posteriores.

#### 4. CONCLUSÃO

As nanopartículas catiônicas com adsorção de albumina foram obtidas com sucesso. O tamanho de partícula dos sistemas se mantiveram menores que 175 nm, potencial zeta em torno de +20 mV e eficiência de adsorção superiores de 95%.

#### 5. REFERÊNCIAS

BECK-BROICHSITTER, M., RYTTING, E., LEBHARDT, T., WANG, X., KISSEL, T. Preparation of nanoparticles by solvent displacement for drug delivery: A shift in the “ouzo region” upon drug loading. *Eur. J. Pharm. Sci.* 41, p. 244–253, 2010.

BEKALE, L., AGUDELO, D., TAJMIR-RIahi, H. The role of polymer size and hydrophobic end-group in PEG-protein interaction. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* v. 130, p. 141–148, 2015.

DE OLIVEIRA, A.M., JÄGER, E., JÄGER, A., STEPÁNEK, P., GIACOMELLI, F.C. Physicochemical aspects behind the size of biodegradable polymeric nanoparticles: A step forward. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* v. 436, p. 1092–1102, 2013.

HAO, A., GUO, X., WU, Q., SUN, Y., CONG, C., LIU, W. Exploring the interactions between polyethyleneimine modified fluorescent carbon dots and bovine serum albumin by spectroscopic methods. *J. Lumin.* v. 170, p. 90–96, 2016.

SHABANIAN, M., KHOobi, M., HEMATI, F., ALI, H., WAGENKNECHT, U., SHAFIEE, A. New PLA / PEI-functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposite: Preparation and characterization. *J. Ind. Eng. Chem.* v. 24, p. 211–218, 2015.

WU, Z., LING, L., ZHOU, L., GUO, X., JIANG, W., QIAN, Y., LUO, K., ZHANG, L. Novel preparation of PLGA/HP55 nanoparticles for oral insulin delivery. *Nanoscale Res. Lett.* v. 7, p. 299, 2012.

#### 6. AGRADECIMENTOS

Aos autores e suporte financeiro oferecido pela CAPES, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas /UFRN.



**CONTROLE DE QUALIDADE NA  
INDÚSTRIA FARMACÊUTICA**



ÁREA DE SUBMISSÃO: CONTROLE DE QUALIDADE E INDÚSTRIA FARMACÊUTICA  
– CQ 1

## CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA DROGA VEGETAL *Momordica charantia L*

A. S. FERREIRA<sup>1</sup>, S.P.M. COSTA<sup>2</sup>, T.R.R. TIMOTEO<sup>2</sup>, P.A. SILVA<sup>2</sup>, A.P.U. RODRIGUES<sup>2</sup> M.A.  
ANGELOS<sup>2</sup>, R.M.F. SILVA<sup>2</sup> e P.J. ROLIM NETO<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro Universitário Mauricio de Nassau

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas

E-mail para contato: [alineesilvaferreira@hotmail.com](mailto:alineesilvaferreira@hotmail.com)

*RESUMO- Momordica charantia L, conhecida popularmente como melão-de-São-Caetano, apresenta diversas propriedades terapêuticas como anti-inflamatória, cicatrizante, hipoglicemiante, antiviral e antitumoral. O objetivo do trabalho foi realizar a caracterização físico-química do pó de Momordica charantia L. O material botânico foi coletado, lavado e triturado. A repartição granulométrica foi realizada utilizando malhas: 28, 65, 100 e 170 mesh. Foi realizada a determinação de umidade por utilização de radiação infravermelha e a determinação do resíduo não volátil (cinzas totais). No estudo termoanalítico foi realizado termogravimetria (TG) e termogravimetria derivada (DTG). As curvas TG/DTG foram obtidas na faixa de temperatura entre 25 e 600°C. Na granulometria do pó, concluiu-se que o pó desta planta como sendo um pó semifino. A média do valor obtido da perda por dessecação foi de 9,39%, Após a calcinação das amostras, a média do valor obtido foi de 12,94%. As curvas TG/DTG, evidenciaram a perda de água superficial ou compostos voláteis entre 25 e 105°C. Após a desidratação, a curva DTG mostrou uma perda de massa de 36%. Os resultados obtidos contribuem para a determinação de especificações com uniformidade, qualidade e padronização de uma futura monografia farmacopeica de Momordica charantia L.*

*Palavras-chave: Melão-de-São-Caetano; propriedades terapêuticas; monografia.*

*ABSTRACT – Momordica charantia L, popularly known as Melão-de-São-Caetano, has several therapeutic properties such as anti-inflammatory, healing, hypoglycemic, antiviral and antitumor activities. The aim of this study was to physicochemically characterize the powder of Momordica charantia L. The botanical material was collected, washed and ground. The particle size distribution was performed using sieves of 28, 65, 100, and 170 mesh. Infrared radiation was*

used for moisture determination and the analysis of non-volatile residue (ashes). For the thermoanalytical study, thermogravimetry (TG) and derivative thermogravimetry (DTG) curves were obtained within the temperature range of 25 to 600 °C. In the particle size analysis, it was concluded that the powder of the plant is a semi-fine powder. The average value obtained from the loss on desiccation was 9.39%. After calcination of the samples, the average value obtained was 12.94%. The TG/DTG curves showed a loss of surface water or volatiles between 25 and 105 °C. After dehydration, the DTG curve showed a mass loss of 36%. The results contribute to the determination of specifications with uniformity, quality and standardization of future pharmacopeial monograph of *Momordica charantia* L.

*Keywords:* Melão-de-São-Caetano; therapeutic properties; monograph.

## 1. INTRODUÇÃO

A *Momordica charantia* L é uma planta medicinal pertencente à família Cucurbitaceae, também conhecida como Melão-de-São-Caetano, classificada como herbácea rasteira, que apresenta muitos ramos, flores amarelas-pálidas ou brancas, cresce em áreas topicais da Ásia, Amazônia, Oeste Africano e no Caribe (Cordeiro *et al.*, 2010).

É muito utilizada na medicina popular de países em desenvolvimento como Brasil, China e Colômbia, apresentando diversas atividades terapêuticas para tratamento de diabetes, parasitoses intestinais, cálculos renais, cólicas e grandes propriedades antiinflamatória, anti-séptica, antidiarréica, cicatrizante, hipoglicemiante, antibacteriana, antiviral, antitumoral, e abortiva (Cordeiro *et al.*, 2010; Raina *et al.*, 2016).

Ultimamente vem se tornando cada vez mais reconhecida pelo seu potencial terapêutico, sendo necessária sua caracterização físico-química para o conhecimento de suas características, estudo de suas atividades farmacológicas, bem como determinar sua estabilidade visando comprovação a validade do seu uso popular.

Nesse contexto, o trabalho tem o objetivo de realizar a caracterização físico-química do pó de *Momordica charantia* L.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### Material

O material botânico foi coletado em abril de 2016, no município Paulista, Pernambuco – Brasil. Uma exsicata da espécie foi identificada no Instituto Agrônomo de Pernambuco (nº registro 91411).

### Métodos

Após a coleta, o material vegetal fresco (partes aéreas – caules e folhas) foi lavado com água e aspergido com álcool etílico a 70%. *Momordica charantia* L foi colocada em estufa de ar circulante, durante sete dias, à temperatura mantida entre 40 e 45°C (Oliveira

*et al.*, 1991). Após a retirada do material vegetal da estufa, este foi triturado em moinho de facas, obtendo-se pó seco.

A repartição granulométrica foi realizada, segundo a Farmacopéia Brasileira 5ª ed. Os tamises foram utilizados com as seguintes malhas: 28, 65, 100 e 170 mesh, equivalentes a 590, 210, 150 e 90  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

O equipamento para determinação de umidade por utilização de radiação infravermelha é composto por uma balança que possui acoplada uma fonte da radiação. Para a realização da análise, uma alíquota da amostra foi colocada em um prato de alumínio previamente tarado. O conjunto prato de alumínio mais alíquota da amostra foi levado à balança, e a massa inicial foi registrada. Em seguida fez-se incidir a radiação sobre a amostra, e a massa foi registrada até obter o peso constante. Essa análise foi realizada em triplicata.

A determinação do resíduo não volátil (cinzas totais) do pó de *Momordica charantia L* foi realizada de acordo com o que preconiza a Farmacopeia Brasileira 5ª ed.

O estudo termoanalítico de *Momordica charantia L* foi realizado utilizando termogravimetria (TG) e termogravimetria derivada (DTG). As curvas TG/DTG foram obtidas na faixa de temperatura entre 25 e 600°C, utilizando termobalança modelo TGA 60 da marca Shimadzu, sob atmosfera dinâmica de ar (50 mL min<sup>-1</sup>), razão de aquecimento de 10° C.min<sup>-1</sup>, utilizando cadinho de platina contendo massa de amostra em torno de 6 mg. Para avaliar a influência da razão de aquecimento sobre a decomposição térmica das amostras, foram utilizadas razões de aquecimento de 5,0 - 10 - 15 - 20°C min<sup>-1</sup>. A calibração do instrumento foi verificada antes dos ensaios e empregando-se um padrão de oxalato de cálcio monohidratado, conforme norma ASTM (The American Society for Testing and Materials, 1993).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Determinação da Granulometria do Pó

Na granulometria do pó de *Momordica charantia L*, na malha de 210  $\mu\text{m}$  obteve-se um percentual de retenção de partículas de 67,76%, caracterizando o pó de *Momordica charantia L* como sendo um pó semifino de acordo a classificação da Farmacopéia Brasileira 5 ed.

A distribuição granulométrica de drogas vegetais determina a superfície de contato disponível para interação com o solvente utilizado na obtenção do derivado vegetal. É um parâmetro preliminar importante para a escolha do processo extrativo e do solvente adequado, já que influencia diretamente na eficiência do processo extrativo (Silva *et al.*, 2016; Migliato *et al.*, 2007).

#### Determinação de Perda por Dessecação e Cinzas Totais

A média do valor obtido da perda por dessecação em balança de infravermelho de *Momordica charantia L* foi de 9,39%, apresentando-se de acordo com a Farmacopéia Brasileira V ed., na qual este resultado pode variar de 8 a 14%. Esta determinação é importante para o controle microbiológico, pois, excesso de água na droga vegetal favorece o crescimento de fungos e bactérias, podendo também levar à hidrólise dos constituintes (Sharapin, 2000).

Teor de cinzas totais é o valor que determina o teor de sílica, principalmente areia e terra silícea presente na droga (Sharapin, 2000). Após a calcinação das amostras, a média do valor



obtido foi de 12,94%. O valor aceitável no teor de cinzas totais da *Momordica charantia L* ainda não foi estabelecido em nenhuma monografia.

#### Perfil termoanalítico

As curvas, TG/DTG e DTA do pó de *Momordica charantia L*. obtidas com razão de aquecimento de 10°C min<sup>-1</sup>, em atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> e ar (50 mL min<sup>-1</sup>), respectivamente evidenciaram eventos térmicos que correspondem às perdas de massa indicadas nas curvas TG/DTG e estão de acordo com aqueles apresentados na curva DTA.

As curvas TG/DTG, obtidas em atmosfera de ar, evidenciaram que a perda de água superficial ou compostos voláteis entre 25 e 105°C ( $\Delta m = 6,5\%$ ). Após a desidratação, a curva DTG mostrou uma perda de massa entre 270 e 340°C com  $\Delta m = 36\%$ , que está associada à decomposição térmica. Acima da temperatura de decomposição pode-se observar a presença de material residual, sugerindo-se a presença de cinzas que corresponde aos sais minerais ou impurezas contidas na amostra.

Já as curvas TG não evidenciaram qualquer modificação quanto ao perfil termoanalítico, observando-se apenas o deslocamento dos eventos para temperaturas mais altas com o aumento da razão de aquecimento. Portanto, qualquer razão de aquecimento entre 5 e 20°C min<sup>-1</sup> poderá ser utilizada para tais determinações; porém, a razão de aquecimento de 10°C min<sup>-1</sup> foi escolhida por ser mais usual e não envolver um excessivo tempo de medida nos trabalhos de termogravimetria.

## 4. CONCLUSÃO

Os dados obtidos por perda por dessecação, determinação de cinzas totais e granulometria contribuem para a determinação de especificações de uma futura monografia farmacopeica de *Momordica charantia L*.

Os métodos termoanalíticos mostraram-se importantes para caracterização do pó da *Momordica charantia L* e estes ensaios poderiam ser incluídos no protocolo de identificação e caracterização de extratos vegetais.

## 5. REFERÊNCIAS

CORDEIRO, L.N.; ATHAYDE, A.C.R.; VILELA, V.L.R.; COSTA, J.G.M.; SILVA, W.A.; ARAUJO, M.M.; RODRIGUES, O.G. Efeito in vitro do extrato etanólico das folhas do melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia L*.) sobre ovos e larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos. *Rev. Bras. Plant. Med.*, v.12, p. 421-426, 2010.

FARMACOPEIA Brasileira. 5.ed. Brasília: Anvisa, 2010.

MIGLIATO, K.F.; MOREIRA, R.R.D.; MELLO, J.C.P.; SACRAMENTO, L.V.S.; CORRÊA, M. A.; SALGADO, H.R.N. Controle da qualidade do fruto de *Syzygiumcumini* (L.) Skeels. *Rev. Bras. Farm.*, v. 17, p. 94-101, 2007.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. *Farmacognosia*. São Paulo: Editora Atheneu, 1991.

RAINA, K.; KUMAR,D.; AGARWAL, R. Promise of bitter melon (*Momordica charantia L*.) bioactives in cancer prevention and therapy. *Sem. in Canc. Bio.*, v. 40-41, p. 116-129, 2016.



SILVA,R.M.F.; RIBEIRO,J.F.A.; FREITAS,M.C.C.; ARRUDA,M.S.P.; NASCIMENTO,M.N.; BARBOSA,W.L.R.; ROLIM NETO,P.J. Caracterização físico-química e análises por espectrofotometria e cromatografia de *Peperomia pellucida* L. (H. B. K.). *Rev. Bras. Plant. Med.*, v. 15, p.717-726, 2013.

SHARAPIN, N. *Fundamentos de tecnologia de Produtos Fitoterápicos*. Santafé de Bogotá: Cytel, 2000.

## 6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (UFPE), ao CNPq e a Capes pelo suporte técnico e financeiro no desenvolvimento da pesquisa.



ÁREA DE SUBMISSÃO: CONTROLE DE QUALIDADE E INDÚSTRIA FARMACÊUTICA –  
CQ 2

## PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE SONDAS DE MICRODIÁLISE: UMA ABORDAGEM DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

C.M.B. RODRIGUES<sup>1</sup>, N.C.T.C. BEDOR<sup>1</sup>, D.C.G. BEDOR<sup>1</sup>, L.B. LEAL<sup>1</sup>, D.P. SANTANA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas

E-mail para contato: noely.cavalcanti@nudfac.com.br

*RESUMO – As sondas de microdiálise são inseridas em diversos órgãos do corpo, tanto em animais como em humanos. Apresentam uma membrana semipermeável que, através do fenômeno da difusão passiva de pequenas moléculas, sem a perda de fluido fisiológico. Este trabalho diz respeito à produção de sondas de microdiálise cerebral e avaliação da sua eficiência de recuperação in vitro comparando com uma sonda comercial através de planejamento experimental. As sondas feitas em laboratório possuem um custo de fabricação muito abaixo do valor empregado para a compra de uma sonda comercial, pois os materiais utilizados podem ser adquiridos facilmente no mercado. 80% das sondas produzidas estão aptas ao uso, com recuperação em torno de 19% de acordo com os resultados apresentados. As sondas de laboratório servem como uma alternativa às sondas comerciais, no que diz respeito ao funcionamento, custos de material para confecção e eficiência de recuperação. Isso enfatiza a possibilidade da redução dos custos da técnica de microdiálise, possibilitando que grupos de pesquisa utilizem diferentes artifícios para produção dos seus próprios materiais de pesquisa com qualidade.*

*Palavras chave:* Eficiência, calibração, planejamento experimental, líquido de perfusão, olanzapina

*ABSTRACT – The microdialysis probes are inserted into various body organs, in animals and humans. Have a semipermeable membrane, by passive diffusion phenomenon, allows the passage of small molecules without loss of physiological fluid. This work is about the production of brain microdialysis probes and evaluation of their in vitro recovery efficiency compared with commercial probe recovery efficiency through experimental design. Probes made in the laboratory have a cost of production below the value used for the purchase of a commercial probe, because the materials used can be easily purchased*



*in the market. 80% of probes are suitable for use, showing recovery of around 19% according to the results presented here. Laboratory probes serve as an alternative to the commercial probes, with regard to the operation, material costs for the manufacture and recovery efficiency. This emphasizes the possibility of reducing the microdialysis cost; enabling research groups use different devices to produce their own research materials with quality.*

*Keywords: Efficiency, calibration, design of experiments, perfusion liquid, olanzapine*

## 1. INTRODUÇÃO

As sondas de microdiálise são constituídas por tubos (metálicos ou plásticos) de entrada do líquido de perfusão e tubo de saída para o dialisado. A membrana semipermeável aparece na porção terminal entre esses tubos, e são constantemente perfundidas com o líquido de perfusão. As sondas do tipo concêntricas são utilizadas normalmente para estudos neuroquímicos, devido à região cerebral ser um tecido rígido, sendo a sonda de tamanho muito pequeno para garantir resolução espacial dentro de uma área específica. Há uma grande dificuldade comum às essas sondas, que é a capacidade de determinar a quantidade de molécula que pode ser recuperada pela membrana. Assim, é imprescindível o entendimento da recuperação relativa, que significa a quantidade do fármaco em estudo no dialisado coletado. Isso permite calcular a concentração real do fármaco no local de inserção da sonda (Lietsche *et al.*, 2014). Este trabalho diz respeito à produção de sondas concêntricas em laboratório (SL) e avaliação da sua recuperação *in vitro* comparando com a recuperação de sonda comercial (SC). A produção dessas sondas servirá como uma alternativa às sondas comerciais, no que diz respeito ao funcionamento, custos de material para confecção e eficiência de recuperação.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

**Materiais:** Olanzapina lote: F0H200 *United States Pharmacopeial Convention* (Rockville, MD, USA), cola epóxi, agulhas hipodérmica, sílica fundida, disco de corte, membranas de diálise, ponteiros para micropipetas.

### **Procedimento para confecção de sondas:**

1. As tubulações de entrada e saída no tamanho de 25 mm;
2. Duas unidades de sílica de  $\pm 40$  mm foram inseridas na tubulação de entrada e posicionadas cerca de 5 mm para fora da extremidade;
3. A membrana de diálise foi inserida nas sílicas do tubo de entrada;
4. A tubulação de saída foi unida à tubulação de entrada através de uma ponteira de micropipetas e cola epóxi.

**Recuperação *in vitro* das sondas de microdiálise:** A recuperação *in vitro* das sondas de laboratório (SL) foi realizada através de experimentos por diálise e retrodiálise. Um planejamento fatorial composto central de face centrada foi elaborado e um modelo matemático foi desenvolvido a fim de relacionar a resposta investigada (% de recuperação das sondas) com dois fatores (fluxo de perfusão

(1, 2 e 3  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ) e concentração de solução de olanzapina (OLZ) (12,5, 25 e 50  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Os resultados da recuperação da SL e da sonda comercial (SC) CMA 12 foram comparados estatisticamente através de teste *t student*. E as amostras foram analisadas através de método desenvolvido e validado por CL-EM/EM em conformidade com a resolução n°27/2012.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Baseado nos resultados dos experimentos do planejamento fatorial supôs-se que a relação entre a resposta e os fatores investigados poderia ser representada por uma função polinomial de segunda ordem para construção do modelo matemático através do método dos mínimos quadrados. O primeiro modelo quadrático mostrou que, no nível de 95% confiança, o fluxo quadrático e a concentração linear não foram considerados significativos, pois não apresentaram valor de *p* menor que 0,05. Baseando-se no princípio da parcimônia, estes deveriam ser excluídos, porém, de forma a manter a hierarquia matemática, o termo concentração linear foi mantido, visto que o termo concentração quadrática foi considerado significativo (Barros Neto *et al.*, 2010). O modelo foi ajustado e considerado adequado para fazer previsões e, a partir dele, obteve-se o gráfico de superfície resposta conforme mostrado na figura 1.

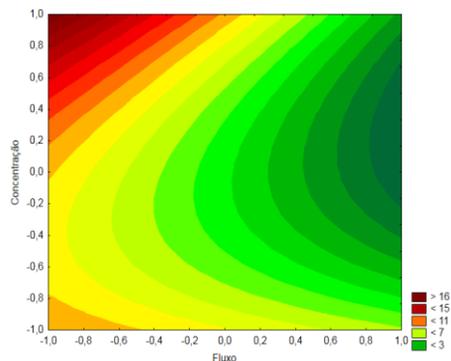


Figura 1 – Gráfico de superfície de resposta para o modelo.

Os resultados mostram que o fluxo e a concentração influenciam significativamente na recuperação da sonda. No entanto, a literatura aponta que a recuperação de uma sonda não deve sofrer variação com a concentração, visto que no tecido *in vivo* a concentração do fármaco muda ao longo do tempo (Araújo, 2008). Porém, foi verificado que a resposta a 12,5  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  e 25  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  não apresentam diferenças estatisticamente significativas (*t Student*), como já sugerido na superfície de resposta (a região amarela indicando mesma intensidade de resposta). Quando são comparadas com 50  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , há diferenças estatisticamente significativas (*t Student*), com aumento de recuperação, conforme evidenciado na superfície de resposta (intensidade de resposta passa para níveis de vermelho). Assim, conforme a literatura de Nirogi e colaboradores (2012), numa dose de 3  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  a concentração máxima atingida de OLZ no dialisado é de 8,4  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , um valor que se encontra na região do gráfico de superfície de resposta em que os resultados de recuperação são estatisticamente



semelhantes. Essa abordagem serve para estudos posteriores de microdiálise cerebral da olanzapina em animais.

Os experimentos de retrodiálise foram realizados a partir do fluxo que apresentou maior recuperação na diálise ( $1\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ), nas concentrações 12,5; 25 e  $50\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  e a recuperação foi de  $17,50\%\pm 2,98$ ;  $16,40\%\pm 3,27$  e  $23,06\%\pm 2,36$ ; respectivamente. Esses valores foram maiores que por diálise, no entanto apresentaram a mesma tendência, sem diferenças estatisticamente significativas (*t Student*) entre as concentrações de  $12,5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $25\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ . E na concentração de  $50\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , houve diferença estatisticamente significativa (*t Student*), com um aumento de recuperação. Baseado na literatura, os valores de recuperação de diálise e retrodiálise para drogas lipofílicas com log P entre 1 e 4 não são similares. E nos experimentos apresentados esses valores realmente diferem, provavelmente devido a capacidade da OLZ, que é altamente lipofílica (log P 3,08), de adsorver nos tubos do sistema de microdiálise (Nirogi *et al.*, 2012).

Os resultados da recuperação por diálise foram  $19,27\pm 10,11$  (SC) e  $19,42\%\pm 6,54$  (SL). E na retrodiálise, os resultados foram  $23,06\pm 2,36$  (SC) e  $24,59\pm 3,14$  (SL). Comparando todos os valores, pode ser observado que não houve diferenças estatisticamente significativas, no nível de 95% de confiança (*t Student*). Isto confirma que o uso de sonda de laboratório apresenta eficiência de recuperação semelhante a uma sonda comercial.

## 4. CONCLUSÃO

A utilização do planejamento experimental possibilitou verificar que na recuperação por diálise, o fluxo e a concentração influenciaram na eficiência da sonda de forma inversamente proporcional. A recuperação por retrodiálise é maior que por diálise para a OLZ. E pode ser comprovada que as sondas de laboratório apresentam a mesma eficiência de recuperação que as sondas comerciais, portanto, podem ser utilizadas pelos laboratórios de pesquisa na produção dos seus próprios materiais com qualidade, reduzindo os custos da técnica de microdiálise.

## 5. REFERÊNCIAS

- LIETSCHKE, J.; GORKAB, J.; HARDTA, S.; KARASB, M.; KLEINA, J. Self-built microdialysis probes with improved recoveries of ATP and neuropeptides. *J. Neurosci. Methods*, v.237, p.1–8, 2014.
- ARAÚJO, B.V. Modelagem Farmacocinética-Farmacodinâmica do Antifúngico Voriconazol. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2008. 211p.
- NIROGI, R.; KANDIKERE, V.; BHYRAPUNENI, G.; BENADE, V.; SARALAYA, R.; IRAPPANAVAR, S.; MUDDANA, N.; AJJALA, D.R. Approach to reduce the non-specific binding in microdialysis. *J. Neurosci. Methods*, v. 209, p.379– 387, 2012.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. *Como Fazer Experimentos: Aplicações na Ciência e na Indústria*. Porto Alegre: Editora da Unicamp, 2010.

## 6. AGRADECIMENTOS

Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético – NUDFAC-UFPE, Fundação de Amparo à

**4º EBIT**



**ENCONTRO BRASILEIRO PARA  
INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Ciência e Tecnologia de Pernambuco – FACEPE, Programa Ciências sem fronteiras – CAPES).



ÁREA DE SUBMISSÃO: CONTROLE DE QUALIDADE E INDÚSTRIA FARMACÊUTICA  
– CQ 3

## ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA DE UM UMIDIFICADOR DE CACHOS DE UMA EMPRESA DO SETOR DE COSMÉTICOS DE PERNAMBUCO

W. T. VILELA<sup>1</sup>; P. A. SILVA<sup>1</sup>, F. S. L. do NASCIMENTO<sup>1,2</sup> e R. M. F. da SILVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas

<sup>2</sup>Rishon Perfumes e Cosméticos do Brasil®, Recife, Pernambuco, Brasil.

E-mail para contato: pollyneamorim@gmail.com

*RESUMO* – Uma das grandes tendências dentro do setor de cosméticos é a utilização de ingredientes derivados de plantas tendo como um dos principais benefícios a prevenção da perda do cacho e também a melhoria da densidade do cabelo. Por este motivo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a estabilidade acelerada, realizando análises de controles físico-químico e microbiológico de uma formulação cosmética umidificadora de cachos. Conforme o Guia de Estabilidade para Cosméticos, as amostras foram submetidas a aquecimento em estufa ( $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), resfriamento em refrigerador ( $5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), exposição à radiação luminosa e ao ambiente, por 90 dias. Os resultados obtidos mostraram que todas as amostras não apresentaram alterações nos parâmetros de aspecto, cor e odor e encontraram-se dentro dos intervalos padrões quanto ao pH e viscosidade. Na avaliação do crescimento microbiológico, foi possível observar que não houve crescimento de aeróbios, *Escherichia coli*/Coliformes fecais e totais e nem de *Staphylococcus aureus*. Pode-se concluir que o produto possui propriedades físico-químicas e microbiológicas adequadas para sua finalidade de uso, assegurando a qualidade do produto.

*Palavras-chave:* Colágeno natural. Estudo de estabilidade. Controle de Qualidade.

*ABSTRACT* - One of the major trends within the cosmetic industry is the use of ingredients derived from plants having as one of the main benefits of loss prevention and also improving hair density. For this reason, the present work had as objective to evaluate the accelerated stability, carrying out analysis of physical-chemical and microbiological controls of a cosmetic formulation humidifier curls. Followed by an accelerated assessment (greenhouse heating ( $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), cooling in refrigerator ( $5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), luminous radiation exposure and environment for 90 days) and evaluation of microbiological contamination. The results obtained in the analysis of accelerated the formulation of humidifier showed that all samples did not show changes in the parameters of aspect, color and odor and were within the ranges as for pH and viscosity standards. In assessing the microbiological growth it was possible to observe



*that there was no aerobic growth, Escherichia coli faecal coliform and total and/or Staphylococcus aureus. It can be concluded that the product has physical and chemical properties suitable for your intended use, ensuring the quality of the product.*

*Keywords: Natural collagen. Stability Study. Quality control.*

## 1. INTRODUÇÃO

Diante da ideia de que as empresas têm buscado inovação por meio de seus produtos de forma a torná-los personalizados para cada público que se deseja atingir (Morais, 2012), é possível observar que o mercado de produtos capilares torna-se uma ótima alternativa para as empresas que apostam no quesito de segmentação de mercado.

Conhecendo, portanto, a grande tendência que é utilização de ingredientes derivados de plantas nas formulações cosméticas, por apresentarem inúmeros benefícios à utilização da biodiversidade na transformação em produtos (Cosmetics & Toiletries, 2012), dentre eles: a prevenção da perda do cabelo e também a melhoria da densidade do cabelo, é possível agregar esses valores a um produto destinado aos cabelos cacheados, como o umidificador em estudo.

Dessa forma, o presente estudo objetivou avaliar a estabilidade acelerada da formulação de um umidificador de cachos de uma indústria de cosméticos de Pernambuco.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

As matérias-primas utilizadas para a manipulação do umidificador foram: álcool cetosteárico, óleo mineral, metilisotiazolinona, fragrância, DC 245<sup>®</sup>, DC 1411<sup>®</sup>, glicerina, propilenoglicol, cloreto de cetiltrimetilamônio, poliquatérnio – 7, tamariliz, Plantcol<sup>®</sup> e água deionizada.

Cada uma das amostras foi mantida durante 90 dias (análises nos tempos: T24h, T7, T30, T60, T90 dias), sob condições ambientais diferentes: aquecimento em estufa (40°C ± 2°C), resfriamento em refrigerador (5°C ± 2°C), exposição à radiação luminosa e à temperatura ambiente, conforme o Guia de Estudo de Estabilidade para Produtos Cosméticos (2004).

Em relação à análise microbiológica da amostra do produto, foi empregada a metodologia disponível na indústria analisada, que consiste na avaliação microbiológica por meio de Placas 3M<sup>™</sup> Petrifilm<sup>™</sup> para contagem de Aeróbios, *Escherichia coli*/Coliformes, de Leveduras e Bolores e contagem de *Staphylococcus aureus*.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas análises da estabilidade acelerada da formulação do umidificador capilar estão descritas nas Tabelas 1 e 2 de forma mais simplificada.

A partir da interpretação dos resultados, verificou-se que as amostras que foram submetidas à refrigeração e ao aquecimento por 90 dias mantiveram um padrão médio de viscosidade dentro do intervalo que foi determinado na estabilidade preliminar realizada inicialmente (5729,5-5093,9 ± 317,79 e 5380,4-4216,1 ± 582,09 mPa.s no gelo e degelo, respectivamente).

A amostra que ficou sujeita à radiação luminosa também apresentou uma média de viscosidade (5272,33 ± 745,47 mPa.s) dentro dos intervalos determinados anteriormente.

Contudo, o que houve foi uma variação significativa no valor de pH médio (3,9 ± 0,1) dessa amostra, um pouco inferior ao que foi avaliado nas demais amostras da estabilidade preliminar.

Esse fator é justificável e aceito, pelo fato de que não se tem um controle fixo da temperatura em que o produto foi submetido durante os três meses de análises, já que a fonte de iluminação foi a solar.

Sabendo-se, portanto, que a radiação luminosa afeta diretamente o produto, a exposição durante um tempo tão longo, pode sim alterar, de forma bastante intensa, não só o pH da formulação, como também pode ocorrer a degradação dos componentes do produto, além de sua cor e o odor.

Na avaliação microbiológica do produto, também foram verificadas as características de crescimento microbiológico e foi possível observar que não houve crescimento de aeróbios, *Escherichia coli*/Coliformes fecais e totais e nem de *Staphylococcus aureus* em nenhuma das amostras que foram analisadas referente à formulação do umidificador. As amostras apresentam-se dentro dos limites de aceitação para a preparação de produtos cosméticos, conforme Resolução nº 481, de 23 de setembro de 1999.

Tabela 1 - Estabilidade acelerada do umidificador capilar quando submetido à refrigeração e aquecimento em estufa por 90 dias

Temp	Aspecto	Co	Odo	REFRIGERADOR (2– 8°C)		ESTUFA (40°C)	
				pH	Viscosidade (mPa)	pH	Viscosidade (mPa)
T0	C	C	C	4,5	4097,2 – 34,0%	4,5	4097,2 – 34,0%
T24h	C	C	C	4,3	5348,6 – 44,5%	4,3	5051,7 – 58,7%
T7	C	C	C	4,2	4952,6 – 41,2%	4,1	5241,1 – 49,3%
T15	C	C	C	4,1	5053,5 – 42,2%	4,0	5611,1 – 44,9 %
T30	C	C	C	4,1	5536,5 – 46,0%	4,0	5865,1 – 48,8%
T60	C	C	C	4,2	5237,4 – 43,6%	4,2	5776,1 – 54,9 %
T90	C	C	C	4,1	4920,1 – 36,7%	4,0	5535,3 – 54,9%
MÉDIA				<b>4,2</b>	<b>5020,84 mPa.s</b>	<b>4,1</b>	<b>5311,08 mPa.s</b>
DP				0,14	463,54	0,18	606,79

Legenda: C – Conforme; DP – Desvio Padrão

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 2 - Estabilidade acelerada do umidificador capilar quando submetido à radiação luminosa e ao ambiente por 90 dias

Temp	Aspecto	Co	Odo	RADIÇÃO LUMINOSA		AMBIENTE	
				pH	Viscosidade (mPa)	pH	Viscosidade (mPa)
T0	C	C	C	3,86	5711,7 – 47,9 %	4,5	4097,2 – 34 %
T24h	C	C	C	3,92	6616,7 – 53,4 %	4,3	6548,4 – 54,5 %
T7	C	C	C	4,0	5052,6 – 42,1 %	4,1	6232,3 – 51,9 %
T15	C	C	C	4,0	5571,4 – 46 %	4,2	6109,5 – 50,8 %
T30	C	C	C	3,85	4730,2 – 39,1 %	4,1	5392,3 – 41,9 %
T60	C	C	C	3,67	4734,1 – 39,3 %	4,2	4951,3 – 41,2 %
T90	C	C	C	4,0	4489,6 – 37,4 %	4,0	5111,7 – 42,5 %
MÉDIA				<b>3,9</b>	<b>5272,33 mPa.s</b>	<b>4,2</b>	<b>5491,81 mPa.s</b>
DP				0,13	745,47	0,11	860,01

Legenda: C – Conforme; DP – Desvio Padrão

Fonte: Dados da pesquisa



#### 4. CONCLUSÃO

Através dos testes realizados na estabilidade acelerada, foi verificada a estabilidade do produto sob quatro condições ambientais diferentes, prevendo-se assim o tempo de vida útil do produto (2 anos) e compatibilidade da formulação com o material de acondicionamento, sendo necessária a realização do estudo de prateleira, para a confirmação desse prazo de validade.

#### 5. REFERÊNCIAS

BRASIL. (2004); Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Guia de Estudo de Estabilidade para Produtos Cosméticos*. v. 1

COSMETICS & TOILETRIES. *Cosméticos étnicos*. 2012. Disponível em: <<http://allchemy.iq.usp.br/estruturando/revistas/cet-83.html#artigo1>>. Acesso em: 10 fev. 2016.

MORAIS, M.M.P. 2012. *Cosméticos étnicos: a segmentação do mercado de beleza para a mulher negra*. Mossoró, RN, 2012. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Faculdade de Filosofia e Ciências Sociais, 59 p.

PLANTCOL®. Colágeno vegetal. Disponível em: <[file:///C:/Users/COMPUTADOR/Downloads/88\\_Plantcol%20Cabelo.pdf](file:///C:/Users/COMPUTADOR/Downloads/88_Plantcol%20Cabelo.pdf)>. Acesso em: 13 fev. 2016.

#### 6. AGRADECIMENTOS

PIBIT CNPq/UFPE e Rishon Perfumes e Cosméticos do Brasil®.

ÁREA DE SUBMISSÃO: CONTROLE DE QUALIDADE E INDÚSTRIA FARMACÊUTICA –  
CQ 4

## AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE PRELIMINAR DE UM NOVO PERFUME E DOADOR DE BRILHO CAPILAR

B. R. S. de ALMEIDA<sup>1</sup>, W. T. VILELA<sup>1</sup>, K. R. de MELO<sup>1</sup>, F. S. L. do NASCIMENTO<sup>1,2</sup>, P. J.  
R. NETO<sup>1</sup> e R. M. F. da SILVA<sup>1</sup>

1 Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas

2 Rishon Perfumes e Cosméticos do Brasil®, Recife, Pernambuco, Brasil,  
E-mail para contato: karol\_krmelo@hotmail.com

**RESUMO** – *Nos últimos anos, o setor de cosméticos tem apresentado um aumento significativo na economia mundial e novos produtos são lançados no mercado constantemente. Dentre eles, merece destaque o perfume para cabelos. Dessa forma, realizou-se o estudo de estabilidade preliminar de um perfume capilar conforme o Guia de Estabilidade para Produtos Cosméticos da ANVISA (2004), em parceria com uma indústria de cosméticos de Pernambuco. Foram manipulados sete LBs, contendo os excipientes e concentrações de acordo com os dados teórico-práticos obtidos a partir de documentos existentes na empresa e na literatura, além de modificações nas concentrações de alguns insumos integrantes da formulação. Após a realização do controle físico-químico dos sete lotes, os LBs IV e VI foram escolhidos como os melhores. Com isso, durante o estudo da estabilidade preliminar, os LBs IV e VI, quando submetidos à centrifugação, permaneceram aparentemente estáveis, não apresentaram separação de fases ou turvação, sendo dispensável a alteração das formulações. As características organolépticas não foram afetadas durante todo o ciclo gelo-degelo. Estudos adicionais como testes de estabilidade acelerada e de prateleira, potencial de toxicidade, de irritabilidade e de alergenicidade, deverão ser realizados a fim de garantir maior qualidade e segurança para essa nova formulação.*

**Palavras-chave:** *Desenvolvimento Tecnológico. Estabilidade de Cosméticos. Indústria Cosmética. Preparações para Cabelo.*

**ABSTRACT-** *In recent years, the cosmetics sector has shown a significant increase in the global economy and new products come on the market constantly. Among them, highlight deserves perfume to hair. Thus, there was the study of primary stability of a capillary scent as the Stability Guide to ANVISA Cosmetics (2004), in partnership with a cosmetics industry of Pernambuco seven LBs were manipulated, containing the excipients and*



*concentrations according to the theoretical and practical data obtained from documents in the company and literature, as well as changes in the concentrations of some members of the formulation inputs. After performing the physico-chemical control of seven lots, the LBs IV and VI were chosen as the best. Thus, during the preliminary stability study, of the LBs IV and VI, when subjected to centrifugation, apparently remained stable and showed no phase separation or turbidity being dispensable changing the formulations. The organoleptic characteristics were not affected during the freeze-thaw cycle. Additional studies as accelerated stability testing and shelf potential toxicity and allergenicity of irritability must be performed to ensure greater safety and quality for this new formulation.*

*Keywords: Technological Development. Cosmetic Stability. Cosmetic Industry. Hair Preparations.*

## 1. INTRODUÇÃO

Alguns fatores principais podem estar relacionados ao crescimento considerável na Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos em todo o mundo, mas, em especial nos países emergentes nos últimos anos: busca constante por tecnologias inovadoras e, conseqüentemente, o desenvolvimento de novos produtos (Abihpec, 2014).

O perfume capilar é um dos destaques de produto inovador na área cosmética, que além de prometer deixar os fios mais cheirosos, garante brilho. Este produto inovador tem o poder de neutralizar odores externos, uma ótima opção para evitar o cheiro indesejável de fumaça de cigarro e até mesmo de gordura, proveniente de frituras, por exemplo.

Dessa forma, foi realizado o estudo de estabilidade de um perfume capilar em parceria com uma indústria de cosméticos de Pernambuco, para a garantia da qualidade e eficácia deste produto, a fim de evitar possíveis riscos à saúde do consumidor.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de uma pesquisa experimental, de natureza aplicada, e de abordagem quantitativa, que foi realizada em uma indústria de cosméticos de Pernambuco, após o seu consentimento. Os insumos utilizados para esta pesquisa foram: Acquasolv<sup>®</sup>, Renex<sup>®</sup>, álcool etílico de cereais, Irgasan DP 300<sup>®</sup>, fluido DC 245<sup>®</sup>, fluido DC 556<sup>®</sup> e fragrância. O Spray brilho perfumado Cuide-se Bem do Boticário<sup>®</sup> (Lote P005T – Validade 06/2017) foi utilizado como referência.

Foram manipulados sete lotes de bancada (LBs) de 100g cada, contendo os excipientes e concentrações de acordo com os dados teórico-prático obtidos nos documentos existentes na empresa e na literatura, fazendo-se modificações principalmente nas concentrações do álcool etílico e dos fluidos DC 245<sup>®</sup> e 556<sup>®</sup>.



O controle físico-químico (aspecto, cor e odor) das formulações foi realizado e classificado segundo os critérios estabelecidos pelo Guia de Estabilidade da ANVISA (BRASIL, 2004), e em seguida, foram selecionadas as melhores formulações para serem submetidas ao teste de estabilidade preliminar, sendo excluídos os LBs que apresentaram-se aparentemente instáveis, ou seja, com separação de fases. Já que a estabilidade das formulações é uma das características primordiais para a continuidade dos estudos de estabilidade.

Após um prévio desenvolvimento farmacotécnico dos LBs (enumerados em algarismos romanos de I a VII), foram selecionados os melhores LBs para serem submetidos ao teste de estabilidade preliminar de acordo com o Guia de Estabilidade para Produtos Cosméticos da ANVISA (2004), em um período de 12 dias correspondente a seis ciclos gelo-degelo ( $5\pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ , por 24 horas cada um). Sendo avaliados os seguintes parâmetros: centrifugação (3000 rpm, 30 minutos, três ciclos), características organolépticas, teor alcoólico e densidade.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando submetidos à centrifugação os LBs IV e VI, não apresentaram separação de fases ou turvação, sendo dispensável a alteração das formulações. Foi verificado que as amostras submetidas ao teste permaneceram aparentemente estáveis, com características organolépticas compatíveis às apresentadas pela amostra de referência (aspecto de solução límpida, incolor e odor característico).

Houve uma pequena oscilação nos valores de teor alcoólico no decorrer dos dias do teste, sendo a temperatura e umidade de armazenamento fatores justificáveis para essa situação. Quanto à densidade, as amostras dos LBs IV e VI, apresentaram pequenas variações, contudo, permanecendo dentro da variação máxima (5%) sugerida pela Farmacopéia Brasileira, 5ª edição. A amostra do LB VI apresentou valores de densidade um pouco maior do que os valores da amostra do LB IV, podendo estar relacionado ao aumento na concentração do componente Cyclopentasiloxane em sua formulação.

As amostras dos LBs IV e VI, em todo o período do teste, apresentaram pequenas variações na densidade, não havendo diferença significativa, e se mantendo estável quanto a esse parâmetro, conforme os valores de densidade obtidos na Tabela 1.

A Farmacopéia Brasileira 5ª edição sugere uma variação máxima de apenas 5% em relação a esses resultados (Brasil, 2010). As amostras do LB VI apresentaram valores de densidade um pouco maior do que os valores das amostras do LB IV, e isto pode estar relacionado a um aumento na concentração do componente DC 245® em sua formulação. No entanto, esta alteração não foi satisfatória para indicar se este fator promoveu instabilidade dessas amostras.

Tabela 1 - Valores médios de densidade (g/mL) dos Lotes de Bancada IV e VI durante a estabilidade preliminar.



Dias	LB IV	LB VI
1°	0,8142 ± 0,0010	0,8219 ± 0,0032
2°	0,8157 ± 0,0010	0,8226 ± 0,0032
3°	0,8172 ± 0,0010	0,8243 ± 0,0032
4°	0,8157 ± 0,0010	0,8211 ± 0,0032
5°	0,8144 ± 0,0010	0,8221 ± 0,0032
6°	0,8156 ± 0,0010	0,8231 ± 0,0032
7°	0,8169 ± 0,0010	0,8240 ± 0,0032
8°	0,8160 ± 0,0010	0,8238 ± 0,0032
9°	0,8145 ± 0,0010	0,8221 ± 0,0032
10°	0,8149 ± 0,0010	0,8214 ± 0,0032
11°	0,8157 ± 0,0010	0,8225 ± 0,0032
12°	0,8172 ± 0,0010	0,8215 ± 0,0032
VAR	0,0012	0,0039

Legenda: LB – Lote de Bancada; VAR - Variância

#### 4. CONCLUSÃO

As formulações mostraram-se estáveis em relação ao teste de estabilidade preliminar, mas testes de estabilidade acelerada e de prateleira, potencial de toxicidade, de irritabilidade e de alergenicidade dessas novas formulações deverão ser desenvolvidos em breve.

#### 5. REFERÊNCIAS

- ABIHPEC. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE HIGIENE PESSOAL, PERFUMARIA E COSMÉTICOS. *Panorama do setor de HPPC*. v. 21, ago. São Paulo, 2014. Disponível em: < <https://www.abihpec.org.br/wp-content/uploads/2014/04/2014-PANORAMA-DO-SETOR-PORTUGU%C3%8AS-21-08.pdf>>. Acesso em: 28 maio 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos*. 1. ed. Brasília, DF, v.1, p. 52, 2004.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopéia Brasileira*. 5.ed. Brasília, DF, v.2, p. 593, 2010.

#### 6. AGRADECIMENTOS

PIBIT/CNPq UFPE e Rishon Perfumes e Cosméticos do Brasil®.



ÁREA DE SUBMISSÃO: CONTROLE DE QUALIDADE E INDÚSTRIA FARMACÊUTICA –  
CQ 5

## CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA DO METIL P-CUMARATO POR DSC, DTA E TG

M. A. V. PEREIRA<sup>1</sup>, G. Q. LEITE<sup>1</sup>, G. F. GERMANO<sup>1</sup>, T. M. M. PEREIRA<sup>1</sup>, D. L. PORTO<sup>1</sup>, A.  
P. B. GOMES<sup>1</sup>, F. H. A. NOGUEIRA<sup>1</sup>, L. S. FERREIRA<sup>1</sup>, D. P. SOUSA<sup>1</sup>, C. F. S. ARAGÃO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia

<sup>2</sup> Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Farmácia.

E-mail para contato: maxciara.agda@gmail.com

**RESUMO** – *O metil p-cumarato é amplamente pesquisado quanto a sua atividade biológica, mostrando-se um forte candidato a novo fármaco, porém são escassos na literatura dados sobre suas características físico-químicas. Desta forma, este trabalho tem como objetivo a caracterização térmica deste composto por meio das técnicas TG, DTA e DSC. As curvas TG/DTA foram obtidas em termobalança modelo TGA-60H da Shimadzu, faixa de temperatura de 25–900 °C, as curvas DSC foram obtidas no calorímetro Shimadzu modelo DSC-60, faixa de temperatura 25–500 °C, ambas sob atmosfera de nitrogênio 100 mL/min, nas razões de aquecimento de 2,5; 5; 10; 20 e 40 °C/min. O metil p-cumarato apresentou nas curvas DSC, TG, DTA ponto de fusão em entre 121 e 142 °C e estabilidade térmica até 180 °C.*

*Palavras chave: Ácido p-cumárico, análise térmica, novo fármaco.*

**ABSTRACT** – *The methyl p-coumarate is widely researched as to its biological activity, showing a strong candidate for the new drug, but are scarce in the literature data on physico-chemical characteristics. This way, this work aims the thermal characterization of this compound by means of techniques TG, DTA and DSC. The TG/DTA curves were obtained in thermobalance model TGA-60 h Shimadzu, temperature range 25-900° C, DSC curves were obtained in Shimadzu model DSC-60 calorimeter, temperature range 25-500° C, both under nitrogen atmosphere 100 mL/min, the reasons heating 2.5; 5; 10; 20 and 40° C/min. The methyl p-cumarato presented in the curves DSC, TG, DTA fusion in between 121 and 142° C and thermal stability up to 180° C.*

*Keywords: P-coumaric acid, thermal analysis, new drug.*

## 1. INTRODUÇÃO

O metil *p*-cumarato é obtido a partir da esterificação do ácido *p*-cumárico por adição de um grupo metil (Guzman, 2014). Este éster tem sido amplamente pesquisado quanto a suas atividades biológicas, sendo relatada atividade despigmentante, anti-oxidante, anti-tumoral, anti-adipogênica, anti-inflamatória e antimicrobiana (Kubo *et al.*, 2004; Kwon e Kim, 2003; Guzman, 2014; Lee *et al.*, 2013; Vo *et al.*, 2014). Entretanto são escassos na literatura dados sobre suas características físico-químicas e estabilidade, sendo necessário estudos que forneçam subsídios seguros e confiáveis para o controle de qualidade da matéria-prima isolada como para futuras formulações.

Desta forma, a aplicabilidade das análises térmicas se dá por avaliar as propriedades físico-químicas de uma amostra quando submetidas a um programa controlado de temperatura, um aquecimento e/ou resfriamento (ICTAC, 2014). Entre as técnicas termoanalíticas mais utilizadas são a Termogravimetria (*thermogravimetry* – TG) que avalia a perda de massa da amostra em função da temperatura e/ou tempo, a Análise Térmica Diferencial (*Differential Thermal Analysis* – DTA) avalia a diferença de temperatura entre a amostra e um material de referência termicamente inerte, ao passo que a Calorimetria Exploratória Diferencial (*Differential Scanning Calorimetry* – DSC) mede as alterações de energia entre a amostra e uma referência (Ionashiro, 2004).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### Amostras

As amostras de metil *p*-cumarato foram sintetizadas no laboratório de química farmacêutica, da Universidade Federal da Paraíba.

### Análise térmica

As curvas TG/DTA foram obtidas em uma termobalança modelo TGA-60H da Shimadzu, faixa de temperatura de 25–900 °C, sendo utilizado 5 mg de amostra em cadinho de alumina. Os dados de calorimetria exploratória diferencial foram obtidos em calorímetro Shimadzu modelo DSC-60A, faixa de temperatura 25–500 °C, utilizando 2 mg de amostra em cadinho de alumínio selado. Ambas as técnicas foram realizadas sob atmosfera nitrogênio com fluxo de 100 ml/min, nas razões de aquecimento de 2,5; 5; 10; 20 e 40 °C/min. As temperaturas de decomposição e os eventos energéticos foram avaliados usando o software da Shimadzu, TASYs.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 1 observa-se as curvas DSC, TG, DTA e DTG do metil *p*-cumarato na razão aquecimento (RZ) de 10 °C/min. Sua fusão é demonstrada na curva DSC como um evento endotérmico entre 121 e 142 °C, corroborando com os dados da literatura (Kwon; Kim, 2003). A curva TG/DTG mostrou que a amostra é termicamente estável até 180 °C, onde se inicia a primeira etapa de decomposição, este evento é evidenciado na curva DTG por um pico endotérmico com Tpeak 241 °C. A curva TG segue em uma sequência de perdas de massa até o consumo total da

amostra, os eventos vistos na curva TG e DSC estão descritos na Tabela 1.

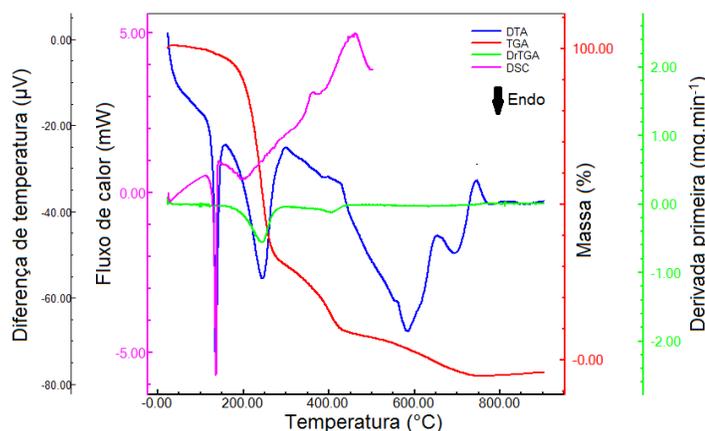


Figura 1 – Curvas DSC, TG, DTA, DTG do metil *p*-cumarato na razão de aquecimento 10°C/min.

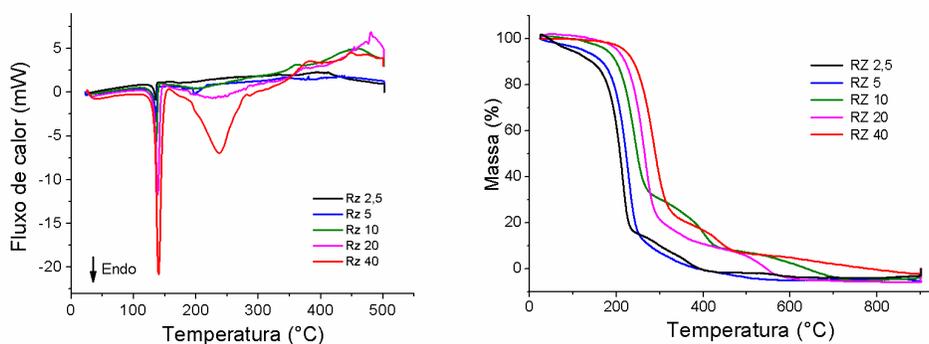


Figura 2 – Sobreposição das curvas DSC e TG nas razões de aquecimento 2,5; 5; 10; 20 e 40.

Na figura 2 apresenta a sobreposição das curvas TG e DSC nas diferentes razões de aquecimento. Nas curvas DSC é possível observar a presença do pico referente à fusão do composto em todas as curvas, com aumento das intensidades conforme eleva a razão de aquecimento. Nas curvas TG nota-se a presença dos eventos térmicos descritos anteriormente, evidenciando discretos deslocamentos para temperaturas superiores conforme se aumenta a razão de aquecimento.

Tabela 1 – Descrição de eventos térmicos do metil *p*-cumarato na razão 10 °C/min.

TG		DSC			Atribuição
Faixa (°C)	$\Delta m$ (%)	Faixa (°C)	Ev. térmico	$\Delta H$ (J.g <sup>-1</sup> )	
		121 - 142	Endotér.	113	Fusão
180 - 273	60,5	185 - 272	Endotér.	43	Decomposição
157 - 277	1,7	341 - 382	Exotér.	20,6	Decomposição
629 - 772	5,9	396 - 500	Exotér.	217	Decomposição

#### 4. CONCLUSÃO

As técnicas térmicas DSC, DTA e TG demonstraram-se eficientes na caracterização do metil *p*-cumarato, possibilitando traçar o perfil térmico do composto, foi visto processo de fusão a 121°C e sua estabilidade térmica até 180°C onde se inicia a decomposição em três etapas.

#### 5. REFERÊNCIAS

GUZMAN, Juan D.; Natural Cinnamic Acids, Synthetic Derivatives and Hybrids with Antimicrobial Activity. *Molecules*, 19, 19292-19349, 2014.

International Confederation of Thermal Analysis and Calorimetry, *ICTAC*. 2014.

IONASHIRO, M. GIOLITO; *Fundamentos da Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial/ Calorimetria Exploratória Diferencial*. Araraquara: GLZ editorial, 2004.

KUBO, I.; NIHEI, K.; TSUJIMOTO, K. Methyl *p*-coumarate, a melanin formation inhibitor in B16 mouse melanoma cells. *Bioorganic & Medical Chemistry*. 12, 5349-5354, 2004.

KWON, Y. S.; KIM, C. M. Antioxidant constituents from the stem of *Sorghum bicolor*. *Archiv Pharmazie Res.* 26, 535-539, 2003.

LEE, M., LEE, H. H., LEE, J. K., YE, S. K., KIM, S. H. AND SUNG, S. H. Anti-adipogenic activity of compounds isolated from *Idesia polycarpa* on 3T3-L1 cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23, 3170-3174, 2013.

VO *et al.* Anti-Inflammatory Effects of Methyl *p*-Hydroxycinnamate. *Biomol Ther* 22, 10-16, 2014.

#### 6. AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ, ao Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPB, Núcleo de Pesquisa em Alimentos e Medicamentos (NUPLAM) e o Laboratório de Desenvolvimento de Medicamentos (LDM), da UFRN.



ÁREA DE SUBMISSÃO: CONTROLE DE QUALIDADE E INDÚSTRIA FARMACÊUTICA –  
CQ 6

## CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA DA MONOCROTALINA POR DSC e TG

G. F. GERMANO<sup>1</sup>, M. A. V. PEREIRA<sup>1</sup>, D. P. LOPES<sup>1</sup>, T. M. de M. PEREIRA<sup>1</sup>, G. Q. LEITE<sup>1</sup>, R.  
B. GIORDANI<sup>2</sup>, A. P. BARRETO<sup>1</sup>, F. H. A. NOGUEIRA<sup>1</sup>, C. F. S. ARAGÃO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal Do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de farmácia, Laboratório Controle de Qualidade de Medicamentos.

<sup>2</sup> Universidade Federal Do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de farmácia, Produtos Naturais Bioativos (PNBio).

E-mail para contato: gessyane@hotmail.com

**RESUMO** – A monocrotalina é um alcaloide pirrolizidínico, isolado na *Crotalaria retusa*, que apresenta ação contra o *Trichomonas vaginalis*. O presente estudo objetiva a caracterização da monocrotalina utilizando as seguintes técnicas térmicas: termogravimétrica (TG) e calorimétrica (DSC). Para o TG e DSC foram analisadas cinco razões de aquecimento de 2,5; 5; 10; 20 e 40 °C. min<sup>-1</sup>, em uma faixa de temperatura de 25-900 °C para o TG e 25-500 °C para DSC, ambos sob atmosfera de nitrogênio de 100mL.min<sup>-1</sup>. Foi observado na razão de aquecimento 10 °C.min<sup>-1</sup>, o TG tem três processos de termodecomposição, no primeiro é onde ocorre a maior decomposição, entre as temperaturas de 204,07-256,76 °C, ocorrendo uma perda de massa de 61,915%. No DSC é observado quatro eventos, o primeiro endotérmico, atribuído a fusão do isolado, ocorre entre 202,35-206,73 °C, tendo uma variação de energia de 35,51J.g<sup>-1</sup>, o segundo evento exotérmico, se observa a decomposição, ocorre entre 206,75-211,69 °C, com energia de 144,31J.g<sup>-1</sup>, sendo esses eventos onde ocorre a decomposição, respectivamente. As análises de TG e DSC foram eficiente para a caracterização térmica da monocrotalina, obtenho-se assim um perfil térmico do isolado.

**Palavras- chave:** Técnicas térmicas; termodecomposição; variação de energia.

**ABSTRACT** – The monocrotaline is a pyrrolizidine alkaloid isolated from *Crotalaria retusa*, which show action aghast the *Trichomonas vaginalis*. This stud intends to do the characterization monocrotaline using the following thermal techniques: thermogravimetric (TG) and calorimetry (DSC). For TG and DSC were analyzed five rations of heating 2.5; 5; 10; 20 and 40 °C.min<sup>-1</sup>, in a thermal band from 25-900 °C for

TG and 25-500 °C for DSC, both under a nitrogen atmosphere of 100mL.min<sup>-1</sup>. Were observed a heating rate 10 °C.min<sup>-1</sup>, the TG it has three thermodecomposition processes, in the first is where happens the biggest decomposition, between 204.07-256.76 °C occurring a mass loss of 61.915%. In the DSC were seen four events, the first endothermic, who is seen the isolate fusion, between 202.35-206.73 °C, having a energy variation of 35.51J.g<sup>-1</sup>, the second, event exothermic, is seen the decomposition between 206.75-211.69 °C, with energy of 144.31J.g<sup>-1</sup>, this event occur decomposition. The analyses of TG and DSC were efficient to the thermal characterization from the monocrotaline getting up a isolate thermal profile.

*Keywords: thermal techniques, thermodecomposition, energy variation.*

## 1. INTRODUÇÃO

A monocrotalina, é um alcaloide pirrolizidínico isolada da *Crotalaria retusa*. Sabe-se que sob via sistêmica tem alta toxicidade, causando lesões hepáticas e pulmonares e até neurotoxicidade (Pitanga, *et al.* 2011), entretanto, ela tem ação contra a *Trichomonas vaginalis*, causando a morte de 80% dos trofozoitos com 1mg/mL da monocrotalina e foi visto que sob via tópica, não ocorreu nenhuma citotoxicidade e nem potencial hemolítico (Negreiros Neto, *et al.* 2016), desta forma torna bastante interessante o estudo desta substância, para ser utilizada futuramente.

As técnicas térmicas são grupo de métodos que vem evoluindo bastante nos últimos anos, são técnicas rápidas, que não utilizam solventes, usam pouca amostra, além de serem robustas. Essas técnicas são aplicadas nas áreas de metais, cerâmica, materiais eletrônicos, polímeros, substâncias orgânicas e inorgânicas, produtos farmacêuticos, produtos alimentares e organismos biológicos (Ozawar, 2000). As técnicas térmicas utilizadas no estudo foram a Termogravimetria (TG) e a Calorimetria exploratória diferencial (DSC). Essas técnicas permitem avaliar a variação de massa, a estabilidade térmica, ponto de fusão, pureza, calores de transição, entre outras (Ionashiro, 2004).

Com isso o estudo objetiva caracterizar física e quimicamente a monocrotalina, utilizando as técnicas de TG e DSC.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

A monocrotalina utilizada foi produzida pelo Grupo de Pesquisa de Produtos Naturais Bioativos (PNBio), da UFRN, ela é isolada da *Crotalaria retusa* e seu rendimento pode chegar até 5% (m/m).

As curvas de TG da monocrotalina foram obtida em termobalança Shimadzu, modelo DTG-60, utilizando cadinho de alumina, na faixa de temperatura de 25 a 900 °C, sob atmosfera de nitrogênio a 100mL.min<sup>-1</sup>, usado 10 mg de amostra. A análise de DSC foram obtidas no modelo DSC-60 da Shimadzu, na faixa de temperatura de 25 a 500 °C, com cadinho de alumínio, atmosfera de nitrogênio a 100mL.min<sup>-1</sup> e utilizando 2mg de amostra. Em ambas foram usadas as razões de aquecimento de 2,5; 5; 10; 20 e 40 °C.min<sup>-1</sup>, obtendo-se assim as curvas de TG e DSC.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

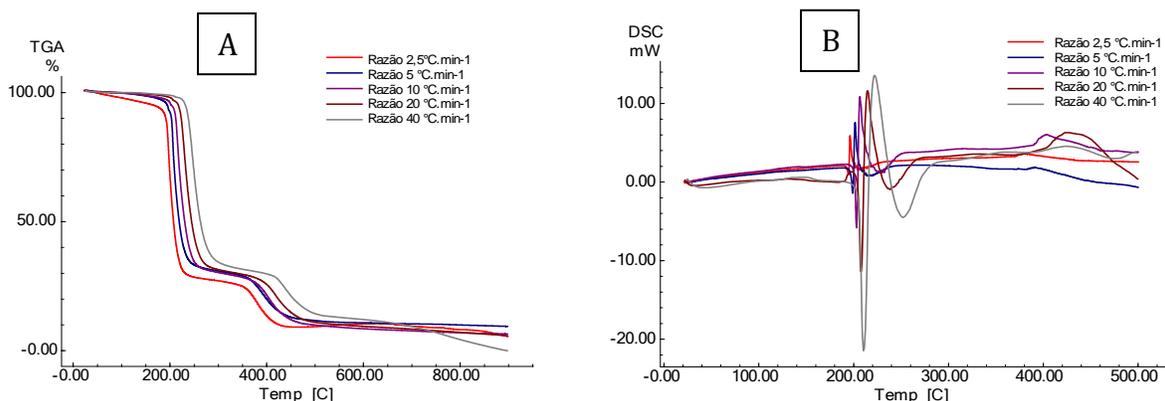


Figura 1 –Na imagem A: Curvas de TG e imagem B: Curvas de DSC; ambas sobrepostas nas razões de aquecimento de 2,5; 5; 10; 20 e 40 °C.min<sup>-1</sup>.

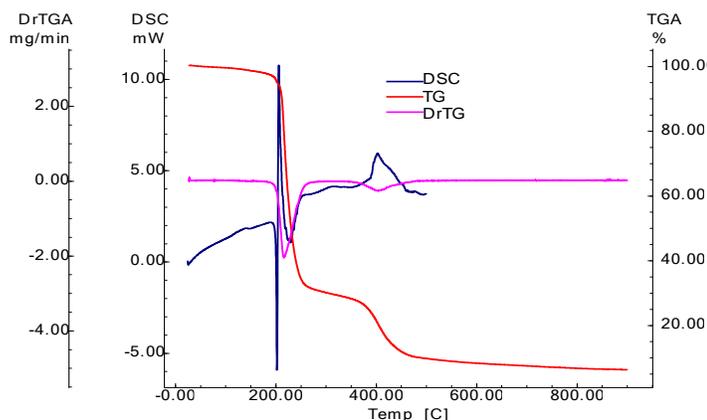


Figura 2 - Curvas de TG, DrTG e DSC para monocrotalina na razão de aquecimento de 10 °C.min<sup>-1</sup>.

As curvas de TG obtidas nas razões de 2,5; 5; 10; 20 e 40 °C.min<sup>-1</sup>, observadas na figura 1.A. ocorrem três termodecomposições, que estão descritas na tabela 1, com as temperaturas em que ocorrem e a perda da massa das decomposições em porcentagem, a primeira é a maior decomposição ou seja a que tem uma maior perda de massa, ao se analisar a TG na razão de aquecimento de 10°C.min<sup>-1</sup> e Derivada da TG (DrTG), como pode ser observado na figura 2, comprova-se esse fato.

Tabela 1 – Resultados obtidos da curva TG

ETAPAS	FAIXAS DE TEMPERATURA (°C)	PERDAS (%)
1ª	204,07–256,76	61,915
2ª	256,76–354,67	5,017
3ª	354,67–466,2	17,274
4ª	Resíduo mineral	5,938

Na figura 1.B, tem-se as curvas de DSC nas razões de 2,5; 5; 10; 20 e 40 °C.min<sup>-1</sup>, verificando-se a existência de quatro eventos, sendo dois endotérmicos e dois exotérmicos, como pode ser visto na tabela 2, em que tem-se as temperaturas, as variações de energia, e o tipo de eventos que ocorrem nele.

Tabela 2 – Resultados obtidos da curva DSC

FAIXAS DE TEMPERATURA (°C)	VARIAÇÃO DE ENERGIA (J.g <sup>-1</sup> )	EVENTO	ETAPAS
202,35 - 206,73	35,51	Endotérmico	Fusão da monocrotalina
206,75 - 211,69	144,31	Exotérmico	Decomposição da monocrotalina
208,02 - 239,48	141,41	Endotérmico	Fusão de produtos de decomposição
392,62 - 408,66	129,65	Exotérmico	Decomposição dos produtos de decomposição

## 4. CONCLUSÃO

As técnicas térmicas forneceram informações importantes para a caracterização da monocrotalina, foi visto que seu ponto de fusão ocorre a 202,35°C e esta é termicamente estável até 204,07°C, sendo esses resultados importantes para a avaliação da estabilidade da substância.

## 5. REFERÊNCIAS

- IONASHIRO, M. GIOLITO. Fundamentos da termogravimetria, análise térmica diferencial, calorimetria exploratória diferencial. Araraquara: Giz editora, 2004. 96p.
- NEGREIROS NETO, T. da S.; GARDNER, D.; HALLWASS, F.; LEITE, A. J. M.; ALMEIDA, C. G.; SILVA, L. N.; ROQUE, A. de A.; BITENCOURT, F. G.; BARBOSA, E. G.; TASCA, T.; MACEDO, A. J.; ALMEIDA, M. V. de; GIORDANI, R. B. Activity of pirrolizidine alkaloids against biofilm formation and *Trichomonas vaginalis*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 83, p. 323-329, 2016.
- OZAWAR, T. Thermal Analysis - Review and prospect. *Thermochimica Acta*, v.355, p. 35-42, 2000.
- PITANGA, B P S; SILVA, V D A; SOUZA C S; JUNQUEIRA, H A; FRAGOMENI, B O N; NASCIMENTO R P; SILVA A R; COSTA, M F D; EL-BACHÁ R; COSTA, S L. Assessment of neurotoxicity of monocrotaline, an alkaloid extracted from *Crotalaria retusa* in astrocyte/neuron co-culture system. *Neurotoxicology*, v. 32, p. 776 – 784, 2011.

## 6. AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ, ao Grupo de Pesquisa em Produtos Naturais Bioativos (PNBio), Núcleo de Pesquisa em Alimentos e Medicamentos (NUPLAM) e Laboratório de Desenvolvimento de Medicamentos (LDM), todos da UFRN.



ÁREA DE SUBMISSÃO: CONTROLE DE QUALIDADE E INDÚSTRIA FARMACÊUTICA –  
CQ 7

## PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA PRELIMINAR DE EXTRATO FLUIDO DE *Plectranthus barbatus* Andrews

W. T. VILELA<sup>1</sup>, J. A. L. de SOUZA<sup>1</sup>, M. C. da S. MELO<sup>1</sup>, L. A. L. SOARES<sup>1</sup>, P. J. ROLIM NETO<sup>1</sup>  
e R. M. F. da SILVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas

E-mail para contato: millena\_hp@hotmail.com

*RESUMO – A espécie Plectranthus barbatus (falso boldo ou malva santa), é considerada uma planta medicinal, sendo suas principais propriedades analgésica e antidispéptica. Essa espécie apresenta um amplo potencial para gerar fitoterápicos a serem disponibilizados na assistência farmacêutica básica no país. Por este motivo, o presente trabalho teve como objetivo principal caracterizar qualitativamente grupos de metabólitos secundários presente na droga vegetal de P. barbatus através de Cromatografia em Camada Delgada, método pelo qual foi possível observar a presença de alguns dos principais grupos de metabólitos (derivados cinâmicos, esteróides, flavonóides e saponinas), enquanto que os grupos das cumarinas, taninos e terpenos não foram detectados, o que não corrobora com alguns estudos presentes na literatura. Em resumo, esse estudo apresenta alguns resultados importantes dentro do controle de qualidade de plantas medicinais, que compreende a triagem fitoquímica. Esses resultados, juntamente com a caracterização físico-química já realizada da droga vegetal e do extrato fluido dessa espécie permitirão o estabelecimento de critérios, com embasamento científico, para a obtenção de futuras formas farmacêuticas com esta planta medicinal, com garantia de qualidade e segurança da matéria-prima utilizada.*

*Palavras- chave – Cromatografia. Plantas medicinais. Metabólitos secundários.*

*ABSTRACT – The species Plectranthus barbatus (boldo false or mauve saint), is considered a medicinal plant, and its main analgesic properties and antidispéptica. This species has a large potential to generate herbal medicines to be made available in the basic pharmaceutical assistance in the country. Therefore, this study aimed to qualitatively characterize this secondary metabolites in plant drug groups of P. barbatus through Thin Layer Chromatography, the method by which it was possible to observe the presence of some of the major metabolites groups (cinnamic derivatives, steroids, flavonoids and saponins), while the groups of coumarins, tannins and terpenes were not detected, which does not corroborate with some studies present in the literature. In summary, this study presents some important results within the control of quality of medicinal plants, which includes phytochemical screening. These results, together with the physico-chemical characterization already performed of the plant drug and the fluid extract of this species will allow the establishment of criteria, with scientific basis, for the obtaining of future pharmaceutical forms with this medicinal plant, with quality and safety of the raw material used.*

*flavonoids and saponins), whereas the group of coumarins, tannins and terpenes were detected, which does not corroborate some studies in the literature. In summary, this study presents some important results in the quality control of medicinal plants, comprising the phytochemical screening. These results, along with the physical and chemical characterization already performed the plant drug and fluid extract of this kind will enable the establishment of criteria, with scientific basis, to obtain pharmaceutical forms future with this medicinal plant, quality assurance and safety raw material used.*

*Keywords – Chromatography. Medicinal plant. Secondary metabolites.*

## 1. INTRODUÇÃO

A planta em estudo, *Plectranthus barbatus* (falso boldo ou malva santa), amplamente cultivada no Brasil, é bastante utilizada por diversas comunidades por suas principais propriedades analgésica e antidispéptica.

De acordo com Matu & Staden (2003), estão atribuídas às raízes dessa espécie a ação sobre problemas do tórax e às folhas ação contra dor de estômago, sarampo e também como um agente purgante. No Quênia e na República Democrática do Congo, *P. barbatus* é utilizada no tratamento de feridas e micoses, para reduzir inchaço nas contusões e para os bebês sofrendo de sarampo (Lukhoba, Simmonds & Paton, 2006).

Está entre as 71 espécies relatadas na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), onde constam as plantas medicinais que apresentam potencial para gerar produtos de interesse ao Sistema Único de Saúde.

Mesmo estando presente no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (2011) observa-se a importância de estudos mais aprofundados sobre essa espécie para o futuro desenvolvimento de produto à base de *P. barbatus*.

Diante desses fatos e sabendo que a busca e produção de produtos à base de plantas medicinais é uma prática bastante difundida na sociedade atual, o trabalho realizado teve como objetivo principal caracterizar qualitativamente grupos de metabólitos secundários presente no extrato de *P. barbatus* e confrontar os resultados obtidos com dados já existentes na literatura.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

As folhas foram coletadas no Sítio São Pedro, localizado no Cabo de Santo Agostinho e foi realizado o depósito de exsicata no herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), sob o número de tombamento: 90634.

Para obtenção da droga vegetal, as folhas frescas foram lavadas com água purificada, estabilizadas com etanol 70% (v/v) e expostas à secagem em estufa de ar circulante Fabbe-Primar<sup>®</sup> durante 7 dias à 40°C. Em seguida, o material foi pulverizado em moinho de facas Apado<sup>®</sup> com tamis de 20 mesh (0.841 mm).

As análises fitoquímicas foram realizadas através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), onde alíquotas de 20 µL de extratos preparados em banho-maria a 80°C por 10 min

(proporção de droga vegetal:solvente de 1:10) foram aplicadas, por meio de capilares, em placas cromatográficas de gel de sílica (Alugram® SIL G/UV).

Foi realizada uma triagem por CCD para observar o perfil fitoquímico, visando à identificação de alguns dos principais grupos de metabólitos secundários, conforme Wagner & Blant (1996). Para estudo de flavonóides foi utilizado: Acetato de etila : ácido Fórmico : água (90:5:5) e como revelador: NEU + PEG. Para derivados cinâmicos: Acetato de etila : ácido fórmico : ácido acético : água (100:2:11:4) e como revelador: cloreto de alumínio. Taninos condensados: Acetato de etila : ácido fórmico : água (90:10:20) e como revelador: vanilina clorídrica. Taninos hidrolisáveis: Acetato de etila : ácido fórmico : água (90:10:20) e como revelador: cloreto férrico. Cumarinas: tolueno : éter etílico saturado com ácido acético 10% (1:1) e como revelador: hidróxido de potássio etanólico. Esteroides: tolueno : acetato de etila (70:30) e como revelador: Lieberman-Burchard). Saponinas: Acetato de etila : ácido fórmico : ácido acético : água (100:11:11:26) e como revelador: Lieberman-Burchard. E para estudo de terpenos: tolueno : ácido acético (9,3:0,7) e como revelador: vanilina sulfúrica.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No estudo dos grupos de metabólitos: cumarina, terpenos, taninos condensados e hidrolisáveis, não foi possível a visualização de bandas no local de aplicação do extrato com mesmo tempo de retenção das bandas geradas pelos padrões (cumarina; timol; catequina e ácido gálico, respectivamente). Inferindo um resultado negativo para avaliação desses grupos de metabólitos.

Em estudo realizado por Albuquerque e colaboradores (2007) foi realizado o isolamento de dois diterpenos do tipo abietano (cyclobubatusin e barbatusin), além de um novo terpeno chamado de 7 $\beta$  - acetil - 12 - deacetoxycyclobutatusin, a partir dos extratos de folhas de *P. barbatus*. A presença de barbatusina e ciclobarbatusina, além de triterpenóides em extratos de *P. barbatus* também são escritos em outros estudos (Kelecon & Santos, 1985; Zelnik *et al.*, 1977) podendo inferir que não exclui-se a possibilidade ausência total de terpenos no extrato da amostra em estudo.

A ausência de bandas características a taninos hidrolisáveis na amostra em questão não corrobora com o estudo de Santos e colaboradores (2012), onde foi isolado um derivado de ácido gálico, identificado como 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- $\beta$ D-glicose a partir de um extrato metanólico inicial, depois diluído (MeOH:H<sub>2</sub>O 8:2) e subsequente extraído utilizando hexano, acetato de etila e clorofórmio.

Na cromatografia em camada delgada para identificação de derivados cinâmicos, foi possível identificar bandas características no extrato metanólico de *P. barbatus* sendo uma delas exatamente correspondente à banda do padrão (ácido cafeico). Sendo 0,83 o R<sub>f</sub> do extrato e 0,81 o R<sub>f</sub> do padrão. Esse resultado reafirma resultados obtidos por Falé e colaboradores (2009) que observa a presença na espécie em questão de um metabólito que faz parte do grupo dos derivados cinâmicos, o ácido rosmarínico.

Foi possível observar que, na avaliação do grupo dos esteróides, a amostra do extrato de *P. barbatus* apresentou uma banda no mesmo tempo de retenção do padrão (R<sub>f</sub>: 0,42). Dessa forma, pode-se indicar que a amostra em estudo possui esteroides, resultado este que corrobora com a literatura (Kelecon & Santos, 1985; Zelnik *et al.*, 1977).

Observou-se também a presença de flavonóides no extrato metanólico de *P. barbatus*. Sendo descritos em sequência os seguintes Rf: Rutina: 0,12; Vitexina: 0,34, Quercetina: 0,8 e a amostra (boldo) – banda 1: 0,13; banda 2: 0,3; banda 3: 0,34; banda 4: 0,77; 0,82.

A análise cromatográfica do extrato metanólico das folhas de *P. barbatus* permitiu a indicação da presença de quercetina, o que corrobora com Schneider et. al (2010).

Também foi possível observar a presença de banda da amostra (Rf = 0,16) correspondente a padrão de saponina (Rf = 0,14), indicando presença desse grupo químico no extrato etanólico de *P. barbatus*. Esse dado corrobora com resultados já apresentados por Schneider e colaboradores (2010).

#### 4. CONCLUSÃO

Esse estudo apresenta alguns resultados importantes dentro do controle de qualidade de plantas medicinais, que compreende a triagem fitoquímica da espécie *P. barbatus*. Esses resultados, juntamente com o estudo realizado anteriormente da caracterização físico-química da droga vegetal e do extrato fluido dessa espécie permitirão o estabelecimento de critérios, com embasamento científico, para a obtenção de futuras formas farmacêuticas com esta planta medicinal, com garantia de qualidade e segurança da matéria-prima utilizada.

#### 5. REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, R. L. et. al. Diterpenos tipo abietano isolados de *Plectranthus barbatus* Andrews. *Química Nova*, São Paulo, v. 30(8), p. 1882-1886, 2007.
- KELECON, A.; SANTOS, C. Cariocal, a new seco-abietane diterpene from the labiatae *Coleus barbatus*. *Tetrahedron Letters*, v. 26, p. 3659-62, 1985.
- LUKHOBAN, C. W.; SIMMONDS, M. S. J.; PATON, A. J. *Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 103: 1–24, 2006.
- MATU, E. N.; STADEN, J. V. Antibacterial and anti-inflammatory activities of some plants used for medicinal purposes in Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 87, p. 35–41, 2003.
- SANTOS, R. T. Anti-trypanosomal activity of 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucose isolated from *Plectranthus barbatus* Andrews (Lamiaceae). *Química Nova*, São Paulo, v. 35(11), p. 2229-2232, 2012.
- ZELNIK, R. et. al. Barbatusin and ciclobutatusin, two novel diterpenoids from *Coleus barbatus* Benth. *Tetrahedron*, v. 33, p. 1457-67, 1977.

#### 6. AGRADECIMENTOS

Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos – UFPE; Laboratório de Farmacognosia – UFPE; PIBIT/CNPq – UFPE.



ÁREA DE SUBMISSÃO: CONTROLE DE QUALIDADE E INDÚSTRIA FARMACÊUTICA – CQ 8

## DETERMINAÇÃO ESTEREOSSELETIVA DOS ENANTIÔMEROS DO CITALOPRAM EM PLASMA HUMANO POR LC-MS/MS

N. B. T. da SILVA<sup>1</sup>, C. E. M. de SOUZA<sup>1</sup>, D. C. G. BEDOR<sup>1</sup>, D. P. de SANTANA<sup>1</sup>, L. B. LEAL<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas.

E-mail para contato: danilo.bedor@nudfac.com.br

**RESUMO** – *O objetivo foi desenvolver e validar um método enantiosseletivo, por LC-MS/MS, para quantificação estereosseletiva citalopram em plasma humano. O desenvolvimento do método bioanalítico se deu pela alteração da composição da fase móvel, mantendo-se uma fase estacionária para separação quiral. O estudo de bioequivalência foi aberto, cruzado 2 x 2, aleatório em participantes sadios em jejum. A separação quiral foi obtida com uma coluna Lux Cellulose-1 250 x 4,6 mm, 4 µm, a fase móvel foi composta pelo eluente A (0,05% de dietilamina) e B (acetoneitrila + 5% de isopropanol + 0,025% de ácido fórmico) em modo isocrático (20:80 v/v). A detecção foi realizada por eletronebulização em modo positivo e as transições de massas monitoradas foram 325,2>109,2 (citalopram) e 330,0>192,0 (paroxetina-padrão interno). O método foi validado de acordo com as normas vigentes. Na análise farmacocinética verificou-se a semelhança entre os valores dos enantiômeros quando comparados com os resultados não enantiosseletivos.*

*Palavras chaves: Bioanálise, Fase estacionária quiral, Farmacocinética.*

**ABSTRACT** – *This aims was to develop and validate an enantioselective method by LC-MS / MS for stereoselective quantification citalopram in human plasma. The development of bioanalytical method was due to the change of the mobile phase composition, maintaining a chiral stationary phase for separation. Bioequivalence study was open, crossover 2 x 2, randomized with in healthy volunteers under fasting conditions. The chiral separation was obtained with a Lux-1 Cellulose Column 250 x 4.6mm, 4 µm, mobile phase was composed of eluent A (0.05% diethylamine) and B (acetonitrile + 5% isopropanol + 0.025% formic acid) in isocratic mode (20:80 v / v). Detection was performed by electrospray ionisation in positive mode and mass transitions monitored were 325.2 > 109.2 (citalopram) and 330.0 > 192.0 (paroxetine-internal standard). The method was validated according current rules. In pharmacokinetic analysis we found that the similarity between the values of the enantiomers of comparing them with non enantioselective results.*

*Keywords: Bioanalysis, Chiral stationary phase, Pharmacokinetic.*

## 1. INTRODUÇÃO

A depressão tem aumentado seus casos a nível global, a tal ponto, que ela será a segunda doença em incidência no ranking internacional em 2020. O citalopram (CITA) é um inibidor seletivo da recaptação de serotonina (5-HT), utilizado no tratamento desta doença (Jianga, *et al*, 2010). A ação antidepressiva está relacionada ao enantiômero (S)-CITA, já o (R)-CITA é um fraco inibidor. Estudos *in vitro* sugerem que o enantiômero (S)-CITA seja duas vezes mais potente que a mistura racêmica e 100 vezes mais potente que o antípoda (R)-CITA como inibidor da recaptação de 5-HT (Unceta *et al.*, 2011). As diferenças de atividade entre os enantiômeros estabelece a necessidade de avaliar o seu comportamento farmacológico e por isso é necessário desenvolver um método bioanalítico que possibilite a determinação dos níveis de concentração plasmática de cada enantiômero (Srinivas, 2004).

A análise enantiosseletiva do CITA e dos seus metabólitos em plasma tem sido reportada com o emprego de HPLC com detecção por UV ou fluorescência e por eletroforese capilar (Greiner *et al.*, 2007). Atualmente os sistemas LC-MS e LC-MS/MS têm sido descritos para a análise do CITA e/ou dos seus metabólitos em plasma e urina somente como mistura enantiomérica ou em situação de administração do CITA como enantiômero puro (Geryk *et al.*, 2013). Esta técnica apresenta como grandes vantagens: maior seletividade e sensibilidade com também um menor tempo de análise, isto vem justificando sua crescente aplicação nos métodos bioanalíticos (Suresh *et al*, 2010).

Em acordo com os dados citados este trabalho tem o objetivo de Desenvolver e validar um método enantiosseletivo, por LC-MS/MS, do CITA em plasma humano com aplicação em estudos de farmacocinética em humanos.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

As soluções-padrão de Citalopram (mistura racêmica), Escitalopram (S-CITA) e Paroxetina (USP, Rockville, MD, USA) foram preparadas pela dissolução de cada fármaco em Acetonitrila (J.T. Baker grau CLAE Phillipsburg, NJ, USA) para obter a concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup>.

Os estudos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE - CAAE – 0214.0.172.000-10). Foram administrados nos voluntários submetidos aos estudos de biodisponibilidade, tanto uma dose única de 20 mg de CITA racêmico quanto uma dose de 20 mg de (S)-CITA, em etapas distintas do estudo. Tendo suas amostras analisadas pelo método não enantiosseletivo e pelo método enantiosseletivo.

As amostras de plasma branco de voluntários sadios (não tratados com CITA ou S-CITA) e as amostras dos voluntários tratados com CITA ou (S)-CITA foram obtidas por coletas realizadas, de acordo com os tempos estabelecidos no Protocolo de Estudo. Após cada coleta, o plasma foi obtido e

acondicionado em freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$  até a realização dos ensaios analíticos. O processo de *clean-up* foi realizado pelo método de precipitação de proteínas com acetonitrila seguida de agitação por 30 segundos e centrifugação a 3000 xg por 4 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , o sobrenadante foi transferido para inserts que foram acomodados no injetor automático até a análise.

As análises cromatográficas foram executadas em equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência Sistema CLAE Shimadzu (Toquio, Japão), acoplado ao espectrômetro de massas Quattro-LC, triplo quadrupolo, com ionização por eletronebulização (ESI) em modo positivo e software Masslynx v. 1.5.1 (Micromass®, Manchester, Reino Unido). A eluição dos enantiômeros na coluna phenomenex® Lux Cellulose-1 250x 4,6 mm 4  $\mu\text{m}$  foi obtida com fase móvel constituída pelo eluente A (água contendo 0,05% de dietilamina) e pelo B (acetonitrila + 5% de isopropanol + 0,025% ácido fórmico) em modo isocrático (20:80 v/v) com vazão de  $0,4\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . O volume de injeção foi de  $30\mu\text{L}$ . A coluna foi mantida na temperatura de  $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . As análises foram executadas no modo positivo, voltagem do capilar no ESI foi de 3,2 kV, as temperaturas da fonte e de dessolvatação foram mantidas a  $150^{\circ}\text{C}$  e  $300^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. O nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização na vazão de  $421\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$  e o gás argônio foi utilizado como gás de colisão. A voltagem do cone foi mantida em 70 V para o CITA e para o PI e a energia de colisão foi de 27 eV para o CITA e 33 eV para o PI.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método mostrou-se seletivo e com sensibilidade suficiente para aplicação em estudos de biodisponibilidade relativa, não foram observados de efeito residual nem de detecção cruzada entre o canais de monitoramento de reações múltiplas (MRM). A separação quiral apresentou uma resolução ( $R_s$ ) entre os picos dos enantiômeros de 2,62 e um fator de seletividade ( $\alpha$ ) de 1,16.

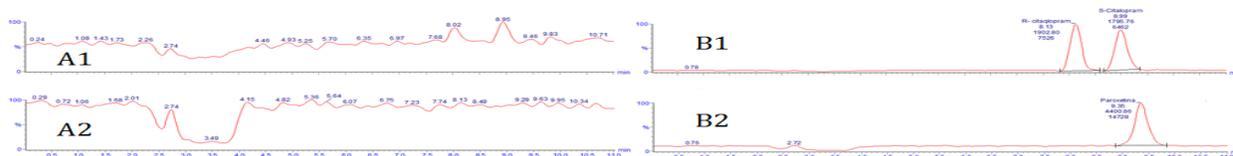


Figura 1 – Cromatogramas ilustrando a análise após a extração de amostras de plasma humano branco (A1 – MRM CITA e A2 – MRM PI) e a separação dos picos dos enantiômeros e do PI (B1 – MRM CITA e B2 – MRM PI).

A linearidade do método foi obtida no intervalo de  $5$  a  $30\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  com precisão inferior a 6,16% e exatidão com o máximo de desvio de 5,4% para os 5 níveis de concentrações estudados. A recuperação média foi de 86,6% para o R-CITA, 89,57% para o S-CITA e 88,8% para o PI. A precisão e exatidão encontraram-se dentro da especificação de  $\pm 15\%$  para os controles de qualidade baixo ( $10\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), médio ( $15\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e alto ( $25\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), e de  $\pm 20\%$  para o Limite inferior de quantificação ( $5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). As estabilidades de curta duração (18h), pós-processamento (44 h), congelamento e descongelamento (3 ciclos) e longa duração (330 dias) foram comprovadas com o maior percentual de degradação de -6,44% para os ciclos de gelo e degelo.



Em relação aos valores da concentração máxima do CITA nos voluntários, observou-se que existe uma relação direta entre os valores obtidos no método não enantiosseletivo (23,837 ng.mL<sup>-1</sup> – referência e 24,121 ng.mL<sup>-1</sup> – teste), e a soma dos valores da concentração dos enantiômeros do citalopram (22,696 ng.mL<sup>-1</sup> – referência e 23,353 ng.mL<sup>-1</sup> – teste) apresentados pelo método enantiosseletivo. Esta observação é confirmada estatisticamente através da aplicação da ANOVA (IC 95%), de que não existem diferenças estatisticamente significantes.

#### 4. CONCLUSÃO

Obteve-se um método simples, rápido e sensível com o emprego do CLAE acoplado a espectrometria de massas (LC-ESI-MS) para a quantificação dos enantiômeros do CITA, R-CITA e S-CITA, em plasma humano. As principais vantagens deste método são a preparação de amostras simples, o tempo de análise curto e boa sensibilidade, que são todas as características importantes, quando se trata de grandes lotes de amostras a serem analisadas. A utilização dos dois métodos levaram aos mesmos resultados farmacocinéticos.

#### 5. REFERÊNCIAS

- GERYK, R.; VOZKA, J.; KALÍKOVA, K.; TESAROVÁ, E. HPLC Method for Chiral Separation and Quantification of Antidepressant Citalopram and Its Precursor Citadiol. *Chromatographia* (2013) 76:483–489.
- GREINER, C.; HIEMKE C.; BADER, W.; HAEN, E. Determination of citalopram and escitalopram together with their active main metabolites desmethyl(es-)citalopram in human serum by column-switching high performance liquid chromatography (HPLC) and spectrophotometric detection. *Journal of Chromatography B*, 848. 2007. 391–394.
- JIANGA, T.; RONGA, Z.; PENG, L. Simultaneous determination of citalopram and its metabolite in human plasma by LC-MS/MS applied to pharmacokinetic study. *J Chromatogr B*. 2010;878:615–619
- SRINIVAS, N.R. Simultaneous chiral analyses of multiple analytes: Case studies, implications and method development considerations. *Biomedical Chromatography* 2004; 18: 759–784.
- SURESH, P. S.; GIRI, S.; HUSAIN, R.; MULLANGI, R. A highly sensitive LC-MS/MS method for the determination of S-citalopram in rat plasma: application to a pharmacokinetic study in rats. *Biomedical Chromatography*. 2010; 24: 1052–1058.
- UNCETA, N.; GOICOLEA, M.A.; BARRIO, R. J. Analytical procedures for the determination of the selective serotonin reuptake inhibitor antidepressant citalopram and its metabolites. *Biomedical Chromatography*. 2011; 25: 238–257.

#### 6. AGRADECIMENTOS

Ao NUDFAC, pertencente a UFPE, onde foi realizado o desenvolvimento da pesquisa.



ÁREA DE SUBMISSÃO: CONTROLE DE QUALIDADE E INDÚSTRIA FARMACÊUTICA – CQ 9

## OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE LIBERAÇÃO DE SISTEMAS BINÁRIOS A BASE DE EFAVIRENZ E HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES PARA UTILIZAÇÃO EM MEDICAMENTO ANTIRRETROVIRAL

M.A.M. LYRA<sup>1</sup>, D.A.F. FONTES<sup>1</sup>, L.C.P.B.B. SILVA<sup>1</sup>, C.G. MELO<sup>1</sup>, L.P. SIQUEIRA<sup>1</sup>, T.R.R. TIMOTEO<sup>1</sup>, M.A. ANGELOS<sup>1</sup>, C.S.B. AGUILERA<sup>1</sup>, G.C.R.M. SCHVER<sup>2</sup>, L.A. ROLIM<sup>3</sup>, J.L. SOARES-SOBRINHO<sup>4</sup>, S. ALVES-JÚNIOR<sup>5</sup>, P.J. ROLIM-NETO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos

<sup>2</sup> Universidade de Toronto, Canadá

<sup>3</sup> Universidade Federal do Vale do São Francisco, Central analítica

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos

<sup>5</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de química fundamental, Laboratório de Terras Raras

E-mail para contato: [ddanilofontes@hotmail.com](mailto:ddanilofontes@hotmail.com)

**RESUMO** – A fim de promover e avaliar o incremento de solubilidade do Efavirenz (EFZ), fármaco classe II do sistema de classificação biofarmacêutico, empregou-se, neste trabalho, uma metodologia de co-precipitação para se obter associações do fármaco com Hidróxido Duplo Lamelar (HDL). Através de difrações de raios-x (DRX), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e avaliação das condições de liberação do EFZ, pôde-se identificar algumas propriedades dos complexos formados. O teste de liberação mostrou que o sistema HDL-EFZ 30%, sistema amorfo, apresentou uma maior capacidade de solubilização do fármaco, com valor de incremento de 558%. Os resultados mostraram que o HDL foi bastante eficaz na promoção de incremento de solubilidade do EFZ.

**Palavras chave:** Adjuvantes funcionais, tecnologia farmacêutica, terapia anti-HIV

**ABSTRACT** - In order to promote and evaluate the increase in solubility of Efavirenz (EFZ), an antiretroviral drug belonging to class II in the biopharmaceutical classification system, was employed in this work a co-precipitation methodology for obtainment of binary systems between EFZ e Layered Double Hydroxide (LDH). Through diffraction of x-rays (XRD), differential scanning calorimetry (DSC), it was possible to identify the properties of complexes formed. The analyzes and the release test showed that LDH-EFZ

*system 30% had the best conditions for amorphization and solubilization of the drug, with 558% increment value. The results showed that LDH was effective in promoting increase of solubility of EFZ.*

*key words: functional adjuvants, pharmaceutical technology, anti-HIV therapy*

## 1. INTRODUÇÃO

A terapia antirretroviral mostrou-se significativamente importante devido ao aumento da sobrevivência de pessoas infectadas com HIV. O EFZ, fármaco de primeira escolha para tratamento em adultos, possui elevada potência de supressão viral, eficácia a longo prazo e menores riscos de efeitos adversos graves, que o põe à frente de outros medicamentos (Brasil, 2016).

Apesar das vantagens terapêuticas, o EFZ pertence à classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (baixa solubilidade e alta permeabilidade) e, portanto, apresenta uma baixa biodisponibilidade oral (Sathigari *et al.*, 2009).

Diversos sistemas obtidos através de excipientes funcionais, têm sido descritos com finalidade de incrementar solubilidade de compostos. O objetivo deste trabalho foi obter sistemas combinados de EFZ e Hidróxido Duplo Lamelar, em diferentes proporções, a fim de melhorar a capacidade de solubilização do fármaco nos meios biológicos e assim, a eficiência das metodologias empregadas.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a obtenção do CaAl-HDL, foi realizada uma adaptação do método proposto por Shafiei e colaboradores (2013), através de síntese por coprecipitação. A obtenção do sistema HDL-EFZ foi realizada pelo método descrito por Takahashi & Yamaguchi (1991), onde sistemas HDL:EFZ contendo 10, 20, 30, 50, 60 e 70% do fármaco disperso no carreador (m/m) foram obtidas em acetona. Misturas físicas (MF) entre o HDL e o EFZ nas proporções 10, 30 e 70% (m/m), foram obtidos. Em seguida, foram realizadas as caracterizações dos materiais obtidos.

DRX das amostras foram obtidas utilizando o equipamento Shimadzu (modelo XRD-700), com radiação  $\text{CuK}\alpha$  (1,5418 Å), equipado com ânodo de cobre.

Curvas de DSC foram obtidas em Calorímetro de Varredura Shimadzu DSC-60 interligado ao software Shimadzu TA-60WS, com atmosfera de nitrogênio de  $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e razão de aquecimento  $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , na faixa de temperatura de 25–300 °C.

O estudo de liberação foi realizado em condições non-sink, utilizando o equipamento Sirius T3 (Sirius Analytical Instruments Ltda.) e espectrômetro Sirius D-PAS. Os sistemas continham o equivalente a 5mg do fármaco, que foram adicionados ao meio tampão Sirius (Sirius Analytical Instruments Ltda), e em intervalos determinados, foram realizadas leituras da absorbância do fármaco.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os difratogramas dos sistemas HDL-EFZ (Figura 1) mostraram que, com exceção da HDL-EFZ 70% (com sobreposição de picos cristalinos do fármaco e do HDL), todas as demais combinações

evidenciaram picos com reflexões características do HDL e não mostraram picos referentes ao fármaco, indicando que nas demais amostras houve uma diminuição de sua cristalinidade do EFZ. As MF entre o HDL e o EFZ não mostraram alterações evidentes no estado cristalino do fármaco ou do HDL, pois picos referentes aos planos cristalinos destes compostos puderam ser visualizados.

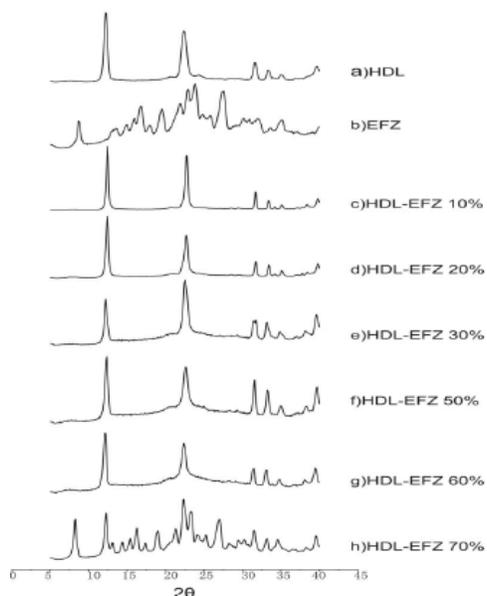


Figura 1 - Difratogramas do HDL, EFZ, seus sistemas HDL-EFZ

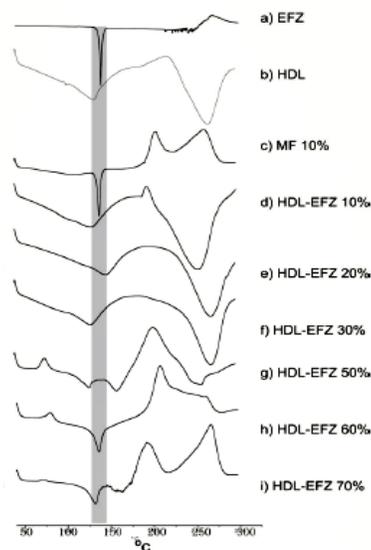


Figura 2 - Curvas DSC do HDL, EFZ, MF e sistemas HDL-EFZ.

A figura 2 ilustra eventos característicos do EFZ e do CaAl-HDL. Pico endotérmico em 139,2 °C (fusão da forma cristalina do fármaco), banda endotérmica entre 93 e 150°C (evaporação da água de adsorção e interlamelar do HDL) e uma banda endotérmica larga entre 210 e 275°C (desidroxilação das lamelas do HDL) (Alves *et al.*, 2014; Shafiei *et al.*, 2013). Nota-se a ausência do pico de fusão do EFZ nas amostras entre 10 e 30% de EFZ, podendo estas estar na sua forma amorfa nestas proporções.

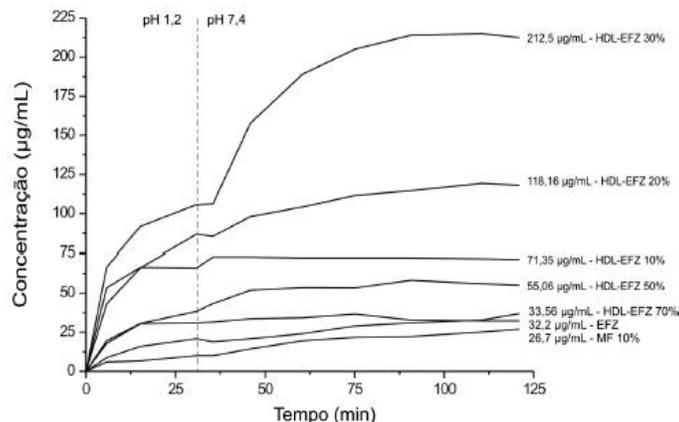


Figura 3 - Perfil de dissolução do EFZ isolado e seus sistemas HDL-EFZ e MF

O sistema HDL-EFZ 30% propiciou ao fármaco um incremento de solubilidade de aproximadamente 558% em relação EFZ isolado (Figura 3), após duas horas de dissolução. 266% e 121% foram os incrementos proporcionados pela combinação HDL-EFZ 20 e 10%, respectivamente. Nos sistemas em que o fármaco apresentou-se na forma cristalina (HDL-EFZ 50 e 70%), o incremento da solubilidade decresceu para 71% e 4%, respectivamente. Na MF 10% a solubilidade apresentou um decréscimo de 17% em relação ao valor da solubilidade final do EFZ.

## 4. CONCLUSÃO

Em detrimento da baixa biodisponibilidade oral que possui, a amorfização da estrutura do EFZ implica em aumento da sua capacidade de solubilização em meio aquoso e em diferentes pH, resultando em melhores resultados de dissolução e liberação.

## 5. REFERÊNCIAS

- ALVES, L.D.S.; SOARES, M.F.L.R.; ALBUQUERQUE, C.T.; SILVA, E.R.; VIEIRA, A.C.C.; FONTES, D.A.F.; FIGUEIRÊDO, C.B.M., SOARES-SOBRINHO, J.L., ROLIM-NETO, P.J.: Solid dispersion of efavirenz in PVP K-30 by conventional solvent and kneading methods. *Carbohydr. Polym.*, v.104, p. 166–174, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. *Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos*. 2016.
- SATHIGARI, S.; CHADHA, G.; LEE, Y-H. P.; WRIGHT, N.; PARSONS, D. L.; RANGARI, V. K.; FASINA, O; BAB, R. J. Physicochemical Characterization of Efavirenz– Cyclodextrin Inclusion Complexes. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, v. 10, n. 1, p. 81-87, 2009
- SHAFIEI, S.S.; SOLATI-HASHJIN, M.; RAHIM-ZADEH, H.; SAMADIKUCHAKSARAEI, A. Synthesis and characterisation of nanocrystalline Ca–Al layered double hydroxide {[Ca<sub>2</sub>Al(OH)<sub>6</sub>]NO<sub>3</sub>.nH<sub>2</sub>O}: in vitro study. *Adv. Applied Ceramics*, v. 112, n. 1, p. 59-65, 2013.
- SUN, D.D.; LEE, P.I. Probing the mechanisms of drug release from amorphous solid dispersions in medium-soluble and medium-insoluble carriers. *J. Controlled Rels.*, v.211, p.85–93, 2015.
- TAKAHASHI, T.; YAMAGUCHI, M. Host-Guest Interaction swelling clay minerals and poorly water-soluble drugs. 1: Complex formation between a swelling clay ineral and griseofulvin. *J. Inclusion Phenom.*, v. 10, p. 283-297, 1991
- WLODARSKI, K., SAWICKI, W., KOZYRA, A., TAJBER, L. Physical stability of solid dispersions with respect to thermodynamic solubility of tadalafil in PVP-VA. *Eur. J. of Pharmaceutics and Bioph.*, v. 96, p. 237–246, 2015.

## 6. AGRADECIMENTOS

À FACEPE, Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos e laboratório parceiros.



ÁREA DE SUBMISSÃO: CONTROLE DE QUALIDADE E INDÚSTRIA FARMACÊUTICA –  
CQ 10

## OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA DE GEL TRANSDÉRMICO À BASE DE DOXICICLINA MANIPULADO EM UMA FARMÁCIA VETERINÁRIA DE PERNAMBUCO

T. F. SILVA<sup>1</sup>, G. S. MARQUES<sup>1</sup>, T. A. ROSA<sup>1</sup>, C.S.B. AGUILERA<sup>1</sup>, L. C. P. B. B. SILVA<sup>1</sup>, P. J.  
ROLIM-NETO<sup>1</sup>, R. M. F. SILVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências  
Farmacêuticas, Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos  
E-mail para contato: rosalilm@gmail.com

**RESUMO** – *A doxiciclina é um antibiótico amplamente prescrito na medicina veterinária para combater infecções causadas por diversas espécies bacterianas. É utilizado principalmente como forma farmacêutica de administração oral, porém, devido aos efeitos adversos gastrointestinais, foi desenvolvida uma formulação transdérmica em gel. O objetivo deste trabalho foi otimizar e validar método de doseamento de doxiciclina no gel transdérmico por espectrofotometria no ultravioleta. A validação foi realizada de acordo com a Resolução nº 899, de 2003 da ANVISA. A metodologia foi considerada robusta, específica, precisa, linear, com limite de detecção e quantificação de 0,333 e 1,11 µg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Visando as diversas vantagens da via transdérmica e do tratamento individualizado, este estudo é extremamente relevante para atender e garantir a segurança e qualidade do medicamento.*

*Palavras chave: Produtos veterinários, antibiótico, infecções bacterianas*

**ABSTRACT** - *Doxycycline is an antibiotic widely prescribed in veterinary medicine to combat infections caused by bacterial species. It is mainly used as oral dosage form, but, due to gastrointestinal adverse effects, it was developed a transdermal gel formulation. This study aimed to optimize and validate an assay method for doxycycline in transdermal gel by ultraviolet spectrophotometry. The validation realized according to ANVISA resolution No. 899 of 2003. The methodology was considered robust, specific, precise and linear, with a detection limit and quantification of 0.333 and 1.11 µg.mL<sup>-1</sup>, respectively. Concerning the various advantages of transdermal and individualized treatment, this study is extremely important to meet and ensure the safety and quality of the product.*

*Key words: Veterinary products, antibiotics, bacterial infections*

## 1. INTRODUÇÃO

A doxiciclina é um antibiótico semissintético de segunda geração da classe das tetraciclinas. É amplamente prescrito na medicina veterinária para combater bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e doenças em cães e gatos como a erliquiose canina, babesiose canina e bartonelose. Também é eficaz contra infecções respiratória, geniturinárias, intestinais, articulares e dermatológicas causadas por diversas espécies bacterianas (Doxy<sup>®</sup>, 2015; Sousa, 2004).

A utilização desse fármaco pode provocar alguns efeitos colaterais e tóxicos, principalmente para o trato gastrointestinal. As formas farmacêuticas presentes hoje no mercado, tais como comprimidos, cápsulas, suspensões e soluções injetáveis destinados ao tratamento de infecções sistêmicas em animais, não são capazes de contornar esses efeitos indesejáveis, existindo a necessidade de uma formulação que evite as reações tanto no trato gastrointestinal quanto no local da injeção (Doxy<sup>®</sup>, 2015; Botelho, 2010).

Visando as diversas vantagens da via transdérmica, uma farmácia de manipulação desenvolveu uma formulação de doxiciclina em gel transdérmico para aplicação veterinária.

A escolha de uma metodologia analítica confiável para avaliar essa estabilidade é de extrema importância para gerar dados analíticos confiáveis, colaborando para decisões assertivas e evitando prejuízos financeiros irrecuperáveis. Para garantir que um método analítico gere informações confiáveis ele deve ser validado, ou seja, demonstrar que é apropriado para a finalidade pretendida (RINABI *et al.* 2004).

Baseado no exposto, o objetivo deste trabalho foi validar a metodologia analítica de determinação quantitativa da doxiciclina presente no produto farmacêutico em estudo por espectrofotometria no ultravioleta/visível (UV).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia foi adaptada de Aguiar e colaboradores (2005). A solução-amostra foi preparada a partir de uma solução estoque de 50 mL de metanol contendo quantidade do gel equivalente a 52,5 mg de doxiciclina. A solução foi filtrada com papel de filtro. Posteriormente, retirou-se uma alíquota de 0,5 mL do filtrado para um balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com água destilada. Homogeneizou-se e leu-se em espectrofotômetro UV mini – 1240 (Shimadzu<sup>®</sup>) a 269 nm, utilizando água destilada como branco.

A linearidade do método foi verificada através da análise de três curvas autênticas da solução-padrão, com no mínimo cinco pontos de concentrações de 5, 7, 10, 13 e 15 µg/mL de hclato de doxiciclina. Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente por meio de cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados para obter o coeficiente de determinação ( $R^2$ ). Os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) foram obtidos através dos coeficientes obtidos a partir da equação da reta de três curvas de calibração, conforme estabelecido pela RE n. 899/2003 da ANVISA.

A especificidade do método foi verificada através do placebo, analisando sua interferência no

comprimento de onda em que a doxiciclina absorve.

Na avaliação da precisão intermediária (precisão intercorridas) realizou-se a metodologia de doseamento das soluções-amostra por dois analistas distintos, em dois dias diferentes no mesmo laboratório. E, na repetitividade (precisão intracorrída) foram avaliadas seis determinações a 100% da concentração teste, dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista.

Para análise da exatidão, o grau de proximidade dos resultados obtidos de duas amostras com concentrações diferentes (50% e 150%) da concentração teórica de hclato de doxicilina foi comparado.

Na avaliação da robustez, submeteu-se a metodologia a dois tempos de banho ultrassônico e também à mudança do fabricante do metanol (Química Moderna® e Dinâmica®), os resultados obtidos foram comparados com os resultados da metodologia original.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a linearidade, a análise de regressão coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,9924, demonstrando que a correlação linear entre as variáveis x e y estão dentro dos requisitos mínimos exigidos pela ANVISA que é de  $R^2 > 0,99$ . De acordo com os resultados, observou-se que as curvas são lineares. Os valores de LD e LQ estimados foram 0,333 e 1,11  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente. Esses valores obtidos demonstram que o método apresenta sensibilidade para detectar e quantificar o teor de doxiciclina.

Ao investigar-se a especificidade do método utilizando-se o placebo, observou-se que ele não absorve no mesmo comprimento de onda em que a doxiciclina absorve, portanto, não causa interferência neste sinal.

O coeficiente de variação (CV%), para ambos os dias e analistas, ficou abaixo do valor máximo especificado pela ANVISA para insumos farmacêuticos ativos sintéticos que é de 5%, segundo a RE nº 899, de 2003 (Brasil, 2003). No entanto, através da análise de variância two-way, pode-se verificar que o método é preciso considerando um intervalo de 95% de confiança.

Os resultados das seis determinações, a 100% da concentração do teste, estão expressos na tabela 1, observando que o CV% está abaixo do valor máximo especificado para o insumo farmacêutico ativo que é de 5%, segundo a RE nº 899, de 2003 (Brasil, 2003).

Tabela 1 – Repetitividade da metodologia

Amostras em $\mu\text{g}/\text{mL}$						Média	DP	CV%
10,57	10,26	10,15	10,65	10,76	10,80	10,53	0,26	2,46

Para a exatidão, os resultados variaram entre 95 a 105,3% com CV% variando de 0,002 a 0,025%, ficando abaixo do valor máximo especificado que é de 5% (BRASIL, 2003).

Na análise da robustez, o CV% ficou abaixo de 5%. Por meio da análise de variância one-way, observou-se que os resultados são iguais com 95% de confiança.



#### 4. CONCLUSÃO

O método analítico desenvolvido apresentou-se adequado para o doseamento *in vitro* de doxiciclina em gel transdérmico, pois, através da validação, o método apresentou especificidade, linearidade, precisão, robustez e exatidão, garantindo a confiabilidade dos resultados.

#### 5. REFERÊNCIAS

- BOTELHO, M. C. S. N. *Normalização das Alterações Clínicas e Hematológicas em Cães com Ehrlichiose Submetidos ao Tratamento com Doxiciclina*. Seropédica, RJ. 2010. Dissertação (Mestrado em ciências) – Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. p. 2-3.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003, que autoriza a publicação do Guia para a Validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 jun. 2003.
- DOXY®: suspensão. Disponível em: < [http://www.cepav.com.br/br/paginas\\_internas/produtos/doxy\\_suspensao/bula.html](http://www.cepav.com.br/br/paginas_internas/produtos/doxy_suspensao/bula.html) > Acesso em: 30 mai. 2015.
- RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quím. Nova*, v. 27, n. 5, p. 771-780, jun. 2004
- SOUSA, M.G. *et al.* Tratamento da Erliquiose canina de ocorrência natural com doxiciclina, precedida ou não pelo dipropionato de imidocarb. *Rev. Ciên Agroveterinárias*, Lages, v.3, n.2, p. 126-130. 2004

#### 6. AGRADECIMENTOS

À FACEPE, ao Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos e à farmácia de manipulação veterinária.

ÁREA DE SUBMISSÃO: CONTROLE DE QUALIDADE E INDÚSTRIA FARMACÊUTICA  
– CQ 11

## ESTUDO DE PRÉ-FORMULAÇÃO DA EPIISOPILOTURINA, EXTRAÍDO DE *Pilocarpus microphyllus* (Jaborandi), COMO ALTERNATIVA TERAPÊUTICA PARA DOENÇAS NEGLIGENCIADAS

A. L. SILVA<sup>1</sup>, C. M. MELO<sup>1</sup>, A. C. Q. M. VIEIRA<sup>1</sup>, L.A. ROLIM<sup>2</sup>, J.L.S. SOBRINHO<sup>1</sup>, M.F.R. SOARES<sup>1</sup>, P. J. ROLIM- NETO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências e Farmacêuticas

<sup>2</sup> Central Analítica, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina-PE, Brasil  
E-mail para contato: andrea.luciana20@gmail.com

**RESUMO** – A flora amazônica é rica em espécies medicinais de grande potencial econômico para a extração de princípios ativos. Dentre as espécies de maior interesse mundial destaca-se o jaborandi, pertencente ao gênero *Pilocarpus* e à família das *Rutaceae*. A epiisopiloturina (EPI) é o alcaloide de maior abundância presente neste gênero e estudos revelaram que ele é utilizado para várias aplicações terapêuticas das quais podemos citar, redução da pressão intraocular, combate a xerostomia e estímulo da musculatura lisa gastrointestinal. Neste contexto, este trabalho tem o objetivo de caracterizar a molécula EPI por meio das técnicas analíticas, como: Espectroscopia de absorção na região do infravermelho, Difração de Raio-X, Microscopia Eletrônica de Varredura e análise térmica (Termogravimetria (TG), Calorimetria exploratória Diferencial (DSC). Os resultados obtidos no infravermelho identificaram os principais grupos funcionais presentes na molécula. Na curva DSC evidenciou um pico endotérmico com faixa de fusão de 221,72 a 228,24°C ( $\Delta E = - 148,75 \text{ J.g}^{-1}$ ). No TG as curvas obtidas demonstram que a degradação do protótipo se inicia em aproximadamente 224 °C, com perda de massa ( $\Delta m$ ) de 79,27%. No MEV, foi possível observar a morfologia dos cristais da EPI, que se apresentam na forma de cristais irregulares. Sendo assim, foi possível a caracterização da molécula EPI, promissora alternativa terapêutica para doenças negligenciadas como já foi descrito na literatura.

**Palavras-chave:** Jaborandi; epiisopiloturina; caracterização; doenças negligenciadas

**ABSTRACT** - The Amazonian flora is rich in medicinal species of great economic potential for the extraction of active ingredients. Among the species of higher global interest highlights the Jaborandi, belonging to the genus *Pilocarpus* and the family of *Rutaceae*. The epiisopiloturina (EPI) is the most abundant alkaloid present in this genre and studies have shown that it is used for various applications terapêuticas of which we

*can mention the reduction of intraocular pressure, combat xerostomia and stimulation of gastrointestinal smooth muscle. In this context, this study aims to characterize the EPI molecule by means of analytical techniques, such as absorption spectroscopy in the infrared, diffraction X-ray, scanning electron microscopy and thermal analysis (thermogravimetry (TG), scanning calorimetry . differential (DSC) the results of infrared identified key functional groups present in the molecule on the DSC curve showed an endothermic peak with melting range 221.72 to 228.24 ° C ( $\Delta E = -. J.g1 148.75$  ). the TG curves obtained show that the prototype degradation starts at approximately 224 ° C with weight loss ( $\Delta m$ ) of 79.27%. in the SEM, it was possible to observe the morphology of the crystals of EPI, which present in the form of irregular crystals. thus, it was possible to characterize the EPI molecule promising therapeutic alternative for neglected diseases as already described in the literature.*

*Keywords: Jaborandi; epiisopiloturina; description; neglected diseases*

## 1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais sempre foram objeto de estudo na tentativa de descobrir novas fontes de obtenção de princípios ativos. (Montanari; Bolzani, 2001). Neste contexto, o jaborandi (*Pilocarpus Microphyllus*) é umas das espécies mais exploradas comercialmente, devido à produção do alcaloide pilocarpina, o qual possui finalidades terapêuticas diversas, tais como: redução da pressão intraocular, combate a xerostomia e estímulo da musculatura lisa gastrointestinal (Sawaya *et al.*, 2011).

Apesar do vasto conhecimento desta espécie, a extração de porte industrial da pilocarpina gera ao final do processo uma biomassa rica em diversos compostos não aproveitados para a saúde (MIURA, 2009). Dentre estes compostos, a epiisopiloturina (EPI) é o alcaloide de maior rendimento e apresentou promissoras atividades frente às doenças negligenciadas, tais como leshimaniose (Miura, 2009) e esquistossomose (Veras *et al.*, 2012), além das suas atividades anti-inflamatória e antinoceptiva (Silva *et al.*, 2013).

Dentre estas técnicas, pode-se destacar a Espectroscopia de absorção na região do infravermelho, Difração de Raio-X, Microscopia Eletrônica de Varredura e análise térmica (Termogravimetria, Calorimetria exploratória Diferencial). O somatório de resultados obtidos através destas técnicas torna possível a obtenção de informações sobre o comportamento das novas entidades químicas, como: Cristalinidade, propriedades físico-químicas das substâncias, informações sobre interações fármaco-excipientes, determinação parâmetros cinéticos, entre outras (Maximiliano *et al.*, 2010; Moyano; Broussalis; Segall, 2010).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

A técnica espectroscópica vibracional no infravermelho foi obtida utilizando o equipamento PerkinElmer® (Spectrum 400) com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR), com cristal de seloneto de zinco em triplicata, com varreduras de 250 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  de resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

A TG foi realizada, em triplicata, a partir de uma termobalança Shimadzu<sup>®</sup>, modelo DTG-60H, em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL.min<sup>-1</sup>, na razão de aquecimento de 10°C.min<sup>-1</sup> e faixa de aquecimento de 30 a 600°C. Para este método foram utilizadas amostras de 4 mg ( $\pm 0,5$ ), acondicionadas em porta-amostra de alumínio. Os dados termoanalíticos foram analisados por meio do software TA-60WS<sup>®</sup> (Thermal Analysis) versão 2.20 da Shimadzu<sup>®</sup>.

E no MEV as amostras foram preparadas sobre dupla fita de carbono contida em suporte (*stub*) de cobre e metalizada sob vácuo com a deposição de uma fina camada de ouro em equipamento BAL-TEC<sup>®</sup> modelo SCD 050. As análises de MEV foram obtidas por microscópio eletrônico de varredura ambiental FEI, Quanta<sup>®</sup> 200 FEG, utilizando aumento 2.300 vezes.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de espectrometria por IV permite a identificação dos principais grupos funcionais presentes em uma molécula a partir das vibrações características de cada grupo, conforme a amostra 1.

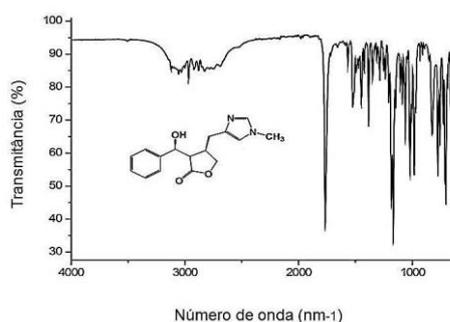


Figura 1 - Espectro de absorção na região do infravermelho da Epiisopiloturina.

Na curva DSC da Epiisopiloturina evidenciou um pico endotérmico com faixa de fusão de 221,72 a 228,24°C ( $\Delta E = -148,75 \text{ J.g}^{-1}$ ), em concordância com os estudos anteriores realizados por Veras e colaboradores (2013). Conforme figura 2.

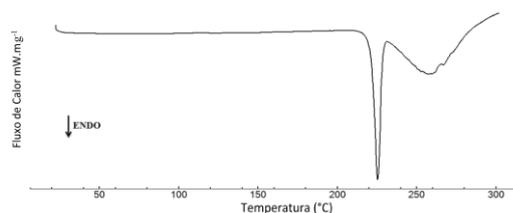


Figura 2 - Curva DSC da EPI, sob razão de aquecimento de 10°C.min<sup>-1</sup> e fluxo de nitrogênio de 50 mL.min<sup>-1</sup>.

No TG as curvas obtidas demonstram que a degradação do protótipo se inicia em aproximadamente 224 °C, com perda de massa ( $\Delta m$ ) de 79,27%, logo após o pico referente ao evento de fusão da EPI, evidenciado no DSC. De acordo com a figura 3.

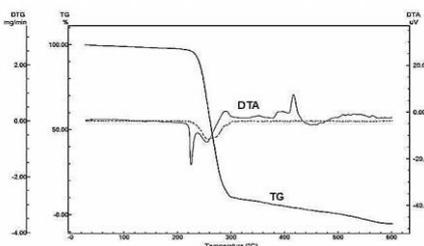


Figura 3 - Curva TG, DTG e DTA da EPI, sob razão de aquecimento de  $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$  e fluxo de nitrogênio de  $50 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$ . No MEV, foi possível observar a morfologia dos cristais da EPI, que se apresentam na forma de cristais irregulares. Conforme figura 4.

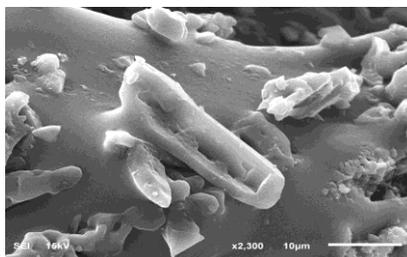


Figura 4 - Microscopia eletrônica de varredura da EPI, sob aumento de 2.300 vezes.

## 4. CONCLUSÃO

Por meio das técnicas analíticas utilizadas neste trabalho, foi possível conhecer as características físico-químicas da EPI. Mostrando-se uma alternativa terapêutica na aplicação de doenças negligenciadas já que algumas possuem tratamento limitado. A obtenção de suas características físico-químicas é de suma importância, pois serve de base no estudo de pré-formulação, perspectiva deste trabalho.

## 5. REFERÊNCIAS

- MAXIMIANO, F.P.; COSTA, G.H.Y.; SOUZA, J. *Carac. físico-química do fármac. Antichagá. Bnz.l. Quim. nova*, v. 33, n. 8, pp.1714-1719, 2010.
- MIURA, L.M.C.V. *Isolamen. do alcal. epiisopiloturina a partir da biomas. do Jaborandi (Pilocarpus microphyllus) e avalia. de suas ativida. Antibact., antileish., antivir., antiesquistos. e sialag.* Dissertação (Mestrado em Ciência animal) Pós Graduação de Ciência animal, Universidade Federal do Piauí, Terezina, 2009.
- VERAS, L. M.; GUIMARÃES, M. A.; CAMPELO, Y. D.; VIEIRA, M. M.; NASCIMENTO, C.; LIMA, D. F.; VASCONCELOS, L.; NAKANO, E.; KUCKELHAUS, S. S.; BATISTA, M. C.; LEITE, J. R.; MORAES, J. *Activ. of Epii. Agai. Schistos. Mans.. Current Medicinal Chemistry*, v. 19, pp. 2051-2058, 2012.



## **6. AGRADECIMENTOS**

Ao CNPq/CAPES pelo apoio institucional e financeiro. Ao núcleo de controle de qualidade de medicamentos e Correlatos (NCQMC), pelo desenvolvimento do trabalho; Ao laboratório de Tecnologia dos Medicamentos-LTM pelo suporte prático nas análises executadas; aos professores Mônica Felts de La Rocca Soares e Professor Pedro Rolim Neto por todo o apoio e orientação e á doutoranda Cybelly Marques de Melo pelo execução e dedicação para conclusão deste trabalho.



ÁREA DE SUBMISSÃO: CONTROLE DE QUALIDADE E INDÚSTRIA FARMACÊUTICA –  
CQ 12

## AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA (EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA) DE COMPRIMIDOS DE MEBENDAZOL COMERCIALIZADOS NA EUROPA E NO BRASIL.

A. S. SOUZA<sup>1</sup>, V. S. de OLIVEIRA<sup>1</sup>, D. C. G. BEDOR<sup>1</sup>, J. L. S. SOBRINHO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas

E-mail para contato: assouza9336@gmail.com

*RESUMO – O mebendazol é um anti-helmíntico de amplo espectro utilizado para parasitoses recorrentes em todo mundo, mas apresenta uma variada solubilidade ao depender do tipo de cristal presente em sua composição. E por isso foi realizado um estudo com o objetivo de comprovar que os comprimidos fabricados no Brasil, produzido com o polimorfo A, são equivalentes farmacêuticos dos fabricados na Europa, produzidos com o polimorfo C. A metodologia seguida está descrita na monografia específica do mebendazol contido na 5ª edição Farmacopéia Brasileira. De acordo com os testes e comparações realizadas os comprimidos apresentaram-se dentro dos limites especificados pelo compêndio, embora o comprimido europeu tenha apresentado um melhor delineamento na liberação do princípio ativo. E por esse fato demonstra que o a presença do polimorfo C torna a forma farmacêutica mais eficiente para o tratamento de doenças causadas por parasitas.*

*Palavras – chave: anti-helmíntico, controle de qualidade, medicamentos*

*ABSTRACT – Mebendazole is an anthelmintic of broad spectrum used for recurrent parasitic infections in the world, but has a wide solubility to depend on the type of crystal present in its composition. Therefore, a study was conducted in order to prove that the tablets manufactured in Brazil, produced with polymorph are pharmaceutical equivalents of manufactured in Europe, produced with polymorph C. The methodology is described in the monograph specifies the contained mebendazole the 5th edition of the Brazilian Pharmacopoeia. According to the tests and comparisons tablets presented within the limits specified by the compendium, although the European tablet presents the best design in the release of the active ingredient. And this fact demonstrates that the presence of polymorph C is optimized dosage form for the treatment of diseases caused by parasites.*

*Keywords: anti helminth, quality control, drugs*

## 1. INTRODUÇÃO

A equivalência terapêutica entre dois medicamentos relaciona-se à comprovação de que ambos contêm o mesmo fármaco (mesma base, sal ou éster da mesma molécula terapeuticamente ativa), na mesma dosagem e forma farmacêutica, o que pode ser avaliado por meio de testes *in vitro* (Sharge & Yu, 1999; Who, 1999). Portanto, pode ser considerada como um indicativo da bioequivalência entre os medicamentos em estudo, sem, contudo, garanti-la.

O medicamento referência durante seu desenvolvimento é submetido a ensaios clínicos para comprovar a segurança e eficácia do produto antes da obtenção do registro para a comercialização. Com isso a indústria farmacêutica desenvolveu a formulação e a forma farmacêutica adequada de acordo com a via de administração e ao objetivo do medicamento (Storpiritis, 1999). Já o medicamento genérico, para ser considerado intercambiável, deve se preocupar com as modificações farmacotécnicas para que o produto apresente os mesmos resultados *in vitro*, quando comparado ao referência. É admissível que a formulação e o processo de fabricação sejam diferentes, já que os equipamentos e fornecedores de matérias primas não são os mesmos, desde que essas diferenças não alterem a bioequivalência entre os produtos (Dighe, 1999).

Com isso as preocupações em termos de biodisponibilidade, bioequivalência e intercambiabilidade recaem sobre medicamentos apresentados sob formas farmacêuticas pelo fato de existirem muitos fatores que podem alterar a liberação, a dissolução e a absorção do fármaco no organismo. Fatores esses devem ser amplamente estudados durante o desenvolvimento farmacotécnico do produto, o que, no entanto, não exclui a necessidade da realização do teste de bioequivalência (Banakar, 1992; Manadas *et al.*, 2002).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

O teste de equivalência farmacêutica implica na execução de testes físicos e físico-químicos comparativos, entre, o candidato a genérico, e, seu respectivo medicamento de referência.

O princípio da equivalência farmacêutica foi aplicado a dois medicamentos de diferentes fabricantes, porém com o mesmo princípio ativo (mebendazol) e dose (100 mg).

Foram realizados os testes de determinação do peso médio, teste de dureza, teste de friabilidade, teste de desintegração, uniformidade de doses unitárias, teste de dissolução e doseamento com os parâmetros e determinações preconizados na monografia específica para o mebendazol, onde a informações estão contidas na 5ª edição da Farmacopéia Brasileira.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Determinação de peso médio:** O peso médio encontrado foi de 0,1464 mg. Comprovando que todas as 20 unidades testadas dos comprimidos de mebendazol brasileiros se mantiveram dentro



dos Limites de Variação preconizados para formulações com peso entre 80 mg a 250 mg. Da mesma forma, procedeu-se com os comprimidos europeus de mebendazol, em que o peso médio foi de 0,3072 mg, para comprimidos com pesos acima de 250mg. Ambas as formulações possuem 150 mg de princípio ativo, e, as variações de peso para as duas se mantiveram dentro dos limites especificados, então, é sugerido que ambos são equivalentes farmacêuticos.

**Teste de dureza:** Para os comprimidos brasileiros foi de 6,63 N, enquanto os comprimidos fabricados na Europa a dureza foi de 9,07 N. Apresentando um desvio de 0,518 N e um coeficiente de variação de 7,822% para os comprimidos brasileiros e um desvio de 0,286 N e um coeficiente de variação 31,63% de para os comprimidos Europeus. Os valores médios de dureza das unidades testadas se mantiveram com baixo desvio padrão e com coeficiente de variação menor que 10%.

**Friabilidade:** A porcentagem da friabilidade para os comprimidos brasileiros foi de 0,133% e os europeus de 0,024%. Tanto os comprimidos brasileiros como os europeus se mantiveram com o valor da friabilidade (perda de peso) menor que 1,5% em relação ao peso inicial. Os testes de friabilidade e dureza são inversamente proporcionais entre si, quanto maior for o valor da friabilidade de um comprimido, menor será a dureza deste, e, quanto menor for a friabilidade, maior será a força necessária aplicada até que ele se rompa. (Ansel, 2000)

**Desintegração:** Os comprimidos brasileiros apresentaram os tempos de desintegração de 15', 18', 20', 20', 20', 20'. Enquanto os europeus apresentaram 05', 05', 05', 06', 08', 08'. A Farmacopéia Brasileira estabelece que o limite de tempo estabelecido como critério geral para a desintegração de comprimidos não revestidos é de 30 minutos, ou seja, todos os comprimidos devem desintegrar-se até esse tempo, no máximo. Ambas as amostras de comprimido cumpriram o teste.

**Uniformidade de doses unitárias:** Para se calcular o Valor de Aceitação (VA), foi calculado o conteúdo individual para os comprimidos europeus e brasileiros, em porcentagem, de cada unidade testada com sua respectiva média, desvio padrão e coeficiente de variação. A média dos valores do conteúdo individual dos comprimidos de mebendazol foi de 100,14%, desvio 1,31 e Coeficiente de Variação (CV) de 1,31%. Segundo a Farmacopéia Brasileira, se  $98,5\% \leq X \leq 101,5\%$ ,  $M = X$ , então  $VA = ks$ . E ainda, o valor de k para um n de 10 (número das unidades testadas) é de 2,4. Sabendo que o desvio das amostras foi de 1,31, VA é igual a 3,14. O valor máximo (L1) permitido para VA é de  $L1 = 15$ , considerando o valor de 3,14 obtido, os comprimidos encontrados estão de acordo com essa especificação. Para os comprimidos europeus a média dos valores do conteúdo individual dos comprimidos foi de 100,32%, desvio de 0,44 e CV de 0,44%. Como o valor de X está entre  $98,5\% \leq X \leq 101,5\%$ , então,  $M = X$ , e portanto,  $VA = ks$ . O valor de k para um n de 10 (número das unidades testadas) é de 2,4. Sabendo que o desvio das amostras foi de 0,44, VA é igual a 1,06. Sabendo, que o valor máximo (L1) permitido para VA é de  $L1 = 15$ , considerando o valor de 1,06 obtido, os comprimidos encontrados estão de acordo com essa especificação.

**Teste de dissolução:** Foram utilizados meio de dissolução e aparelhagem específica, conforme preconizados pela Farmacopéia Brasileira 5ª Edição na monografia destinada a comprimidos de mebendazol. Foram obtidos como valores para os comprimidos brasileiros a média de 84,65%, desvio de 3,14 e CV de 4,03%. E os europeus apresentaram como média 101,32% desvio de 1,47 e CV de 1,45%. Os comprimidos europeus apresentaram um maior percentual de dissolução do que os brasileiros nas condições testadas. Este fato pode ser explicado por diversos motivos, tanto referentes à molécula, como a existência de polimorfismo (Singhal & Curatolo, 2004), tanto referentes à formulação, como a utilização de excipientes que facilitariam na dissolução por promover



uma rápida liberação do princípio ativo ou até então por promover um melhor contato da molécula com o meio de dissolução (Aulton, 2005). Alguns destes fatos foram estudados e serão demonstrados mais adiante.

**Doseamento:** A Farmacopéia Brasileira 5ª Edição diz que os comprimidos de mebendazol devem conter no mínimo 90,0% e no máximo 110,0% da quantidade declarada de  $C_{16}H_{13}N_3O_3$ . Em que o comprimido brasileiro uma média de 106,58%, desvio de 0,51 e CV de 0,47%. E os europeus apresentaram uma média de 107,32%, desvio de 0,76 e CV 0,71%. Ambos os comprimidos se mantiveram dentro dos limites especificados pela Farmacopéia Brasileira 5ª Edição.

## 4. CONCLUSÃO

O estudo comparativo entre os comprimidos europeus e brasileiros demonstrou que ambos atendem as especificações farmacopéicas. Contudo, os comprimidos europeus apresentaram um melhor delineamento na liberação do princípio ativo frente aos brasileiros.

## 5. REFERÊNCIAS

- BANAKAR, U. K. Pharmaceutical Dissolution Testing. New York: Marcel Dekker Inc., 437 p., 1992.
- DIGHE, S. V. A review of the safety of generic drugs. Transplant. Proc., New York, v.31, suppl. 3A, p.235-245, 1999.
- SHARGEL, L.; YU, A.B.C. – Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics. 4 ed. Stamford: Appleton & Lange, 768 p. 1999.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION – Marketing authorization of pharmaceutical products with special reference to multisource (generic) products: a manual for a drug regulatory authority. Geneva: [s.n.], 1999.

## 6. AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq por ter fomentado a pesquisa e ao Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos (NCQMC) pela estrutura cedida para a realização dos testes.

ÁREA DE SUBMISSÃO: CONTROLE DE QUALIDADE E INDÚSTRIA FARMACÊUTICA –  
CQ 14

## AVALIAÇÃO DE COMPRIMIDOS COM POTENCIAL MUCOADESIVO DE GOMA DE CAJUEIRO E QUITOSANA

C.M.B. da SILVA<sup>1</sup>, M.S.F. CORDEIRO<sup>1</sup>, L.L.F. SÁ<sup>2</sup>, C.B.M. FIGUEIREDO<sup>1</sup>; L.C.C. NUNES.<sup>2</sup>;  
J.L. SOARES-SOBRINHO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas;

<sup>2</sup> Universidade Federal do Piauí, Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados.  
E-mail para contato: camilabarros.farma@gmail.com

**RESUMO** – *O desenvolvimento de formas farmacêuticas com propriedades mucoadesivas tem sido uma alternativa bastante explorada nos últimos anos. Assim, este trabalho visa a obtenção de comprimidos mucoadesivos contendo goma do cajueiro ou quitosana enquanto excipientes alternativos promissores para promover a liberação de fármacos na cavidade oral. Estes comprimidos foram obtidos por compressão direta e foram avaliados quanto as suas propriedades mucoadesivas e porcentagem de intumescimento. A formulação com goma do caju apresentou maior tempo e força de mucoadesão do que a com quitosana, enquanto a quitosana apresentou maior capacidade de intumescimento. Os resultados mostram os uso desse polímeros com uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novas formulações com propriedade mucoadesiva.*

*Palavras-chave: Mucoadesão; polímeros naturais, uso tópico.*

**ABSTRACT** – *The development of pharmaceutical dosage forms with mucoadhesive properties have been an alternative well explored in recent years. This work aims the obtantion of a mucoadhesive tablet containing cashew gum or chitosan as promising alternative excipients to promote drug release in the oral cavity. These tablets were obtained by direct compression and were evaluated for their mucoadhesive properties and percentage of swelling. The formulation of cashew gum had higher mucoadhesion time and higher strength mucoadhesion than that one with chitosan, while chitosan had higher swelling capacity. The results show the use of such polymers as a promising alternative for the development of new dosage forms with mucoadhesive property.*

*Keywords: Mucoadhesion; natural polymers, topical use.*

## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de sistemas mucoadesivos para liberação de fármacos tem sido usado nos últimos anos como alternativa para melhorar a biodisponibilidade e o efeito terapêutico desejado, uma vez que permite uma ação local do insumo ativo diminuindo os efeitos adversos (Mohammadi-Samani *et al.*, 2005). Para administração bucal de fármacos, uma boa propriedade bioadesiva parece ser o ponto-chave, de modo que possa ser retida na cavidade oral para a duração desejada (Gowthamarajan *et al.*, 2012).

Considerando as propriedades mucoadesivas de diversos polímeros, muitos são os estudos encontrados na literatura que abordam a obtenção de comprimidos com essas propriedades, dentre eles: Aguiar (2007), obteve um comprimido mucadesivo para tratamento de candidíase oral contendo nistatina para melhorar adesão dos pacientes ao tratamento e elevar o sucesso terapêutico, e Kassem *et al.* (2014) utilizou esse tipo de formulação para evitar o efeito de primeira passagem e melhorar a biodisponibilidade oral do fármaco bupropiona.

Quitosana é um polímero derivado da desacetilação parcial da quitina e refere-se às mais abundantes polissacarídeos natural, com várias aplicações em produtos farmacêuticos e de abordagens biotecnológicas (Kamoum *et al.*, 2015). A goma do cajueiro é extraída de *Anacardium occidentale* L., sendo um polissacarídeo complexo compreendendo galactose, arabinose, ramnose, glucose, ácido glicurônico e outros resíduos de açúcar (Oliveira *et al.*, 2014).

Neste contexto, este trabalho visa avaliar as propriedades mucoadesivas de comprimidos utilizando os polímeros quitosana ou goma do cajueiro, isoladamente, como alternativa para futuras formulações para promoção da ação local de fármacos na mucosa oral.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Dois diferentes lotes de comprimidos contendo celulose microcristalina (10%) adicionado de goma do cajueiro (90%) ou quitosana (90%) foram obtidos por compressão direta utilizando uma compressora rotativa marca Sellc, modelo w216.

Os comprimidos foram avaliados quanto a porcentagem de intumescimento (n=3) submetendo-os ao contato direto com solução tampão e, em tempos determinados, o excesso de água foi retirado e os comprimidos pesados individualmente. O intumescimento dos comprimidos foi verificado segundo metodologia (Hermans *et al.*, 2014) baseado na equação 01, onde II é o índice de intumescimento,  $P_0$  é o peso inicial do comprimido e  $P_t$  é o peso do comprimido em determinados tempos após exposição a solução tampão fosfato (pH  $6,8 \pm 0,05$ ).

Equação 01- Determinação do índice de intumescimento.

$$II = \frac{P_t - P_0}{P_0} \times 100$$

Para avaliação das propriedades mucoadesivas dos lotes produzidos, os comprimidos foram submetidos ao teste de tempo e força de mucoadesão. O tempo de mucoadesão *ex-vivo* foi realizado em triplicada no dissolutor Nova Ética, utilizando metodologia adaptada de Perioli *et al.* (2004); Nagaveni *et al.* (2013). Para tanto, uma mucosa bucal de porco foi adicionada na lateral de cada cuba de dissolução contendo 3 comprimidos aderidos à mucosa. A cuba contendo 500 mL de tampão fosfato pH 6,8 foi mantida à 37 °C e com rotação de 75 rpm. O comportamento dos comprimidos foi

então monitorado até desprendimento ou completa dissolução. Já a força de mucoadesão *ex-vivo* foi avaliada por meio de um texturômetro da marca TA. XT plus, utilizando mucina de estômago suíno (tipo II) (Sigma-Aldrich®) com metodologia adaptada (Perioli *et al.*, 2004; Hirata; Bruschi, 2010;). O disco de mucina, utilizado para simular os constituintes da mucosa bucal, foi preparado por compressão, colado com cianoacrilato sobre um suporte específico e umedecido com dispersão de mucina 8% (p/p) por um tempo de 30 s. No probo do equipamento o comprimido foi colado com cianoacrilato. O teste foi iniciado com a adesão do comprimido ao disco, com uma força de 1 N, mantida por 60s. A força máxima adesiva (deslocamento) foi resultante da média de três medições (n = 3).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo de intumescimento é muito importante para o estabelecimento de aderência e, uma vez que o inchaço promove a flexibilidade das cadeias de polímero, formando uma camada de gel em torno da matriz do comprimido, permite a interpenetração entre as cadeias do polímero e a mucina (SALAMAT-MILLER *et al.* 2005). No teste de intumescimento, o lote de comprimidos contendo quitosana mostrou capacidade de intumescimento mais rápida e em maior proporção, com 68,1% de intumescimento nos 5 primeiros minutos de estudo e erosão iniciada após 30 minutos. No entanto, o lote contendo goma de cajueiro apresentou valores inferiores de intumescimento, com máximo de 14,63% em 15 minutos, seguido da erosão desses comprimidos.

Tabela 1 – Resultados das propriedades mucoadesivas dos comprimidos

<b>Comprimidos</b>	<b>Tempo de mucoades</b>	<b>Força de mucoadesã</b>
<i>Goma do cajueiro</i>	252 minutos	0,5726 N ± 0,036 N
<i>Quitosana</i>	0 minutos	0,5335N ± 0,038 N

A avaliação do tempo de mucoadesão (Tabela 1) influencia diretamente a eficácia terapêutica, uma vez que está relacionada com a residência da formulação no local de ação (Perioli *et al.*, 2004). Os comprimidos contendo goma do cajueiro apresentaram um tempo de adesão superior aos comprimidos com quitosana uma vez que estes se desprenderam da mucosa logo no início do teste. Para quitosana, apesar da literatura relatar sobre sua capacidade mucoadesiva, o resultado do teste de intumescimento mostra que a quitosana apresenta alta capacidade de reter água, o que pode levar a formação de uma mucilagem escorregadia que pode reduzir a capacidade de mucoaderência e esta condição pode ter ocorrido durante o teste de mucoadesão, uma vez que este é realizado com grande volume de água, levando aos resultados de tempo de mucoadesão pouco significativos para a quitosana (Morales, Mcconville, 2011; Silva *et al.*, 2015).

Em relação à força de mucoadesão (Tabela 1), os resultados corroboram com os resultados do tempo de mucoadesão, demonstrando maior força de mucoadesão para a goma do cajueiro frente à quitosana. Porém neste teste ambos os polímeros apresentam boas propriedades mucoadesivas. A goma de caju apresenta elevada porosidade e baixa tensão superficial, o que provavelmente proporciona uma boa molhagem através da adição da dispersão de mucina 8%, que assegurou um contato íntimo da amostra com o disco, levando a um intumescimento do polímero e, como consequência, o entrelaçamento das cadeias do polímero com a mucina (Gowthamarajan *et al.*, 2012).



## 4. CONCLUSÃO

Através dos resultado deste trabalho foi observado que os polímeros goma do cajueiro e quitosana tem características mucoadesivas promissoras enquanto potenciais polímeros de escolha para a obtenção de formulações para liberação de fármacos na mucosa oral.

## 5. REFERÊNCIAS

- AGUIAR, M.M.G.B. Desenvolvimento de novos comprimidos bucais de nistatina para o tratamento da candidíase oral. 2007. Trabalho de conclusão de curso (Mestrado) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.
- GOWTHAMARAJAN, K.; JAWAHAR, N.; WAKE, P.; JAIN, K.; SOOD, S. Development of buccal tablets for curcumin using *Anacardium occidentale* gum. *Carbohydr. Polym.*, v. 88, p. 1177– 1183, 2012.
- HERMANS, K.; PLAS, D.V.; KERIMOVA, S.; CARLEER, R.; ADRIAENSENS, P.; WEYENBERG, W.; LUDWIG, A. Development and characterization of mucoadhesive chitosan films for ophthalmic delivery of cyclosporine. *Int. J. Pharm.*, v. 472, p. 10–19, 2014.
- KAMOUN, E.A.; CHEN, X.; ELDIN, M.S.M.; KENAWY, E.S. Crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels for wound dressing applications: A review of remarkably blended polymers. *Arab J. Chem.*, v. 8, p. 1-14, 2015.
- HIRATA, A. N.; BRUSCHI, M.L. Sistemas semi-sólidos para liberação bucal de própolis. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.*, v. 31, p. 33-39, 2010.
- KASSEM, M.A.; ELMESHAD, A.N.; FARES, A.R. Enhanced bioavailability of buspirone hydrochloride via cup and corebuccal tablets: Formulation and in vitro/in vivo evaluation. *Int. J. Pharm.*, v. 463, p. 68– 80, 2014.
- MOHAMMADI-SAMANI, S.; BAHRI-NAJAFI, R.; YOUSEFI, G. Formulation and in vitro evaluation of prednisolone buccoadhesive tablets. *IL Farmaco*, v. 60, p. 339- 344, 2005.
- MORALES, J.O.; MCCONVILLE, J.T. Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 77, p.187-199, 2011.
- NAGAVENI, S.; MORU, C.S.; GOTTIPATI, D.B.; VORUGANTI, V.K. Formulation and evaluation of buccal films of salbutamol sulphate. *Mintage journal*, v. 2, p. 37-40, 2013.
- OLIVEIRA, E. F.; PAULA, H.C.; DE PAULA, R.C. Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation. *Colloids Surf., B*, v. 113, p. 146– 151, 2014.
- PERIOLI, L.; AMBROGI, V.; RUBINI, D.; GIOVAGNOLI, S.; RICCI, M.; BLASI, P.; ROSSI C. Novel mucoadhesive buccal formulation containing metronidazole for the treatment of periodontal disease. *J. Control. Release*, v. 95, p. 521–533. 2004.
- SALAMAT-MILLER, N.; CHITTCHANG, M.; JOHNSTON, T.P. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 57, p. 1666- 1691, 2005.
- SILVA, B.M.; BORGES, A.F.; SILVA, C.; COELHO, J.F.; SIMÕES, S. Mucoadhesive oral films: The potential for unmet needs. *Int. J. Pharm.*, v. 494, p. 537-551, 2015.

## 6. AGRADECIMENTOS

CAPES, CNPQ, PIBITI-UFPE.



ÁREA DE SUBMISSÃO: CONTROLE DE QUALIDADE E INDÚSTRIA FARMACÊUTICA –  
CQ 15

## DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO POR CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÍLICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE ANTIPSIÓTICOS EM PLASMA HUMANO: UMA ABORDAGEM DE PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS

L. F. A. P. ZACARIAS<sup>1</sup>, D. M. D. da SILVA<sup>1</sup>, D.M. CASTELO BRANCO, N. C. T. C. BEDOR<sup>1</sup>, D.  
C. G. BEDOR<sup>1</sup> e D. P. de SANTANA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências  
Farmacêuticas

E-mail para contato: danilo.bedor@nudfac.com.br

**RESUMO** – *O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um método bioanalítico para quantificação simultânea dos antipsicóticos olanzapina (OLZ), quetiapina (QTP) e venlafaxina (VFX) em plasma humano através da abordagem de planejamento de experimentos. A técnica utilizada foi a cromatografia líquida de alta eficiência com mecanismo de separação por interação hidrofílica (HILIC) acoplada à espectrometria de massas triploquadrupolo. A estratégia foi compreendida em cinco etapas através de planejamentos experimentais estatísticos, desenvolvimento de modelos empíricos e construção de superfícies de resposta que auxiliaram na determinação da melhor resolução entre os picos, tempo de análise e relação sinal/ruído. A separação cromatográfica foi obtida com uma coluna HILIC 100 x 2,1 mm, 2,6 µm e eluição isocrática com tampão de formato de amônio 5 mM com pH 4,7:acetonitrila (15:85 v/v) sob fluxo de 0,2 mL.min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 10 µL. Os tempos de retenção foram de 2,4, 3,1, e 4,5, para QTP, VFX e OLZ, respectivamente. A ionização foi eletronebulização em modo positivo e as transições de massas obtidas foram 313,2>256,1, 384,1>253,1 e 278,2>260,2 para OLZ, QTP e VFX, respectivamente. A abordagem de planejamento experimental aumentou em 50% a sensibilidade para todos os fármacos em relação à abordagem tradicional de desenvolvimento de métodos com resolução entre os picos para todos os analitos. A eficiência do processo de extração foi superior a 70% para todos os compostos.*

**Palavras Chaves:** HILIC, CLAE-EM/EM, Olanzapina, Quetiapina, Venlafaxina

**ABSTRACT** – *The aim of this work was the development of a bioanalytical method for simultaneous quantification of antipsychotics olanzapine (OLZ), quetiapine (QTP) and*



*venlafaxine (VFX) in human plasma by design of experiments (DoE) approach. The technique used was high-performance liquid chromatography with a mechanism of separation by hydrophilic interaction (HILIC) coupled to triple quadrupole mass spectrometry. The approach was comprised of five steps using DoE, development of empirical models and construction of response surfaces that assisted in determining the best resolution between the peaks, analysis time and signal/noise ratio. The chromatographic separation was obtained with a HILIC column 100 x 2.1 mm, 2.6  $\mu$ m and isocratic elution with 5 mM ammonium formate buffer pH 4.7:acetonitrile (15:85 v/v) under flow rate of 0,2 ml min<sup>-1</sup> and injection volume of 10  $\mu$ L. The retention times were 2,4, 3,1, e 4,5, to QTP, VFXP and OLZ, respectively. Electrospray ionization was in positive mode and Multiple reaction monitoring were 313,2>256,1, 384,1>253,1 and 278,2>260,2 to OLZ, QTP and VFX, respectively. The DoE approach increased by 50% for all drug sensitivity compared to the traditional approach to developing methods resolution between the peaks for all analytes. The efficiency of the extraction process was higher than 70% for all compounds.*

*Keywords: HILIC, LC-MS/MS, Olanzapine, Quetiapine, Venlafaxine*

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos 20 anos, a cromatografia de fase reversa (RPC) tem sido a primeira escolha na análise de moléculas de interesse biológico e em muitos outros campos de aplicação em que se deseja realizar a análise de compostos de baixa ou média polaridade. Entretanto, a retenção de compostos polares nesse modo (RPC) geralmente requer uma grande quantidade de água na fase móvel para se obter alguma retenção dos analitos, o que ocasiona diversos problemas, tais como a diminuição da sensibilidade em CLAE-EM/EM empregando a ionização por eletronebulização (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010). Existe um espaço não apropriadamente explorado para a análise de solutos polares, sendo a cromatografia, que envolve interação hidrofílica (HILIC), o modo atualmente mais apropriado para preencher tal lacuna (MCCALLEY, 2007). A HILIC é uma forma de cromatografia que utiliza uma fase estacionária polar em conjunção com uma fase móvel contendo uma mistura de água (pelo menos 2,5%) e um solvente orgânico (tipicamente >70 %). A HILIC destaca-se na análise de compostos de caráter básico e tem sido bastante empregada na análise de fármacos, pois mais de 70% deles são compostos básicos (MCCALLEY, 2010).

A qualidade de um método bioanalítico que utiliza a técnica de CLAE-EM/EM deve ser preferencialmente avaliada por múltiplos critérios, devido ao grande número de parâmetros que podem afetar a eficiência do sistema como um todo. Assim, a utilização de uma estratégia multissegmentada permite otimizar o desenvolvimento de métodos bioanalíticos por CLAE-EM/EM com base em diferentes critérios.

O intento deste estudo é apresentar um procedimento sistemático, utilizando as técnicas de planejamento experimental, para ser aplicado no processo de desenvolvimento e otimização de métodos bioanalíticos por CLAE-EM/EM, foram escolhidos como analitos modelos de bases fracas

os fármacos olanzapina (OLZ) e quetiapina (QTP), além da venlafaxina (VFX), utilizada como padrão interno.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

A estratégia foi compreendida em etapas: i) experimentos preliminares ii) otimização dos parâmetros cromatográficos; iii) otimização dos parâmetros da fonte de ionização; iv) reavaliação dos parâmetros de declustering potencial; v) desenvolvimento do processo de extração. Foi utilizado um Planejamento composto central de face centrada para investigar com mais detalhes a influência do pH da fase aquosa e o teor de componente orgânico na fase móvel (%ACN) em um equipamento Nexera X2 (Shimadzu, Japão). Para otimização dos parâmetros de ionização do espectrômetro de massas Sciex 3200 (Sciex, EUA) foi realizado o procedimento padrão de otimização univariada automática disponibilizado pelo software Analyst (Sciex, EUA) com a finalidade de comparar com os resultados do planejamento fatorial fracionário  $2^{5-1}$ . Um planejamento fatorial  $3^2$  foi realizado para sondar a influencia do pH do meio e do tipo de solvente (diclorometano, clorofórmio e metil-tert-butil-éter) usado para extrair os fármacos da matriz biológica na eficiência do processo de extração.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A separação cromatográfica foi obtida com uma coluna HILIC 100 x 2,1 mm, 2,6  $\mu\text{m}$  e eluição isocrática com tampão de formato de amônio 5 mM com pH 4,7:acetonitrila (ACN) (15:85 v/v) sob fluxo de 0,2 mL.min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 10  $\mu\text{L}$ . A Figura 1 mostra a superfície construída a partir da sobreposição das curvas de nível obtidas nesta etapa. A região na qual todas as respostas encontram-se dentro da especificação está denotada pela cor azul (Sweet spot).

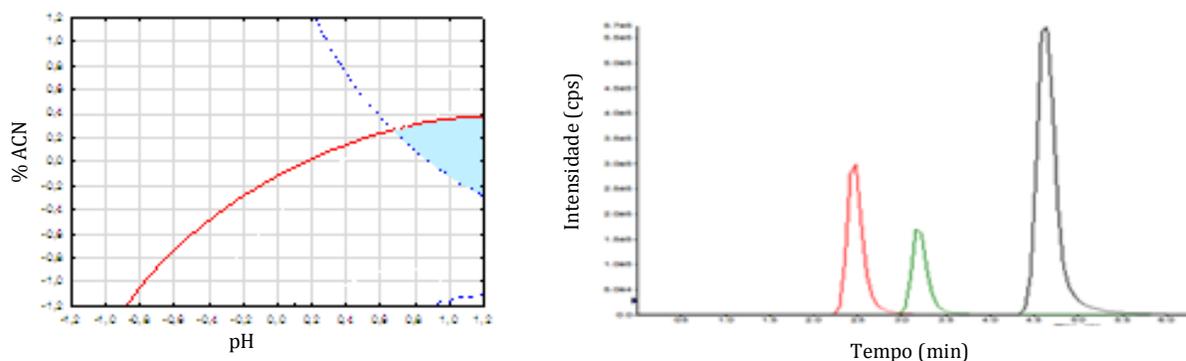


Figura 1. (A) Curva de nível obtida pela sobreposição das curvas da etapa cromatográfica e (B) cromatograma ilustrativo dos tempos de retenção da QTP (2,4), VFX (3,1) e OLZ (4,5).

O método bioanalítico modelo desenvolvido nesta pesquisa apresentou a separação cromatográfica dos picos da olanzapina, quetiapina e venlafaxina, e um incremento médio de área para os analitos de aproximadamente 50% em comparação com a metodologia de otimização usualmente empregada na rotina de laboratórios que utilizam a técnica de cromatografia líquida de alta eficiente acoplada à espectrometria de massas em série. Além disso, foi desenvolvido um método



de extração com uma eficiência de processo superior a 70% para todos os fármacos.

#### 4. CONCLUSÃO

O emprego de uma estratégia com várias etapas e diferentes critérios de otimização — auxiliada por ferramentas estatísticas oferece uma maneira simples e eficaz de desenvolver métodos bioanalíticos por CLAE-EM/EM. A cromatografia de interação hidrofílica mostrou-se uma ótima alternativa para os fármacos de caráter básico utilizados no presente estudo, gerando retensividade e picos simétricos.

#### 5. REFERÊNCIAS

MCCALLEY, D. V. Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds? *Journal of chromatography*. A, v. 1171, n. 1-2, p. 46–55, 9 nov. 2007.

MCCALLEY, D. V. The challenges of the analysis of basic compounds by high performance liquid chromatography: some possible approaches for improved separations. *Journal of chromatography*. A, v. 1217, n. 6, p. 858–80, 5 fev. 2010.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. Introduction to Modern Liquid Chromatography. Third Edition. 3rd. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, 2010. p. 957.

#### 6. AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo suporte financeiro.



ÁREA DE SUBMISSÃO: CONTROLE DE QUALIDADE E INDÚSTRIA FARMACÊUTICA –  
CQ 16

## UMA ABORDAGEM SOBRE PLANEJAMENTO E CONTROLE DA PRODUÇÃO NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

M. M. V. de SOUZA<sup>1</sup>, P. J. ROLIM NETO<sup>1</sup> e R. M. F. da SILVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas

E-mail para contato: monalisa.macedo@hotmail.com

*RESUMO – O Planejamento e Controle da Produção (PCP) é responsável por planejar, acompanhar e controlar todas as atividades de uma empresa, com a finalidade de otimizar o processo produtivo e atingir máxima eficiência e eficácia da produção. O PCP está presente em todas as etapas da produção e, por esse motivo, todos os setores da empresa devem comunicar-se entre si para manter o fluxo produtivo. Este trabalho teve como objetivo apresentar os conceitos necessários para o entendimento do PCP na indústria farmacêutica. A coleta de dados ocorreu através da pesquisa em diversas bases como LILACS®, SciELO, Medline®, bem como teses, dissertações e livros sobre o assunto, no período entre 2000 e 2016. Para auxiliar o processo de planejamento e controle, existem sistemas de informação que utilizam softwares integradores de informações. Esses programas distribuem os dados coletados de toda a linha de produção e facilitam a visualização da capacidade de produção e estoques da empresa. Todas essas informações possibilitam ao gestor tomar as melhores decisões a fim de garantir o sucesso da empresa. Foi evidenciada a importância de mais estudos sobre PCP na indústria farmacêutica, e a necessidade das empresas investirem em modelos computacionais, e a capacitação do pessoal para a otimização do processo de produção.*

*Palavras-chave: Administração Farmacêutica. Pesquisa Operacional. Produção de Produtos. Tecnologia Farmacêutica.*

*ABSTRACT - Planning and Production Control (PPC) is responsible for planning, monitoring and controlling all activities of a company, in order to optimize the production process and achieve maximum efficiency and effectiveness of production. The PPC is present at all stages of production, and therefore, all sectors of the company must communicate with each other to maintain the production flow. This paper aimed to present the necessary concepts to understand the PPC in pharmaceutical industry. The data were collected through research on different bases as LILACS®, SciELO, Medline®*



*and theses, dissertations and books on the subject, between 2000 and 2016. For the process of planning and control, there are information systems using software integrators of information, these programs distribute the data collected from the entire production line and facilitate the visualization of production capacity and the company's stocks. This information enables the manager to make the best decisions to ensure the company's success. The importance of further studies on PPC in the pharmaceutical industry, and the need for companies to invest in computer models, and personnel training for the optimization of the production process was highlighted.*

*Keywords: Organization and Administration. Pharmacy Administration. Production of Products. Technology, Pharmaceutical.*

## **1. INTRODUÇÃO**

A indústria farmacêutica, responsável por produzir medicamentos e produtos para a saúde, é um setor industrial importante economicamente e socialmente no Brasil e no mundo (Mesquita; Santoro, 2004). E, como toda indústria, necessita de organização e planejamento nos processos de produção, para atender as demandas do mercado. Contudo, o farmacêutico, como responsável, deve saber como administrar adequadamente a empresa.

Uma das ferramentas utilizadas nessa organização é o Planejamento e Controle da Produção (PCP), que direciona a produção, o controle e a distribuição dos insumos produzidos em todos os setores (Morais; Oliveira, 2015) da empresa. É fundamental conhecer os conceitos que servem de base para a utilização do PCP, seus sistemas e etapas, e como estes são aplicados na indústria.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

A coleta de dados ocorreu através da pesquisa em diversas bases como LILACS<sup>®</sup>, SciELO, Medline<sup>®</sup>, bem como teses, dissertações e livros sobre o assunto. Foram usadas as palavras-chave: “administração farmacêutica”, “indústria farmacêutica”, “pesquisa operacional”, “produção de produtos” e “tecnologia farmacêutica”, na língua portuguesa. E na língua inglesa, as palavras-chave utilizadas foram “pharmacy administration”, “drug industry”, “operations research”, “production of products” e “technology, pharmaceutical”. Todos os descritores estão de acordo com o vocabulário da Biblioteca Virtual em Saúde (BVS). Foram considerados os artigos publicados de 2000 a 2016, além de algumas citações mais antigas, porém que são fundamentais para o entendimento do assunto.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O Planejamento e Controle da Produção (PCP) se utiliza de recursos para definir as metas da empresa e garante que essas metas sejam cumpridas de forma eficaz e eficiente, controlando os processos produtivos. Os recursos produtivos devem estar disponíveis na quantidade e momento

adequados, e devem atender um nível adequado de qualidade (Bonney, 2000; Slack *et al.*, 2006).

Como desempenha uma função de coordenação e apoio ao sistema produtivo, o PCP direta ou indiretamente, relaciona-se com praticamente todos os setores deste sistema. Da Engenharia do Produto. são necessárias informações das listas de materiais de desenhos técnicos, da Engenharia de Processo, os roteiros de fabricação e os *lead times*, do *Marketing* os planos de vendas, a Manutenção fornece os planos de manutenção, Compras/Suprimentos informa as entradas e saídas dos materiais em estoques, dos Recursos Humanos os programas de treinamento, em Finanças busca-se o plano de investimentos e o fluxo de caixa, e assim por diante (Molina; Resende, 2006).

No que se refere às atividades do PCP na indústria farmacêutica, um estudo feito por Tosoni *et al.* (2013) verificou uma nítida falta de planejamento em vários setores, a necessidade de aprimorar os setores produtivos da empresa, através de treinamentos de funcionários, investimentos em máquinas e equipamentos e a estruturação de um departamento de PCP. Na empresa, não havia previsão de demanda, planejamento da capacidade, nem planejamento agregado. Com estes resultados, fica evidente a importância do PCP para o funcionamento efetivo da empresa.

Uma pesquisa realizada por Mesquita e Santoro (2004) procurou responder a seguinte questão: “por que as empresas não utilizam métodos estatísticos e modelos de otimização nos processos de planejamento, programação e controle da produção e estoques?”. Os autores concluíram que a utilização de modelos matemáticos na gestão não é muito comum nas empresas do setor. Prevalece a utilização do modelo MRP, o qual é focado na administração de estoques de matérias-primas e embalagens, e uma preocupação maior em investir em tecnologia da informação e na melhoria da previsão de demanda.

Outro estudo, realizado por Morais e Oliveira (2015), foi observado que a utilização do *software* MRP II foi eficiente para o planejamento e controle da produção de uma indústria de genéricos de Minas Gerais, porém, existe uma falha na elaboração das previsões de vendas que afeta diretamente a programação da indústria. Essa deficiência impacta diretamente no PCP, pois a produção e compra de materiais são realizadas a partir das previsões de demanda. Essa deficiência compromete a gestão de estoques e custos.

Coelho e Quelhas (2011) afirmaram que é necessário avaliar a gestão de um número maior de empresas no setor farmacêutico, a fim de comparar a gestão destas indústrias e fazer os ajustes necessários para a melhoria do PCP.

## 4. CONCLUSÃO

Através dos dados obtidos na revisão da literatura, foi possível observar que o tema de planejamento e controle da produção é bastante difundido na administração de empresas. No entanto, é pouco aplicado no setor farmacêutico, existem poucos relatos de empresas que utilizam técnicas de pesquisa operacional, o que acontece na verdade, é uma falta de conhecimento por parte dos administradores das indústrias farmacêuticas acerca dos métodos gerenciais de



implementação do PCP, principalmente no que se refere à utilização de *softwares* de gerenciamento de informações.

Dessa forma, o presente trabalho evidencia a importância dos estudos sobre o PCP com aplicação no setor farmacêutico, e a necessidade das empresas investirem em modelos computacionais e capacitação do pessoal para a otimização do processo de produção.

## 5. REFERÊNCIAS

- BONNEY, M. Reflections on production planning and control (PPC). *Gestão & Produção*, v.7, n.3, p.181-207, dez. 2000.
- COELHO, F. B.; QUELHAS, O. L. G. Análise do ciclo de melhoria na rotina do planejamento e controle da produção: estudo em uma indústria cirúrgico-farmacêutica. In: ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO, 31., 2011. *Anais...* Belo Horizonte: 2011.
- MESQUITA, M. A.; SANTORO, M. C. Análise de modelos e práticas de planejamento e controle da produção na indústria farmacêutica. *Revista Produção*, v. 14, n. 1, São Paulo, 2004.
- MOLINA, C. C.; RESENDE, J. B. Atividades do planejamento e controle da produção (PCP). *Revista Científica Eletrônica de Administração*, n. 11, ano VI, dez. 2006.
- MORAIS, T. T.; OLIVEIRA, S. Análise das atividades de PCP em uma indústria farmacêutica do Centro-Oeste mineiro. *Conexão Ciência: revista científica* da UNIFOR-MG, v. 10, n. 1, p. 01-19. Formiga, jan./jun. 2015.
- SLACK, N. *et al. Administração da produção*. 10 reimpressão. São Paulo: Atlas, 2006. 525 p.
- TOSONI, L. A. *et al.* Análise das funções do planejamento programação e controle da produção - PPCP em uma indústria do segmento farmacêutico natural. In: ENCONTRO NACIONAL DE PRODUÇÃO AGROINDUSTRIAL. 7., 2013. *Anais...* Campo Mourão: 2013.

## 6. AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Tecnologia de Medicamentos (LTM), da Universidade Federal de Pernambuco, pela oportunidade de realizar o estudo, e disponibilizar material de estudo para a realização deste trabalho.



ÁREA DE SUBMISSÃO: CONTROLE DE QUALIDADE E INDÚSTRIA FARMACÊUTICA – CQ 17

## ESTUDO DE VIABILIDADE CELULAR EM LINHAGEM DE MACRÓFAGOS HUMANOS DE SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTENDO HIDRÓXIDO DUPLO LAMELAR E EFAVIRENZ

D.A.F. FONTES<sup>1</sup>, M.A.M. LYRA<sup>1</sup>, L.C.P.B.B. SILVA<sup>1</sup>, C.G. MELO<sup>1</sup>, L.P. SIQUEIRA<sup>1</sup>, T.R.R. TIMÓTEO<sup>1</sup>, M.A. ANGELOS<sup>1</sup>, C.S.B. AGUILERA<sup>1</sup>, J.K.F. ANDRADE<sup>2</sup>, G.C.R.M. SCHVER<sup>3</sup>, L.A. ROLIM<sup>4</sup>, T.G. SILVA<sup>2</sup>, J.L. SOARES-SOBRINHO<sup>5</sup>, S. ALVES-JÚNIOR<sup>6</sup>, P.J. ROLIM-NETO<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos – LTM.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de antibióticos.

<sup>3</sup> Universidade de Toronto, Canadá

<sup>4</sup> Central analítica da UNIVASF

<sup>5</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Farmacêuticas, NCQMC.

<sup>6</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de química fundamental, Laboratório de Terras Raras.

E-mail para contato: rolim.pedro@gmail.com

**RESUMO** – A utilização de hidróxidos duplos lamelares (HDL) associados a moléculas biologicamente ativas vem se tornando uma alternativa promissora para o desenvolvimento de sistemas de administração de fármacos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade, em macrófagos humanos, do Efavirenz (EFZ), antirretroviral pertencente ao sistema de classificação biofarmacêutica II, na qual, uma das características do fármaco é baixa solubilidade. HDL e HDL-EFZ 30%. O EFZ isolado apresentou valor médio de IC<sub>50</sub> de 15,71 µg/mL, enquanto o do sistema HDL-EFZ foi de 20,83 µg/mL, onde proporcionou uma leve redução na toxicidade do insumo farmacêutico ativo.

**Palavras-chave:** Carreador de fármaco, dissolução, citotoxicidade, antirretroviral.

**ABSTRACT** - The use of layered double hydroxides (LDH) associated with biologically active molecules has become a promising alternative for the development of drug delivery systems. The objective of this study was to evaluate the cytotoxicity in human macrophages of Efavirenz (EFZ), an antiretroviral belonging to the biopharmaceutical classification system II, in which one of the characteristics of the drug is low solubility. HDL and HDL-EFZ 30%. The isolated EFZ presented average value of 15.71 IC<sub>50</sub>

*ug/mL, while the LDH-EFZ value was 20,83 $\mu$ g/mL, which provided a slight decrease in toxicity of the active pharmaceutical ingredient.*

*Keywords: Drug carriers, dissolution, cytotoxicity, antiretroviral.*

## 1. INTRODUÇÃO

O Efavirenz (EFV), classificado como fármaco de primeira escolha para o tratamento da AIDS em adultos, apresenta desvantagem da sua solubilidade, pois se enquadra na classe II do sistema de classificação biofarmacêutica, ou seja, fármacos dessa classe apresentam baixa solubilidade e alta permeabilidade (Sathigari *et al.*, 2009).

Os hidróxidos duplos lamelares (HDL), apresentam propriedades promissoras para serem utilizados como carreadores de fármacos, pois possuem baixa toxicidade, alta biocompatibilidade, alta capacidade de inserção de substâncias biologicamente ativas, extensa área superficial disponível para adsorção, podem promover aumento da estabilidade das espécies inseridas e promoção de sua liberação prolongada (Cunha *et al.*, 2010). O objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade do EFZ e HDL isolados, e a associação HDL-EFZ, frente à linhagem de macrófagos.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a obtenção do CaAl-HDL, foi realizada uma adaptação do método proposto por Shafiei e colaboradores (2013), através de síntese por coprecipitação. A obtenção do sistema HDL-EFZ foi realizada pelo método descrito por Takahashi & Yamaguchi (1991), onde sistemas HDL:EFZ contendo 10, 20, 30, 50, 60 e 70% do fármaco disperso no carreador (m/m) foram obtidas em acetona.

Foram realizados testes de liberação das amostras para se obter o sistema mais promissor, em termos de solubilização do EFZ. O estudo de liberação foi realizado em condições non-sink, utilizando o equipamento Sirius T3 (Sirius Analytical Instruments Ltda.) e espectrômetro Sirius D-PAS. Os sistemas testados continham o equivalente a 5mg do fármaco, que foram adicionados ao meio tampão Sirius (Sirius Analytical Instruments Ltda), e, em intervalos determinados, foram realizadas leituras da absorbância do fármaco.

A citotoxicidade do sistema em células foi determinada pelo ensaio de redução de MTT, com linhagem de células de macrófagos, mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100  $\mu$ g/mL de estreptomicina, a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram semeadas em placas de 96 poços (100  $\mu$ L = 10<sup>5</sup> cells/mL) com EFZ (0,78125-100  $\mu$ g/mL), HDL (3,125-400  $\mu$ g/mL) e HDL-EFZ 30% (0,78125-100  $\mu$ g/mL de EFZ e 1,8203125-233  $\mu$ g/mL de HDL) dissolvido em DMSO (dimetilsulfóxido) na proporção (1:99 v/v). Após 72h de contato das células com os compostos, o sobrenadante foi aspirado e adicionados 25  $\mu$ L de solução de MTT (5mg/mL), sendo as demais, células, descartadas. As placas foram deixadas por 3 horas em estufa 37°C e ao final desse período, 100  $\mu$ L de DMSO foi adicionado a cada poço para a dissolução dos cristais de Formazam. A absorbância média foi mensurada a 540 nm em espectrofotômetro (Modelo 3550 BIORAR, Inc).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudo de dissolução, em condições *non-sink*, vem sendo comumente aplicado para sistemas contendo fármacos de baixa solubilidade complexadas com carreadores que incrementam solubilização. Sun, Ju e Lee (2012) afirmam que esta condição permite visualizar eventos de supersaturação, nucleação e cristalização do fármaco em solução, além de ser uma simulação do sistema fisiológico, mais adequada do que a condição sink, devido ao pequeno volume encontrado no trato gastrointestinal.

O perfil de dissolução do EFZ, mistura física e sistemas HDL:EFZ em diferentes concentrações. Após duas horas de análise, o EFZ atingiu uma concentração de  $32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  no meio de dissolução, sendo os demais sistemas comparados a este valor para se obter a proporção do incremento da solubilidade do fármaco no meio.

Os sistemas formados por HDL e EFZ (10, 20 e 30%), foram os que obtiveram melhores resultados no estudo de dissolução. O sistema HDL:EFZ 30% foi o que mais se destacou, como pode ser observado na figura 1, proporcionando ao EFZ um incremento de solubilidade de aproximadamente 558%, quando comparado ao fármaco isolado, após duas horas de dissolução, sendo este, eleito para o estudo de citotoxicidade.

Além do sistema HDL-EFZ 30%, avaliou-se também o EFZ e o HDL isolados, a fim de se obter a citotoxicidade destes insumos separadamente. O EFZ isolado apresentou valor médio de IC<sub>50</sub> de  $15,71 \mu\text{g}/\text{mL}$  ( $13,3-18,45 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), como pode ser observado na figura 2, enquanto o do sistema HDL-EFZ foi de  $20,83 \mu\text{g}/\text{mL}$  ( $19,12-22,71 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), como pode ser observado na figura 3. Este resultado demonstra que a associação proporcionou uma leve redução na toxicidade do insumo farmacêutico ativo. O HDL isolado não apresentou toxicidade nas concentrações e linhagem de células utilizadas, apresentando segurança no uso dessa substância, conforme a figura 4.

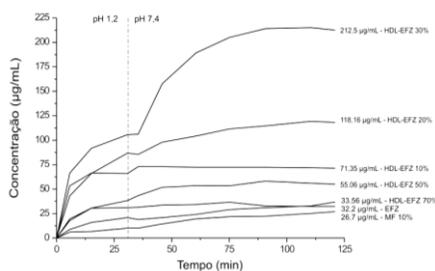


Figura 1 – Perfil de dissolução do EFZ isolado e seus sistemas HDL-EFZ e MF.

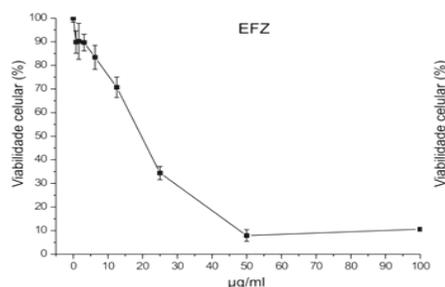
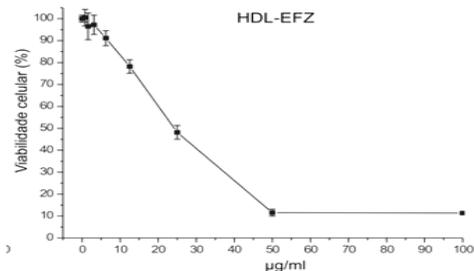


Figura 2 – Viabilidade celular de macrófagos humanos frente ao EFZ.



4.

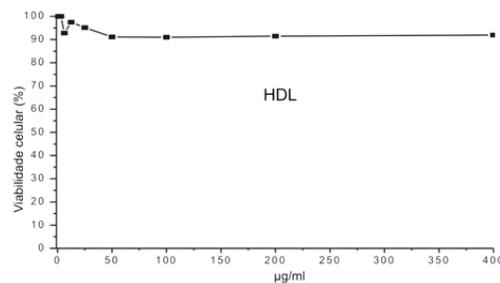


Figura 3 – Viabilidade celular de macrófagos humanos frente ao HDL-EFZ.

Figura 4 – Viabilidade celular de macrófagos humanos frente ao HDL-EFZ.

## 4. CONCLUSÃO

Os sistemas HDL:EFZ 30% apresentou um elevado incremento de solubilidade, com grande potencial para aplicação em medicamentos, devido a seu baixo índice de toxicidade, inclusive menos tóxico do que o fármaco isolado, além do HDL isolado, também, mostrar-se atóxico nas concentrações testadas.

## 5. REFERÊNCIAS

- CUNHA, V. R. R.; *et al.* Hidróxidos duplos lamelares: nanopartículas inorgânicas para armazenamento e liberação de espécies de interesse biológico e terapêutico. *Quím. Nov.*, v. 33, p. 159-171, 2010.
- KARAVAS, E.; *et al.* Investigation of the release mechanism of a sparingly water-soluble drug from solid dispersions in hydrophilic carriers based on physical state of drug, particle size distribution and drug-polymer interactions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 66, p. 334-347, 2007.
- SATHIGARI, S.; *et al.* Physicochemical Characterization of Efavirenz- Cyclodextrin Inclusion Complexes. *AAPS PharmSciTech*, v. 10, p. 81-87, 2009.
- SUN, D. D.; JU, T. R.; LEE, P. I. Enhanced Kinetic Solubility profiles of indomethacin amorphous solid dispersions. In poly (2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 81, p. 149-158, 2012.
- TAKAHASHI, T.; YAMAGUCHI, M. Host-Guest Interaction swelling clay minerals and poorly water-soluble drugs. 1: Complex formation between a swelling clay mineral and griseofulvin. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.*, v. 10, p. 283-297, 1991.

## 6. AGRADECIMENTOS

À FACEPE, Laboratório de Tecnologia de Medicamentos e laboratórios parceiros: Departamento de antibióticos, Universidade de Toronto, Central analítica da UNIVASF, NCQMC e Laboratório de Terras Raras.



**GESTÃO, ECONOMIA E SAÚDE**



ÁREA DE SUBMISSÃO: GESTÃO, ECONOMIA E SAÚDE - GE 4

## FATORES RELACIONADOS COM O AUMENTO DO GASTO PÚBLICO COM MEDICAMENTOS

J. N. DOS SANTOS<sup>1</sup>, M. PITTA<sup>2</sup>, D. CHAVES<sup>3</sup>, M. REGO<sup>4</sup>, D. VIANA<sup>5</sup>, B. ARAÚJO<sup>6</sup>, T. MENEZES<sup>7</sup>

<sup>1 2 3 4 5 6</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica  
Suely Galdino

<sup>7</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Economia  
E-mail para contato: joycenuneslucena@hotmail.com

**RESUMO** – *O objetivo do trabalho foi identificar quais os fatores podem estar relacionados ao aumento de gastos com medicamentos públicos. A revisão da literatura foi adotada como método de agrupamento dos dados e de síntese do conhecimento acerca da temática proposta. A análise dos dados coletados na literatura possibilitou a identificação de fatores endógenos e exógenos que influenciam o incremento dos gastos públicos com medicamentos, sendo que os fatores endógenos estão ligados diretamente ao ciclo da assistência farmacêutica e poderão ser monitorados e gerenciados principalmente pelo nível local, regional e municipal, em contraposição aos fatores exógenos que perpassam a governabilidade destes entes e deverão ser acompanhados e discutidos pela esfera estadual e federal.*

*Palavras-chave: Gastos com medicamentos. Assistência Farmacêutica. Economia da Saúde.*

**ABSTRACT:** The objective was to identify which factors may be related to increased spending on public drug. The literature review was adopted as data clustering method and synthesis of knowledge about the proposed theme. The analysis of data collected in the literature allowed the identification of endogenous and exogenous factors that influence the growth of public spending on drugs, It is that endogenous factors are directly linked to the cycle of pharmaceutical care and can be monitored and managed mainly by local, regional and municipal level, as opposed to exogenous factors that overpass the governance of these entities and should be monitored and discussed by the state and federal level.

*Keywords: drug expenditures. Pharmaceutical Care Health. Health Economics.*



## 1. INTRODUÇÃO

A publicação da Política Nacional de Medicamentos no Brasil em 1998 fomentou a criação de programas voltados à garantia do acesso aos medicamentos à população. (Vieira, 2009).

Se de um lado o acesso a medicamentos é fundamental na garantia do direito constitucional à saúde, por outro, tornou-se motivo de preocupação pela evolução dos gastos. Estudo realizado em 2007 mostrou descompasso do crescimento entre gastos com saúde e com medicamentos na esfera federal. Para o Ministério da Saúde, enquanto os gastos totais com saúde aumentaram em 9,6%, aqueles com medicamentos tiveram incremento de 123,9% no período de 2002 a 2006 (Viera, 2009).

No Canadá, o gasto total com medicamentos aumentou 11% em 2005, chegando a 24,8 bilhões de dólares. Foi a segunda maior despesa, ficando atrás apenas dos gastos com os hospitais e mantendo-se em patamar mais elevado que os gastos com médicos desde 2000 (Canadian Medical Association Journal, 2006).

No Reino Unido, país que tem modelo de atenção à saúde focado na atenção primária, o gasto com medicamentos neste nível de complexidade cresceu 10% entre 2001 e 2002 e provocou uma crise de financiamento. Quatro classes terapêuticas foram responsáveis por 25% do incremento: antidiabéticos (33%); anti-hipertensivos (18%); antipsicóticos (32%) e hipoglicemiantes (23%). (Macdonald, 2003).

Um estudo realizado no Município de Fortaleza em 2007 mostrou que as classes terapêuticas com maior representatividade dos gastos com medicamentos para a atenção primária neste período foram: antibacterianos sistêmicos (18,8% do total dos gastos), seguido por antidiabéticos (9,4% hipoglicemiantes orais) e anti-hipertensivos com ação no sistema renina-angiotensina (8,6%, sendo 8,2% somente o captopril). (Chaves, 2009).

O acesso aos medicamentos depende de um financiamento sustentado (Who, 2001). Ao se definir a política de Assistência Farmacêutica (AF) e os medicamentos a serem disponibilizados nos diferentes programas de saúde, em qualquer uma das instâncias gestoras do SUS, deverão ser assegurados os recursos financeiros que viabilizem as ações e a sua continuidade considerando os fatores que podem elevar os gastos com medicamentos pelo sistema de saúde. (Brasil, 2007).

Neste contexto este trabalho propõe levantar quais fatores podem estar relacionados ao aumento de gastos com medicamentos com o objeto de propor novas discussões, monitoramento e estratégias para a sustentabilidade financeira dos medicamentos públicos seja na esfera local, regional, municipal, estadual e federal.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

A revisão da literatura foi adotada como método de agrupamento dos dados e de síntese do

conhecimento acerca da temática proposta, a fim de responder a seguinte questão norteadora: Quais os fatores influenciam o aumento dos gastos com medicamentos? Dentre eles quais são os fatores internos e externos que podem influenciar o ciclo da assistência farmacêutica?

Concernentemente às definições de Cooper (1984) foram seguidas: formulação do problema; levantamento dos dados; análise dos dados e apresentação dos resultados.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A literatura indica diversos fatores que influenciam o aumento dos gastos com medicamentos, dentre os quais podemos citar os fatores ligados diretamente ao ciclo da assistência farmacêutica: i) fatores relacionados à regulação de mercado, processos de aquisição, etc; ii) acesso à serviços de saúde e medicamentos; iii) ampliação das listas de medicamentos; iv) mudanças nos padrões de prescrição e dispensação de medicamentos; v) número e diversidade dos prescritores, assim como outros fatores externos que também influenciam no ciclo da AF, a) população: mudanças no tamanho e distribuição; b) expectativa e comportamento dos usuários e adesão ao tratamento; c) surgimento de novas doenças e epidemias; d) ciência e tecnologia com novas abordagens terapêuticas; e) indústria farmacêutica: desenvolvimento de novos produtos (novas concentrações, formas farmacêuticas e apresentações); f) propaganda e marketing para profissionais de saúde e usuários; g) política macroeconômica.

A figura 01 apresenta de forma esquemática os principais fatores que podem influenciar o aumento dos gastos com medicamentos.





## 4. CONCLUSÃO

A análise dos dados coletados na literatura possibilitou a identificação de fatores endógenos e exógenos que influenciam o incremento dos gastos públicos com medicamentos, sendo que os fatores endógenos estão ligados diretamente ao ciclo da assistência farmacêutica e poderão ser monitorados e gerenciados principalmente pelo nível local, regional e municipal, em contraposição aos fatores exógenos que perpassam a governabilidade destes entes e deverão ser acompanhados e discutidos pela esfera estadual e federal.

Portanto, cabe frisar que definições de estratégias mais amplas de impacto nacional como a regulação de compras públicas por meio da definição de preço máximo para aquisição de medicamentos devem ser pautadas. Assim como, o fomento ao desenvolvimento da capacidade produtiva da indústria nacional de fármacos de base química com fortalecimento de laboratórios públicos na produção de linhas de medicamentos padronizados pelo SUS e o seu papel de regulação no mercado.

## 5. REFERÊNCIAS

- BRASIL. Conselho Nacional de Secretários de Saúde. Assistência Farmacêutica no SUS. Coleção Progestores – Para entender a gestão do SUS, 7, Brasília, DF, 2007. 186 p.
- CANADIAN INSTITUTE FOR HEALTH INFORMATION. Drug expenditure in Canada 1985 to 2006. Ottawa, 2007.
- COOPER, H. M. The integrative research review: a systematic approach. Beverly Hills: Sage, 1984.
- CHAVES, E.S. Gastos com medicamentos distribuídos em atenção primária de saúde em Fortaleza- CE e co-fatores influentes no ano de 2007. 2009. 161p. Dissertação (Mestrado de Ciências Farmacêuticas) - **Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, 2009.
- MACDONALD, S.; Increased drug spending is creating funding crisis, report says. *BMJ.*, v.326,n.7391, p.677, 2003, DOI: 10.1136/bmj.326.7391.677.
- VIEIRA, F.S. Gasto do MS com medicamentos: tendência dos programas de 2002 a 2007. *Rev. de Saúde Pública*, São Paulo, v. 43, n.4, p.674-81, 2009.
- WHO. How to develop e implement National Drug Policy: update and replaces: guidelines for developing national drug policies. 2. ed. Geneva, 2001.

## 6. AGRADECIMENTOS

Ao apoio e investimento realizado pelo Departamento de Economia do Ministério da Saúde ao Programa de Pós-graduação em Gestão e Economia da Saúde na UFPE.

ÁREA DE SUBMISSÃO: GESTÃO, ECONOMIA E SAÚDE - GE 8

## CUSTO DO CUIDADO ESPECIALIZADO EM PRÁTICAS INTEGRATIVAS E COMPLEMENTARES NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE

M. C. T. ASSUNÇÃO<sup>1</sup>; A. F. B. BEZERRA<sup>1</sup>; C. M. F. AQUINO<sup>2</sup>; I. M. C. SOUSA<sup>3</sup>; V. P. JORDÃO<sup>1</sup>; M. R. CARVALHO NETO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

<sup>2</sup>Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco – SES-PE

<sup>3</sup>Centro de Pesquisa Ageu Magalhães – CpqAM/Fiocruz

E-mail para contato: cesar\_tabosa7@hotmail.com

*RESUMO – O objetivo do estudo foi analisar os custos de um serviço especializado em Práticas Integrativas e Complementares (PICs) no nordeste brasileiro, com o intuito de fornecer dados acerca da implantação, manutenção e dimensionamento de serviços dessa natureza e quantificar o custo por usuário para o SUS. Trata-se de uma avaliação econômica do tipo parcial, com caráter descritivo, de natureza quantitativa. Os dados foram coletados por meio de informações secundárias e agrupados em planilhas do Excel. O método utilizado foi o de custeio por absorção, a partir do qual o serviço foi dividido em três centros de custeio: produtivo, administrativo e auxiliar. A análise dos dados evidencia que houve 34.521 atendimentos e o custo total do serviço foi estimado em R\$ 1.270.015,70 em 2014, desse montante, 79,69% foram classificados como custos diretos. O custo médio por usuário neste período foi R\$ 34,78, considerando práticas individuais e coletivas. Conclui-se que o serviço apresenta um custo por usuário compatível com um serviço especializado. Os valores são equivalentes aos encontrados nos serviços biomédicos de média complexidade, no entanto, as PICs apresentam um paradigma caracterizado pela abordagem integral e holística do usuário.*

*Palavras-chave: Terapias Complementares; Economia da Saúde; Contabilidade de Custos.*

*ABSTRACT – Study aim was to analyze an ICP center, located in Brazil northeast, and to provide knowledge of management and costs involved, and individual cost per user. This is a partial economic evaluation, with descriptive and quantitative variables. Data collected were secondary information, later grouped in Excel spreadsheets. Costs*

*were analyzed by absorption costing, and the service was divided in three centers: productive, administrative and support. Data analysis points to a total of 34.521 consults, and estimated cost of R\$ 1,270,015.70 in 2014. Of that amount, 79,69% were direct costs. Average cost per patient was R\$ 34.78, considering both individual and collective practices as a form of consult. Results of costs assessment are equivalent to those found in traditional practices at the same complexity level of care, however ICP offer a comprehensive and holistic approach.*

*Keywords: complementary therapies; health economics; accounting.*

## 1 INTRODUÇÃO

As Práticas Integrativas e Complementares (PICs) são utilizadas para manutenção, prevenção e recuperação da saúde desde a antiguidade. No início, sua utilização era baseada em conhecimentos empíricos que eram repassados de geração em geração. Atualmente, suas propriedades terapêuticas foram reconhecidas e já fazem parte do rol de terapias respaldadas por leis.

Diante dessa realidade, o estudo em questão vislumbra fornecer dados financeiros consistentes acerca do serviço de PICs no Sistema Único de Saúde (SUS), e dessa maneira contribuir para consolidar a institucionalização da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) que foi implantada há dez anos. O intuito é apurar os custos do serviço, como estes são distribuídos e qual o custo do usuário de PICs para o SUS, por meio do estudo da unidade especializada em PICs Centro de Práticas Integrativas Equilíbrio do Ser (CPIES).

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

O campo da pesquisa é o CPIES, localizado na cidade de João Pessoa-PB. Trata-se de uma unidade de referência e pioneirismo em PICs nessa região, tem caráter público, vinculado ao SUS, com administração e gestão municipal.

Trata-se de uma avaliação econômica do tipo parcial, com caráter descritivo, de natureza quantitativa (UGÁ, 2002). O método selecionado foi o de custeio por absorção, no qual a divisão do objeto de estudo em centros de custeio é imprescindível. O uso do custeio por absorção é justificado pelo Programa Nacional de Gestão de Custos (PNGC) para apuração de custos no setor público, inclusive na área da saúde.

Todos os custos foram classificados de acordo com seus critérios de alocação em diretos e indiretos. Após a absorção de todos os custos para o serviço prestado, foi calculado o custo do atendimento de PICs ao usuário do CPIES no ano de 2014. Nas práticas coletivas, cada grupo terapêutico foi estimado em 10 usuários por terapeuta. Essa estimativa foi realizada de acordo com a observação direta dos pesquisadores e por meio dos relatos dos profissionais da unidade.

Os dados foram inseridos em planilhas eletrônicas do Microsoft Excel (2010)<sup>®</sup> e agrupados nos respectivos centros de custeio. Após essa etapa, os custos foram analisados em relação ao quantitativo de usuários atendidos durante o mesmo período.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde/UFPE, sob o número de CAEE 07270212400005208. A coleta de dados foi realizada mediante

anuência da Secretaria Municipal de Saúde da cidade de João Pessoa-PB, considerando todos os preceitos éticos e legais vigentes.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O serviço em questão foi dividido em três centros de custeio: o produtivo, o auxiliar e o administrativo. Os custos diretos foram subdivididos em Recursos Humanos (RH) (92,30%), representando uma parcela importante dos custos no CPIES, o que reflete a realidade da maioria dos serviços de saúde, depreciação de equipamentos e móveis (1,36%) e materiais (Tabela 1).

Tabela 1 – Custos diretos do Centro de Práticas Integrativas Equilíbrio do Ser. João Pessoa/PB. 2014.

CUSTOS DIRETOS	Subtotal mensa (R\$)	Subtotal anual (R\$)	Subtotal (%)	
			anual	acumulado
<b>1 Recursos Humanos</b>	77.847	934.173	92,30%	92,30%
<b>2 Depreciação de móveis, máquinas e equipamentos</b>	1.149	13.797	1,36%	93,66%
<b>3 Material de consumo</b>	5.347	64.169	6,34%	100%
<b>4 TOTAL</b>	84.346	1.012.140	100%	100%

Fonte: Elaborado pelos autores

Os custos indiretos totalizaram R\$ 257.875,25 no ano de 2014. Desse montante, 86,76% compreende os custos prediais, nos quais o maior impacto está relacionado à depreciação do imóvel. Oprédio teve o valor estimado em R\$ 2.738.190,00, levando em consideração a taxa de depreciação para esse tipo de investimento em 4%, o custo do imóvel foi de R\$ 109.527,60 no ano de 2014.

Os custos prediais também são representados por despesas com água/esgoto e energia elétrica que foram estimados em R\$ 114.221,76 nesse período. Despesas relacionadas ao IPTU e coleta de lixo também fazem parte dos custos prediais, entretanto, nesse estudo tais custos foram desconsiderados, visto que o CPIES é isento desses impostos por se tratar de uma instituição pública (Tabela 2).

Tabela 2 – Custos indiretos do Centro de Práticas Integrativas Equilíbrio do Ser. João Pessoa/PB. 2014.

CUSTOS INDIRETOS	Subtotal mensa (R\$)	Subtotal anual (R\$)	Subtotal (%)	
			Anual	acumulado
<b>1 Recursos Humanos</b>	2.626,66	31.520,00	12,22%	12,22%
<b>2 Custos prediais</b>	18.645,61	223.747,32	86,76%	98,98%
<b>3 Depreciação móveis, máquinas equipamentos</b>	59,32	711,93	0,27%	99,25%
<b>4 Material de consumo</b>	58,00	1.896,00	0,75%	100%
<b>TOTAL</b>	21.489,59	257.875,25	100%	100%

Fonte: Elaborado pelos autores

O custo total de prestação de serviços do CPIES foi de R\$ 1.270.015,70 no ano de 2014, com custo mensal médio de R\$ 105.834,64. Considerando a distinção entre práticas individuais e coletivas, o usuário do serviço teve um custo médio de R\$ 36,79 no ano de 2014 (Tabela 3). No estudo em uma maternidade de Santa Catarina, com metodologia semelhante (Custeio por Absorção), foi estimado o custo de uma consulta ambulatorial de média complexidade em R\$ 36,24 (Raupp *et al.*, 2007). Vale salientar as peculiaridades inerentes aos dois estudos, como critérios de rateios, complexidade dos serviços e geração de demandas complementares para cada serviço estudado.

Tabela 3 – Custo do atendimento por usuário de práticas individuais e coletivas, considerando 10 usuários por prática coletiva. Centro de Práticas Integrativas Equilíbrio do Ser. João Pessoa/PB.

Tipos de Atendimentos	Quantidade de atendidos	usuári	Custos por categoria (R\$)	Custos por usuário atendido (R\$)
Práticas Individuais	8.042		888.629,98	110,49
Práticas Coletivas	2.647x10=26.470		381.385,71	14,40
<b>Total</b>	34.512		1.270.015,70	36,79 (Custo médio)

Fonte: Elaborado pelos autores

## 4 CONCLUSÃO

O serviço tem como característica a baixa densidade tecnológica e matéria-prima que requer pouco dispêndio de recursos financeiros. Esse dado foi constatado com a análise dos materiais de investimento e materiais de consumo do centro de custeio produtivo, sendo constatado que o impacto financeiro maior é causado pelos recursos humanos.

O resultado da avaliação do custo precisa considerar o modo de abordagem integral e holístico adotado no campo das PICs. Estudos sobre custo-efetividade podem contribuir para ampliar e contextualizar as características do cuidado em saúde nesse campo. Avaliações econômicas como a de custo-efetividade, que tem o intuito de aferir a relação entre o que se gasta e a efetividade das PICs para o usuário do SUS, é uma abordagem a ser considerada como recomendação.

A consolidação de políticas inovadoras, como a PNPIC, é influenciada diretamente com a divulgação acerca das indicações e efetividade das mesmas. O intuito é ampliar o número de usuários e profissionais que conhecem os benefícios dessa prática. Iniciativas como essas podem diluir o custo por usuário de PICs, visto que unidades dessa natureza apresentam um custo fixo alto. Nesse sentido, a análise de custos do CPIES proporcionou dados contábeis que servirão como ferramenta gerencial e contábil, sempre levando em consideração o paradigma antiprodutivista das PICs. Além disso, esse estudo poderá subsidiar os gestores no dimensionamento de custos para implantação e manutenção de serviços dessa natureza nas diferentes esferas administrativas.

## 5 REFERÊNCIAS

RAUPP, F. M; CRISPIM, C. H; ALMEIDA, E. S.V. Gestão de Custos Hospitalares por Meio do Custeio por Absorção: o caso da Maternidade Carmela Dutra. *Revista de Informação Contábil*, Recife, v. 2, n. 1, p. 120-133, 2007.



SOUSA, I. M. CARVALHO; BODSTEIN, R. C. A; TESSER, C. D; SANTOS, F. A. S; HORTALE, V. A. Práticas integrativas e complementares: oferta e produção de atendimentos no SUS e em municípios selecionados. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 28, n. 11, p. 2143-2154, 2012.

UGÁ, M. A. D. Instrumentos de avaliação econômica dos serviços de saúde: alcances e limitações. In: Piola SF, Vianna SM. *Economia da saúde*. 3ª ed. Brasília: IPEA; 2002.

## **6 AGRADECIMENTO**

Ao Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq

ÁREA DE SUBMISSÃO: GESTÃO, ECONOMIA E SAÚDE - GE 15

## GESTÃO DE CUSTOS NA REDE DE ATENÇÃO À SAÚDE: ESTUDO DE CASO DE UMA UNIDADE DE CUIDADOS INTEGRAIS, RECIFE/PE

M. R. de CARVALHO NETO<sup>1</sup>, A. F. B. BEZERRA<sup>1</sup>, C. M. F. de AQUINO<sup>2</sup>, I. M. C. de SOUSA<sup>3</sup>, V. P. JORDÃO<sup>1</sup>, M. C. T. ASSUNÇÃO<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

<sup>2</sup> Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco – SES-PE

<sup>3</sup> Centro de Pesquisa Ageu Magalhães – CpqAM/Fiocruz

E-mail para contato: manoineto.ufpe@gmail.com

*RESUMO – A gestão dos recursos escassos em saúde no Brasil não é um assunto novo e sempre gera discussões sobre a busca de políticas consistentes no controle dos custos geridos pelo Estado. O estudo objetiva avaliar a gestão de custos de uma unidade especializada em práticas integrativas do Recife, através de uma pesquisa quantitativa, descritiva e analítica, do tipo avaliação econômica parcial, fazendo uso do custeio por absorção. O estudo evidenciou que as práticas coletivas quando comparadas com as individuais, são menos onerosas e que o custo final do usuário da UCISGA se apresenta baixo e com um modelo diferenciado de atendimento a seus usuários, quando comparado a outras unidades da atenção básica do município.*

*Palavras-chave: Economia da Saúde. Gastos em Saúde. Terapias Complementares.*

*ABSTRACT – The management of scarce resources in health in Brazil is not a new issue and always raises questions about the pursuit of consistent policies to control costs managed by the state. The study aims to evaluate costs management of a specialized unit in integrative practices of Recife, through a quantitative, descriptive and analytical research, a partial economic evaluation, making use of absorption costing. Study showed that collective practices are less costly when compared to individual ones, and the UCISGA user final cost presented is low, and presents a differentiated service model to its user when compared to other primary care units in the municipality.*

*Keywords: Health Economics. Health Expenditures. Complementary Therapies.*

### 1. INTRODUÇÃO



No momento atual, em que as Práticas Integrativas e Complementares (PICs) ainda se consolidam na atenção básica no que se refere a sua institucionalização, foi desenvolvida a presente pesquisa com o intuito de gerar conhecimento capaz de qualificar os dados ofertados pelas unidades e aperfeiçoar sua gestão de custos na rede de atenção à saúde, em específico no desenvolvimento e consolidação das PICs.

Um dos aspectos que motivaram a realização deste estudo foi à insuficiência de pesquisas realizadas e dados bem estruturados que ajudem a sistematizá-los, contribuindo para pesquisadores da área da Economia da Saúde e demais gestores, na formulação de estratégias, políticas de desenvolvimento e manutenção dos custos destas atividades nas unidades de saúde na rede de atenção básica.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

Os dados foram coletados com a colaboração da Secretaria de Saúde do Município do Recife, junto ao seu Setor de Contabilidade e Custos, que disponibilizou de sua base de dados os demonstrativos financeiros dos itens de gastos da Unidade de Cuidados Integrals à Saúde Prof. Guilherme Abath (UCISGA), do exercício contábil do ano de 2014, para o Grupo de pesquisa em economia política da saúde – GPEPS (UFPE).

O estudo desenvolvido é caracterizado como quantitativo, descritivo e analítico, do tipo avaliação econômico parcial, fazendo-se necessário a definição de um método de custeio para nortear a execução dos cálculos em busca dos resultados almejados, que para esse fim, o método escolhido foi o custeio por absorção.

O local de estudo foi a Unidade de Cuidados Integrals Prof. Guilherme Abath (UCISGA), onde o atendimento sistemático em práticas integrativas é realizado. O período de coleta iniciou-se a partir do final do segundo semestre de 2015 para o primeiro semestre de 2016, com a entrega do demonstrativo dos itens de gastos da UCISGA (dados secundários).

Os dados foram processados em planilhas do Microsoft Excel®, e analisados, o que facilitou os diversos cálculos de custos, bem como a melhor identificação dos itens de gastos nos centros de custeio. As planilhas foram preenchidas registrando os dados dos itens de gastos informados, apresentando o custo total da unidade, o custo de cada centro, o custo unitário dos itens e o peso percentual dos centros de custeio no custo total da unidade.

As informações de proporcionalidade de consumo de cada centro foram definidas através de consulta a um ator chave da unidade pesquisada, que orientou no estabelecimento dos percentuais de consumo de cada centro de custo.

Desta forma, foi possível verificar o quanto representou percentualmente cada centro de custo do valor de toda unidade, antes e depois da alocação dos itens de rateio. Com o resultado dos valores de rateio por centro de custo, pode-se calcular o valor definitivo dos centros de custeio da unidade e, posteriormente, qual o percentual de aumento existente após as alocações dos rateios.

De posse dos dados de custos e do número de usuários atendidos nas práticas individuais e coletivas, o custo unitário é calculado a partir da divisão do custo total dos centros geradores de gasto, pelo número de usuários atendidos no período pretendido.



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os serviços desenvolvidos na unidade foram divididos nos seguintes centros: a) Centro Produtivo ou de Medicina Alternativa, conforme denominação da Secretaria Municipal de Saúde/PCR, é composto pelos profissionais envolvidos e especializados em práticas integrativas e complementares no atendimento dos usuários das PICs na UCISGA; b) Centro Administrativo, composto pelos profissionais envolvidos nas atividades de rotina administrativa, recepção e controle da unidade e c) Centro de Apoio ou Auxiliar, composto pelos profissionais especializados nas atividades de suporte nos serviços de limpeza, de conservação e de vigilância patrimonial.

Em seu estudo sobre o levantamento dos custos das principais atividades de saúde de duas unidades de saúde da família, Rocha Filho (2009) utilizando o método de custeio por absorção, identificou quatro centros de custos distintos nestas unidades e os classificou da seguinte maneira: assistenciais, apoio, geral e administrativo/gastos gerais, o que trás proximidade com os resultados encontrados nesta pesquisa.

Os itens de custo classificáveis em diretos e indiretos foram reconhecidos quanto sua origem e atividade geradora e separados de acordo com sua classificação, permitindo que seus valores fossem agrupados por categoria de custo. No que se diz respeito aos custos diretos, destacam-se os custos dos serviços de limpeza com um valor de R\$ 55.225,14 (4,80% do custo total da unidade), os serviços de vigilância com um valor de R\$ 122.221,20 (10,64% do custo total da unidade) e os salários dos funcionários lotados na administração e no centro de produtivo, no valor de R\$ 833.970,53 representando 72,62% do custo total da unidade.

Os custos diretos, relacionados à produção de cada centro, totalizam um percentual de 93% dos custos de toda unidade, enquanto que os custos indiretos, itens destinados ao rateio entre os centros, totalizam um percentual de 7% de seu valor total.

Alguns estudos têm adotado, para uma melhor compreensão sobre a identificação e divisão dos gastos quanto sua origem, a formação de grupos de gastos distintos. Estes após a separação podem ser apropriados diretamente aos centros de custos de origem definidos (Raupp; Crispim; Almeida, 2007; Tasso, 2015).

No que tange aos critérios de rateio, estudo realizado sobre gestão de custos aplicada a hospitais universitários públicos, comparando o método de absorção com outros métodos existentes, reforça que critérios de rateio devem possibilitar a distribuição dos custos indiretos com bom senso e uniformidade, pois uma mudança de critério de rateio altera diretamente na apuração dos resultados (Bonacim e Araujo, 2010).

Por não haver uma regra rígida, mas com a preocupação de se evitar escolhas arbitrárias que comprometessem o resultado final da pesquisa, o procedimento adotado, foi o rateio dos itens de gasto perante aos centros de custo de forma proporcional a sua utilização.

O Centro Administrativo obteve, após os rateios, um acréscimo de 19,88%, representando 15% do valor total da unidade. O Centro Apoio/Auxiliar sofreu um acréscimo de 11,35%, representando posteriormente 18% do valor total da unidade. Por fim, o Centro Produtivo passou por acréscimo de 3,38%, representando posteriormente 67% do valor total da unidade.

Dentre as diversas práticas oferecidas na unidade, destaca-se a maior procura por práticas individuais em relação às coletivas, aproximadamente 71,76% de todas as práticas. O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em pesquisas realizadas sobre as PICs no Brasil



constatou que o norte do país é a região que mais utiliza estas práticas, em especial tratamentos individuais como acupuntura, homeopatia, uso de plantas medicinais e fitoterapia, entre outros. O estado de Rondônia foi o primeiro lugar com 16,8% de sua população fazendo uso de alguma prática integrativa e complementar.

Ao comparar a quantidade de atendimentos na UCISGA, as práticas individuais superam às coletivas. Contudo, quando se leva em consideração que as práticas coletivas ofertadas na unidade possuem uma maior quantidade de usuários, mínimo de oito participantes para a formação de um grupo, esta então passa a ser superior em relação às práticas individuais.

O somatório dos valores obtidos nos centros de custos foi utilizado no cálculo do valor unitário, sendo dividido o valor total da unidade pelo número de atendimentos e usuários atendidos em todo ano de 2014. O montante de R\$ 35,87 foi o valor obtido por usuário atendido e R\$ 110,75 por atendimento realizado na unidade.

#### 4. CONCLUSÃO

Os resultados desta pesquisa evidenciaram que as práticas coletivas quando comparadas com as individuais, são menos onerosas, visto que mais usuários podem ser atendidos em uma única atividade; e que o custo do usuário da UCISGA, mesmo quando comparado com outras unidades distintas quanto a sua finalidade dentro da atenção básica, se apresenta baixo e com um modelo de atendimento a seus usuários diferenciado, buscando a manutenção da saúde de maneira integral, preventiva e duradora, sem maximização do número de atendimentos.

Desta forma, almeja-se que as informações de custos geradas com esta pesquisa contribuam não só com o monitoramento dos custos internos da unidade, mas, também para definir linhas de ações gerenciais mais amplas, efetivas, com a padronização destes métodos de gestão de custos que procuram subsidiar a redução do consumo e a criação de indicadores econômico-financeiros e de desempenho.

#### 5. REFERÊNCIAS

- BONACIM, C. A. G; ARAÚJO, A. M. P. Gestão de custos aplicada a hospitais universitários públicos: a experiência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Ribeirão Preto da USP. *Revista de Administração Pública*, Rio de Janeiro, v. 44, n. 4, p. 903-931, ago. 2010.
- ROCHA FILHO, F. S.; SILVA, M. G. C. Análise de custos com pessoal e produtividade de equipes do programa de saúde da família em Fortaleza, Ceará. *Ciência e Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro, v. 14, n. 3, p. 919-928, 2009.
- RAUPP, F. M; CRISPIM, C. H; ALMEIDA, E. S.V. Gestão de Custos Hospitalares por Meio do Custeio por Absorção: o caso da Maternidade Carmela Dutra. *Revista de Informação Contábil*, Recife, v. 2, n. 1, p. 120-133, 2007.
- TASSO, E. S. H. *Custos da Estratégia de Saúde da Família em Novo Xingu - RS, 2014*. Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Escola de Administração. Curso de especialização em Gestão em Saúde (UAB). Serafina Correa, 2015. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/130255>. Acesso em: 21 de maio de 2016.

#### 6. AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq



**PESQUISA CLÍNICA E  
PRÉ-CLÍNICA**

ÁREA DE SUBMISSÃO: PESQUISA CLÍNICA E PRÉ-CLÍNICA – PC 3

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNORREGULADORA *IN VITRO* DO DERIVADO TIAZOLIDÍNICO LPSF/CR-35

A.R. ALMEIDA<sup>1</sup>, M.C.P.D. SAMPAIO<sup>1</sup>, A.T. DANTAS<sup>1,2</sup>, M.F. CORDEIRO<sup>1</sup>, M.C. PEREIRA<sup>1</sup>, M.J.B.M. RÊGO<sup>1</sup>, I.R. PITTA, A.L.B.P. DUARTE<sup>2</sup>, M.G.R. PITTA<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino, Universidade Federal de Pernambuco.

<sup>2</sup>Hospital das Clínicas de Pernambuco, Universidade Federal de Pernambuco.

E-mail para contato: andersonr.almeida@hotmail.com

**RESUMO-** *As tiazolidinodionas (TZDs) são ligantes sintéticos do PPAR- $\gamma$ , utilizadas no tratamento do diabetes mellitus tipo II por apresentarem efeitos hipoglicemiantes e propriedades antiinflamatórias, por meio da regulação de diversos mediadores das respostas imunes. Apesar dos benefícios oferecidos pelas TZDs, o uso prolongado dessas moléculas está associado com o desenvolvimento de diversos efeitos adversos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade imunorreguladora de um novo derivado tiazolidínico (LPSF/CR-35). O LPSF/CR-35 promoveu aumento dos níveis das quimiocinas CXCL-9/MIG ( $p=0,0078$ ) e CXCL-10/IP-10 ( $p=0,0078$ ).*

*Palavras-chave: PPAR- $\gamma$ . Tiazolidinodionas. Imunorregulação.*

**ABSTRACT-** *Thiazolidinediones (TZDs) are PPAR- $\gamma$  synthetic ligands used in type II diabetes mellitus treatment for their hypoglycemic effects and anti-inflammatory properties, by regulating several immune response mediators. Despite the benefits offered by TZDs, the prolonged use of these molecules is associated with various adverse effects such. The aim of this study was to evaluate a new thiazolidine immunoregulatory activity (LPSF/CR-35). The LPSF / CR-35 promoted increased levels of chemokines CXCL-9/MIG ( $p=0,0078$ ) e CXCL-10/IP-10 ( $p=0,0078$ ).*

*Keywords: PPAR- $\gamma$ . Thiazolidinediones. Immunoregulation.*

## 1.INTRODUÇÃO

As tiazolidinodionas (TZDs), também chamadas de glitazonas, são fármacos utilizados no tratamento do diabetes mellitus tipo 2 devido seus efeitos hipoglicemiantes. As TZDs são ligantes do PPAR- $\gamma$ , e promovem a regulação de genes específicos que estão envolvidos em várias funções, como diminuição de resistência à insulina, inflamação, angiogênese, níveis de leptina, indução de diferenciação de adipócitos e aumento dos níveis de adiponectina. (Chang *et al.*, 2013; Tontonoz & Spiegelman, 2008; Frohlich & Wahl, 2015).

Apesar das TZDs apresentarem tantos efeitos benéficos, estudos mostraram que o uso desses fármacos pode trazer alguns efeitos indesejados. Um dos mais frequentes efeitos colaterais das glitazonas é o edema, que pode ser prevenido com o uso de diuréticos. Já foi relatada também uma

correlação positiva entre o uso de TZDs e o desenvolvimento de insuficiência cardíaca (Chang *et al.*, 2013).

As quimiocinas são citocinas com capacidade quimiotática, fazem parte de uma família de proteínas que atuam principalmente na ativação e migração de leucócitos, embora algumas delas apresentem outras funções. Para o desenvolvimento de respostas inflamatórias é necessário que os leucócitos estejam na localização exata em tempo hábil, e o sistema de quimiocinas fornece estímulos para o recrutamento de células efetoras e reguladoras e é central para a patogênese de doenças inflamatórias (Zhang & An, 2007).

Tendo vista o potencial terapêutico da TZDs é de extrema importância o desenvolvimento de estudos que busquem a descoberta de novas moléculas que possam trazer os benefícios oferecidos por essa classe de fármacos e menos efeitos adversos. O presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade imunorreguladora de um novo derivado tiazolidínico (LPSF/CR-35).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. DERIVADO TIAZOLIDÍNICO

Os derivado tiazolidínico 3-(4-Bromo-benzyl)-5-(3-bromo-benzylidene)-thiazolidine-2,4-dione (LPSF/CR-35) foi sintetizado no Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF) do Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco (NUPIT-UFPE) e gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta para os ensaios biológicos *in vitro*.

### 2.2. CULTURA DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO

O isolamento das células mononucleares do sangue periférico foi realizado utilizando Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare). Foram realizadas culturas de oito voluntários saudáveis. As PBMCs isoladas foram contadas e colocadas na quantidade de  $1 \times 10^6$  em placas de 24 poços em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SBF (Gibco), HEPES 10mM (Gibco) e penicilina e estreptomicina 200 U/mL (Gibco). As células foram cultivadas com ou sem os anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 e o derivado tiazolidínico LPSF/CR-35 (100 $\mu$ M). A metilprednisolona (MP) foi utilizada como controle anti-inflamatório na dose de 100 $\mu$ M. Estas células foram cultivadas em estufa de CO<sub>2</sub> 5% a 37°C por 48h. Após esse período, as placas foram centrifugadas (350g, 15 minutos, aceleração 6, freio 4) e o sobrenadante recolhido e armazenado a -30°C para posterior dosagem de quimiocinas.

### 2.3. DOSAGEM DE QUIMIOCINAS

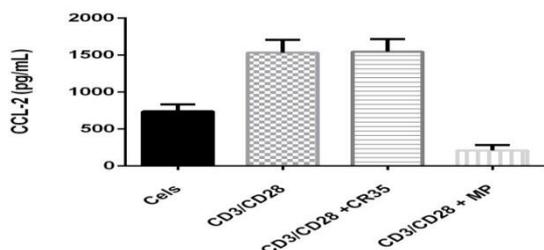
As quimiocinas do sobrenadante das culturas foram quantificadas por Cytometric Bead Array (CBA), um imunoenensaio realizado através de estruturas denominadas beads (microesferas de poliestireno) conjugadas a anticorpos de alta afinidade. Foi utilizado o BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Chemokine Kit, que permite a dosagem das quimiocinas CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES, CXCL9/MIG, CCL2/MCP-1 e CXCL10/IP-10. Foram seguidas todas as instruções do fabricante.

### 2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

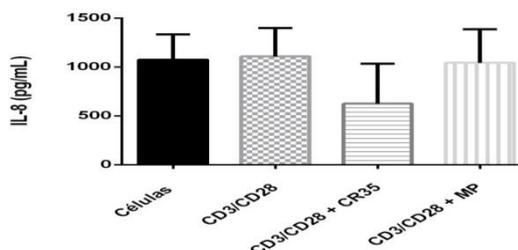
As análises foram realizadas com o software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Para comparação dos níveis de citocinas entre duas condições foi utilizado o teste Wilcoxon's signed rank. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes.

### 3.RESULTADOS

Para a quimiocina CCL-2, foi possível observar que o LPSF/CR-35 não promoveu nenhuma alteração dos níveis dessa quimiocina quando comparado com a condição estimulada (Figura 1). Após o tratamento com os estímulos (anti-CD3/anti-CD28) e com o fármaco utilizado como controle positivo (metilprednisolona), os níveis da quimiocina IL-8 permaneceram iguais a condição sem tratamento. Apesar dessas observações, o LPSF/CR-35 conseguiu diminuir a produção da quimiocina quando comparado com as demais condições, mas a redução não foi significativa (Figura 2).

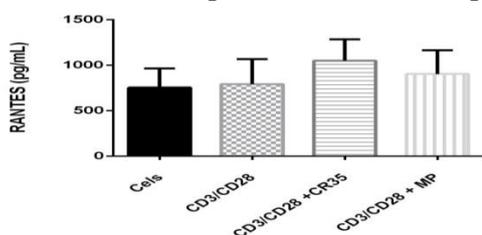


**Figura 1.** Níveis de CCL-2 em sobrenadante de culturas de PBMC's tratadas com o LPSF/CR-35 na dose de 100µM (n=8). [CD3/CD28: estímulos; MP: metilprednisolona; CR35: derivado tiazolidínico]

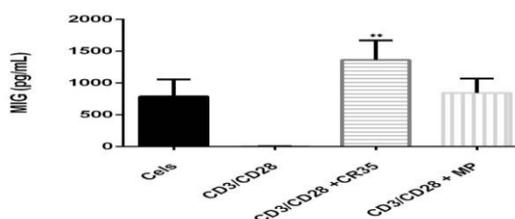


**Figura 2.** Níveis de IL-8 em sobrenadante de culturas de PBMC's com o LPSF/CR-35 na dose de 100µM (n=8) [ CD3/CD28: estímulos; MP: metilprednisolona;

Quando comparado a condição estimulada, o LPSF/CR-35 aumentou os níveis da quimiocina RANTES, mas esse aumento não foi estatisticamente significativo. A condição de metilprednisolona também estimulou o aumento da quimiocina (Figura 3). Os níveis da quimiocina MIG foram aumentados na condição tratada com o composto LPSF/CR-35 quando comparada com a condição estimulada, sendo esse aumento estatisticamente significativo ( $p=0,0078$ ). A condição com os estímulos (anti-CD3/anti-CD28) promoveu a diminuição da quimiocina. A metilprednisolona teve efeito similar ao composto LPSF/CR-35, promovendo aumento da quimiocina MIG (Figura 4).

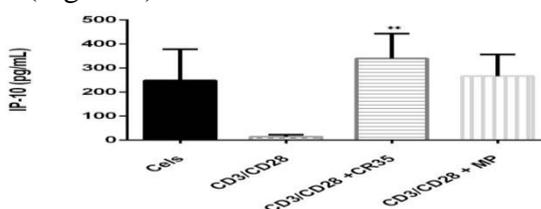


**Figura 3.** Níveis de RANTES em sobrenadante de culturas de PBMC's tratadas com o LPSF/CR-35 na dose de 100µM (n=8). [ CD3/CD28: estímulos; MP: metilprednisolona; CR35: derivado tiazolidínico] .



**Figura 4.** Níveis de MIG em sobrenadante de culturas de PBMC's tratadas com o LPSF/CR-35 na dose de 100µM (n=8). [ CD3/CD28: estímulos; MP: metilprednisolona; CR-35: derivado tiazolidínico].

O tratamento com o LPSF/CR-35 estimulou a produção da quimiocina IP-10. Os níveis da quimiocina foram aumentados significativamente na condição tratada com o composto em comparação com a condição estimulada ( $p=0,0078$ ). De forma semelhante, a metilprednisolona promoveu o aumento da IP-10 (Figura 5).



**Figura 5.** Níveis de IP-10 em sobrenadante de culturas de PBMC's tratadas com o LPSF/CR-35 na dose de 100µM (n=8). [CD3/CD28: estímulos; MP: metilprednisolona] \*\*=p<0,01.

## 4.DISCUSSÃO

O derivado tiazolidínico LPSF/CR-35 promoveu alterações nos níveis das quimiocinas. O tratamento com o composto levou ao aumento significativo das quimiocinas CXCL-9/MIG e CXCL-10/IP-10, de forma semelhante ao observado com a metilprednisolona, que foi usada como controle positivo. Uma observação interessante foi a diminuição significativa dos níveis das quimiocinas CXCL-9/MIG e CXCL-10/IP-10 após o estímulo com anti-CD3/CD28. Esse achado pode ter sido consequência da produção dessas quimiocinas por outros tipos celulares, como monócitos, células dendríticas e linfócitos B (Antonelli *et al.*, 2014; Berthoud *et al.*, 2009; Whiting *et al.*, 2004), já que os estímulos com anti-CD3/CD28 são específicos para as células T. O aumento observado nos níveis das quimiocinas CXCL-9/MIG e CXCL-10/IP-10 após o tratamento com o LPSF/CR-35 retornou esses níveis para o estado basal, o que sugere que o LPSF/CR-35 estimulou as células produtoras dessas quimiocinas. Entretanto, o desenho experimental do nosso estudo não permitiu identificar quais as células produtoras dessas quimiocinas, uma vez que não foi realizada imunofenotipagem. Houve ainda aumento nos níveis da quimiocina CCL-5/RANTES, porém não foi significativo. A quimiocina CXCL-8/IL-8 foi regulada negativamente após o tratamento com o LPSF/CR-35, no entanto a redução não foi significativa estatisticamente.

A regulação dos níveis das quimiocinas promovida pelo LPSF/CR-35 é de grande importância, visto que várias doenças, como algumas doenças autoimunes e inflamatórias crônicas, apresentam expressão alterada destas proteínas.

## 5.CONCLUSÃO

O derivado tiazolidínico LPSF/CR-35 apresentou atividade imunorreguladora, promovendo aumento nos níveis das quimiocinas CXCL-9/MIG e CXCL-10/IP-10.

## 6.REFERÊNCIAS

- CHANG, E.; PARK, C.; PARK, S. W. Role of thiazolidinediones, insulin sensitizers, in non-alcoholic fatty liver disease. *J Diabetes Invest*, doi: 10.1111/jdi.12107, 2013.
- FRÖHLICH, E.; WAHL, R. Chemotherapy and Chemoprevention by Thiazolidinediones. *BioMed Research International*, doi: 845340, p.14, 2015.
- ANTONELLI, A.; FERRARI, S. M.; GIUGGIOLI, D.; FERRANNINI, E.; FERRI, C.; FALLAHI, P. Chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)10 in autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews* 13 (2014) 272–280.
- BERTHOUD, T. K., DUNACHIE, S. J.; TODRYK, S.; HILL, A. V.S.; FLETCHER, H. A. MIG (CXCL9) is a more sensitive measure than IFN $\gamma$  of vaccine induced T cell responses in volunteers receiving investigated malaria vaccines. *J Immunol Methods*, 1; 340(1): 33–41, 2009.
- TONTONOZ, P. & SPIEGELMAN, B.M. Fat and beyond: the diverse biology of PPAR $\gamma$ . *Annu Rev Biochem*, 77:289-312, 2008.
- ZHANG, J.; AN, J. Cytokines, Inflammation and Pain. *International Anesthesiology Clinics*, 45(2): 27-37, 2007.

## 7. AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT\_if).



ÁREA DE SUBMISSÃO: PESQUISA CLÍNICA E PRÉ-CLÍNICA – PC 6

## AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA INTERLEUCINA-22 COMO UM BIOMARCADOR PARA A ARTRITE REUMATÓIDE

P. R. G. CARDOSO<sup>1</sup>, K. M. VILAR<sup>1</sup>, A. T. DANTAS<sup>2</sup>, L. F. R. JUNIOR<sup>2</sup>, M. J. B. M. RÊGO<sup>1</sup>, M. C. PEREIRA<sup>1</sup>, I. R. PITTA<sup>1</sup>, C. D. L. MARQUES<sup>2</sup>, A. L. B. P. DUARTE<sup>2</sup>, M. G. R. PITTA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas  
E-mail para contato: prgc@outlook.com

**RESUMO** – A Artrite Reumatóide é uma doença inflamatória crônica, que acomete aproximadamente 1% da população mundial, principalmente entre as mulheres. É uma doença progressiva, sem cura, que afeta o bem-estar do paciente. O envolvimento do sistema imune é crucial para o desenvolvimento e agravamento da doença. Um desequilíbrio na resposta Th1/Th17/Th22 está intimamente relacionado com a piora do quadro clínico. A IL-22 é uma citocina que na AR atua como pró-inflamatória. Atualmente a pesquisa clínica volta-se para a descoberta de um biomarcador que possa ajudar no diagnóstico mais rápido e preciso. Cento e setenta e dois pacientes AR e sessenta e oito controles saudáveis participaram do estudo. A IL-22 foi mensurada no soro dos voluntários. Foram encontrados altos níveis de IL-22 no soro de pacientes com AR e baixo em controles saudáveis. Dos pacientes com AR, 170 foram positivos para IL-22 e apenas 2 negativos, já os controles saudáveis a IL-22 foi positiva apenas em 1 dos 68. A sensibilidade e especificidade da IL-22 para AR foram encontradas e mostraram 98,8% e 98,5% respectivamente de chances da IL-22 elevada no soro indicar um paciente com AR.

**Palavras-chave:** Artrite Reumatóide, IL-22, Biomarcador

**ABSTRACT** – Rheumatoid arthritis is a chronic inflammatory disease that affects approximately 1% of the world's population, especially women. It is a progressive disease, without a cure, that affects the patient's well-being. The involvement of the immune system is crucial for the development and worsening of the disease. An imbalance in the Th1/Th17/Th22 response is closely related to worsening of the clinical condition. IL-22 acts in RA as a proinflammatory cytokine. Clinical research now turns to the discovery of a biomarker for the AR diagnosis. One hundred and seventy-two RA patients and sixty-eight healthy donors participated in the study. IL-22 was measured in the serum of the all volunteers. High levels of IL-22 were found in the serum of patients with RA and



*low levels in healthy donors. In RA group, 170 were positive for IL-22 and only 2 negative, whereas healthy controls only in 1 was positive of the 68 volunteers. The sensitivity and specificity of IL-22 for AR were found and shows 98.8 % And 98.5% respectively of the chances of elevated IL-22 in the serum indicate a patient with RA.*

*Keywords: Rheumatoid Arthritis, Interleukin-22, Biomarker*

## 1. INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica que afeta aproximadamente 1% da população geral, predominantemente no sexo feminino, associada com dano articular progressivo e irreversível e com um aumento significativo da mortalidade e redução da qualidade de vida (Symmons e Gabriel, 2011). Na AR ocorre quebra do equilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, com predomínio de resposta Th1/Th17/Th22 (Bettelli *et al.*, 2006). Recentemente o papel da via Th22 e da citocina IL-22 vem sendo discutido e apontado como responsável no agravamento da condição da AR (Zhang *et al.*, 2011). A IL-22 está aumentada no soro de pacientes com AR e associada com o dano ósseo-cartilaginoso (Leipe *et al.*, 2011; Da Rocha *et al.*, 2012) e pode ser um alvo terapêutico (Xie *et al.*, 2012). A IL-22 promove ainda a ativação de sinoviócitos derivados de fibroblastos em cultura, atuando no mecanismo de inflamação do tecido cartilaginoso (Zhu *et al.*, 2015). Alguns biomarcadores são propostos em conjunto no diagnóstico da AR, seja na cartilagem (Bender *et al.*, 2010) ou soro, como é o caso do Anti-CCP (Yousefghahari *et al.*, 2013). Com isso, o trabalho objetivou estudar a sensibilidade e a especificidade da Interleucina 22 no soro de pacientes com AR como um possível marcador para a doença em questão.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

A avaliação clínica e convite de participação dos voluntários, além da coleta de material biológico, foram realizadas no ambulatório de artrite reumatoide do Serviço de Reumatologia do HC-UFPE. A amostra do trabalho foi composta por 170 indivíduos com AR e 68 voluntários sadios (Controles). O soro foi obtido após coleta e centrifugação de sangue periférico dos participantes. Para avaliação da IL-22 sérica foi utilizado kit ELISA (eBiosciences), do tipo sanduíche, instruções de acordo com o fornecido. A estatística utilizada foi pelo teste de Mann-Whitney, que é um teste não paramétrico aplicado para duas amostras independentes e o teste de Fischer, o qual compara todos pares de médias, e controla a taxa de erro ao nível de significância para cada comparação 2x2. A curva ROC foi realizada para o cálculo da sensibilidade, especificidade e área sob curva (AUC) da IL-22. Para as análises descritas foram usados os programas GraphPad Prism versão 6.01 e o MedCalc versão 16.8.4. A aprovação do CEP é a de número CCAE-0260.0.172.0011.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cento e setenta voluntários diagnosticados com AR e sessenta e oito voluntários controles aceitaram participar do estudo. Os pacientes com AR foram diagnosticados pela avaliação do DAS28 e/ou CDAI. Os voluntários controles precisavam ser maiores de 18 anos, não ter nenhuma

manifestação imunossupressora ou doenças imunomediadas. A avaliação clínica dos pacientes com AR pode ser observada na Tabela 1. Os resultados são apresentados em média e desvio padrão ou mediana, máxima e mínima.

Tabela 1 – Dados clínicos e laboratoriais dos voluntários com diagnóstico de AR

PARÂMETROS CLÍNICOS	MEDIANA (MÍNIMA – MÁXIMA)
Sexo m/f (n)	12/160
Idade	56 (25 – 78)
VSH	36 (1 – 125)
CDAI	17,4 (0 – 62)
DAS28	4,65 (0 – 7,84)

A citocina IL-22 foi dosada por ELISA nos voluntários com AR 95,5 pg/mL (7,8 – 3670) e Controles 8,5 pg/mL (7,8 – 57,3). O teste estatístico utilizado foi o Mann-Whitney com  $P < 0,0001$  com gráfico expresso na Figura 1.

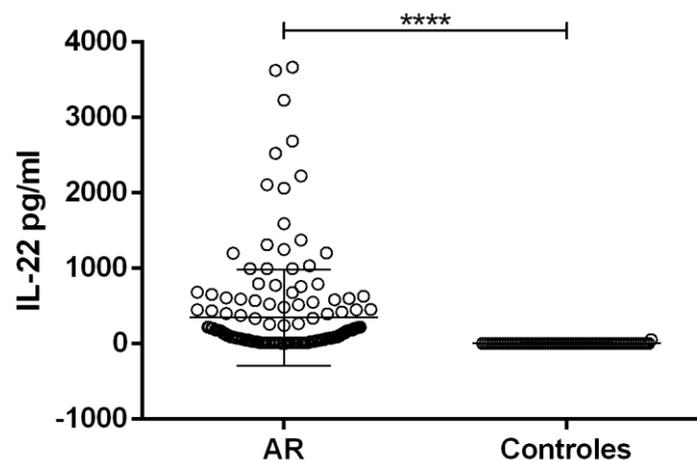


Figura 1 – Níveis de IL-22 se mostram elevados em pacientes com AR, mas não em voluntários controles saudáveis ( $P < 0,0001$ ).

Com isso, foram avaliadas as chances dos pacientes diagnosticados com AR e os controles de apresentarem ou não IL-22+ no soro, com a sensibilidade e especificidade da IL-22+. É possível observar que a maioria dos pacientes com AR (169) apresentaram níveis positivos para IL-22 corroborando com estudos anteriores que encontraram níveis elevados de IL-22 no soro de AR (Leipe *et al.*, 2011; Da Rocha *et al.*, 2012). A AUC foi 0.98 ( $P < 0,0001$ ) usando o ponto de corte de 57 pg/mL, consequentemente a sensibilidade da IL-22 para AR foi então de 62,94% e a especificidade foi de 98,53%. Ainda não há estudos apontando a IL-22 como marcador da AR, apenas como alvo de tratamento (Xie *et al.*, 2012), pois a IL-22 é sugestiva de contribuir para a patogênese da AR (Zhao *et*



al., 2013).

#### 4. CONCLUSÃO

A IL-22 está presente no soro de pacientes com AR. A IL-22 mostra sensibilidade de 62,94% e a especificidade foi de 98,53% com AUC 0,98 para o limite de corte de 57 pg/mL em pacientes com AR. Mais estudos são necessários para comparar a especificidade da IL-22 na AR contra outras doenças imunomediadas.

#### 5. REFERÊNCIAS

- BENDER, A. L. et al. High specificity but low sensitivity of the cartilage oligomeric matrix protein (COMP) test in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin Chem Lab Med*, v. 48, n. 4, p. 569-70, Apr 2010. ISSN 1437-4331.
- BETTELLI, E. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, v. 441, n. 7090, p. 235-8, May 2006. ISSN 1476-4687.
- DA ROCHA, L. F. et al. Increased serum interleukin 22 in patients with rheumatoid arthritis and correlation with disease activity. *J Rheumatol*, v. 39, n. 7, p. 1320-5, Jul 2012. ISSN 0315-162X.
- LEIPE, J. et al. Interleukin 22 serum levels are associated with radiographic progression in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, v. 70, n. 8, p. 1453-7, Aug 2011. ISSN 1468-2060.
- SYMONS, D. P.; GABRIEL, S. E. Epidemiology of CVD in rheumatic disease, with a focus on RA and SLE. *Nat Rev Rheumatol*, v. 7, n. 7, p. 399-408, May 2011. ISSN 1759-4804.
- XIE, Q.; WANG, S. C.; LI, J. Interleukin 22, a potential therapeutic target for rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, v. 39, n. 11, p. 2220; author reply 2221, Nov 2012. ISSN 0315-162X.
- YOUSEFGHAHARI, B. et al. Comparison of sensitivity and specificity of anti-CCP and anti-MCV antibodies in an Iranian cohort of patients with rheumatoid arthritis. *Caspian J Intern Med*, v. 4, n. 3, p. 702-6, 2013. ISSN 2008-6164.
- ZHANG, L. et al. Elevated Th22 cells correlated with Th17 cells in patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Immunol*, v. 31, n. 4, p. 606-14, Aug 2011. ISSN 1573-2592.
- ZHAO, L. et al. IL-22+ CD4+ T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis*, v. 16, n. 5, p. 518-26, Oct 2013. ISSN 1756-185X.
- ZHU, J. et al. Interleukin-22 Secreted by NKp44+ Natural Killer Cells Promotes Proliferation of Fibroblast-Like Synoviocytes in Rheumatoid Arthritis. *Medicine (Baltimore)*, v. 94, n. 52, p. e2137, Dec 2015. ISSN 1536-5964.

#### 6. AGRADECIMENTOS

FACEPE; CNPq; INCT\_if; CAPES



ÁREA DE SUBMISSÃO: PESQUISA CLÍNICA E PRÉ-CLÍNICA – PC 7

## AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO COLÁGENO TIPO I EM PACIENTES PORTADORES DE PSORÍASE

S. K. S. de PAULA<sup>1</sup>, P. S. S. de OLIVEIRA<sup>1</sup>, W. L. M. de OLIVEIRA<sup>1</sup>, E. V. de A. LIMA<sup>2</sup>, M. M. D de A. LIMA<sup>2</sup>, A. L. B. P. DUARTE<sup>1,2</sup>, M. J. B. de M. RÊGO<sup>1</sup>, M. C. PEREIRA<sup>1</sup>, I. da R. PITTA<sup>1</sup>, M. G. da R. PITTA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino

<sup>2</sup> Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco

E-mail para contato: kalebe.sva@gmail.com

**RESUMO** – A Psoríase é uma doença inflamatória e crônica da pele. O colágeno tipo I, cujas subunidades são codificadas pelos genes *COL1A1* e *COL1A2*, vem sendo implicado na patogênese da doença. O objetivo do trabalho foi avaliar a expressão desses genes em pacientes psoriáticos e correlacioná-la aos parâmetros clínicos. Foram recrutados 23 pacientes do HC-UFPE. A expressão gênica foi avaliada após a realização de uma biópsia, seguida da extração do RNA e síntese de cDNA. A PCR foi realizada pelo método TaqMan<sup>®</sup> e a expressão relativa calculada pela fórmula  $2^{-\Delta ct}$ . A análise das correlações foi feita através do teste de Spearman, no software GraphPad<sup>®</sup> 6.0. As biópsias analisadas mostraram aumento na expressão dos genes avaliados, mas apenas o *COL1A2* apresentou correlação significativa com um dos parâmetros clínicos – o tempo de doença ( $r = 0,459$ ;  $p = 0,027$ ).

**ABSTRACT** – Psoriasis is a chronic inflammatory disease of the skin. *COL1A1* and *COL1A2* genes encodes type I collagen subunits and have been implicated in the pathogenesis of the disease. The aim was to evaluate the expression of these genes in psoriatic patients and correlate them with clinical parameters. We recruited 23 patients of the HC-UFPE. RNA was isolated and reverse transcribed after performing a biopsy. qPCR was performed by using predesigned Taqman probes and relative expression was determined by  $2^{-\Delta ct}$ . The analysis of the correlations was made using the Spearman test, GraphPad<sup>®</sup> 6.0 software. The biopsies analyzed showed increased expression of genes evaluated, but only the *COL1A2* significantly correlated with clinical parameters - disease duration ( $r = 0.459$ ;  $p = 0.027$ ).

**Key words:** psoriasis, biopsy, qPCR, *COL1A1*, *COL1A2*



## 1. INTRODUÇÃO

A Psoríase é uma doença inflamatória e crônica da pele, cuja principal manifestação é o aparecimento de lesões eritematosas e descamativas, que resultam da proliferação desordenada dos queratinócitos (Weger, 2010). Recentemente algumas moléculas foram associadas a imunopatogênese da doença, como o colágeno tipo I. Foram evidenciados níveis aumentados dos transcritos dos genes que codificam as subunidades do colágeno em pacientes psoriáticos (Süçürü *et al.*, 2015).

Apesar dos avanços no tratamento, não existem biomarcadores de predição, diagnóstico e resposta ao tratamento utilizados na rotina médica (Villanova *et al.*, 2013). Neste contexto, o objetivo deste trabalho é investigar o potencial do colágeno tipo I como biomarcador da doença, através da avaliação da expressão dos genes Col1A1 e Col1A2 em amostras de pele de pacientes psoriáticos e da correlação desta expressão com os parâmetros clínicos “idade”, “tempo de doença” e “PASI” (Índice de Gravidade da Psoríase por Área).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Comitê de ética e recrutamento dos pacientes

O Projeto foi submetido e aprovado pelo COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS (CEP/CCS/UFPE parecer 723.390). Foram recrutados 23 pacientes com diagnóstico de psoríase, de ambos os sexos, atendidos no Ambulatório de Psoríase do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco.

### 2.3. Biópsia de pele e extração de RNA

Os pacientes foram submetidos à biópsia de pele com *punch* de 4 mm. O RNA total das biópsias foi extraído e processado de acordo com o protocolo RNeasy® Mini Kit (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante.

### 2.4. Síntese de cDNA e PCR em tempo real

O DNA complementar foi sintetizado a partir do kit High-capacity cDNA archive Kit 2X (Applied Biosystems) com concentração máxima de RNA de 500 ng/μL. A quantificação dos transcritos foi feita através de PCR em tempo real, pelo método das sondas de hidrólise TaqMan® (Applied Biosystems) no aparelho StepOnePlus™ (Life Technologies). A expressão relativa dos genes foi calculada através da fórmula  $2^{-\Delta ct}$ , e o gene de referência na comparação da expressão foi o 18S.

### 2.7. Análise estatística

A correlação não-paramétrica de Spearman foi utilizada para analisar as correlações entre a expressão dos genes e os parâmetros clínicos. A significância estatística considerada foi igual

ou menor que 0.05 ( $p \leq 0.05$ ). Todos os testes foram realizados pelo *software* GraphPad Prism® 6.01.

### 3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Descrição clínica dos pacientes

Dos 23 pacientes participantes, 13 eram do sexo masculino e 10 do sexo feminino, sendo a média de idade entre eles igual a 52,8 anos. A média do tempo de doença entre os pacientes foi de 8 anos. Quatro pacientes possuem PASI leve e 19 possuíam PASI moderado-grave. Um total de 10 pacientes apresentavam comorbidades associadas no momento da coleta de dados, sendo 4 portadores de hipertensão arterial, 3 de diabetes, 2 de dislipidemias e 1 de artrose. Onze dos vinte e três voluntários estavam sob tratamento sistêmico com o metotrexato.

#### 3.2. Expressão Gênica

Foram observados níveis elevados dos transcritos avaliados em uma parcela dos pacientes. A **Figura 1** representa a expressão gênica de cada molécula em relação ao gene de referência 18S.

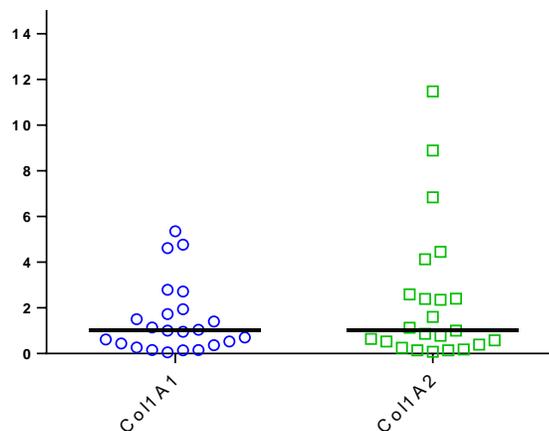


Figura 1 – Expressão relativa de Col1A1 e Col1A2 em comparação ao gene 18S.

#### 3.3. Correlação entre o perfil de expressão gênica e os parâmetros clínicos

A **Tabela 1** expressa o coeficiente de correlação de Spearman entre os genes avaliados e os parâmetros clínicos “idade”, “PASI” e “tempo de doença”. O gene Col1A1 não apresentou correlação significativa com os parâmetros. Já o gene que codifica a subunidade  $\alpha 2$  do colágeno tipo I demonstrou correlação significativa ( $r = 0,459$ ;  $p = 0,027$ ) com o tempo de doença.

Tabela 1 – Correlação entre a expressão gênica e os parâmetros clínicos.

Gene	Idade		PASI		Tempo de Doença	
Col1A1	r 0,305	p 0,156	r 0,029	p 0,894	r 0,037	p 0,865
Col1A2	r 0,217	p 0,318	r 0,351	p 0,099	<b>r 0,459</b>	<b>p 0,027</b>

Vários pacientes apresentaram expressão relativa elevada dos genes avaliados. A evidência de que a degradação e síntese *de novo* do colágeno tipo I estejam aumentados na psoríase já foi demonstrada por Kamleh e colaboradores (2014). Confirmando nossos resultados, Sücürü e outros (2015) detectaram quantidades elevadas dos transcritos desses genes e da proteína final em pacientes psoriáticos.

O gene COL1A2 apresentou correlação significativa ( $p = 0,027$ ) com o tempo de doença, mas é importante atentar para o fato de que o coeficiente de correlação obtido ( $r = 0,459$ ) reflete uma correlação moderada. É provável que os pacientes que apresentaram expressão de COL1A2 igual a 8 e 12, aproximadamente, tenham tendenciado o resultado do teste. Sendo assim, é necessário que novos pacientes sejam recrutados para comprovar a existência dessa possível correlação e se ela é realmente moderada.

#### 4. CONCLUSÃO

Nosso estudo mostrou expressão relativa aumentada de genes codificadores do colágeno tipo I em biópsias de pacientes portadores de psoríase. Apenas o gene Col1A2 apresentou correlação estatisticamente significativa com um dos parâmetros clínico – tempo de doença.

#### 5. REFERÊNCIAS

- KAMLEH, M. D.; SNOWDEN, S. G.; GRAPOV, D. LC-MS metabolomics of psoriasis patients reveals disease severity-dependent increases in circulating amino acids that are ameliorated by anti-TNF $\alpha$  treatment. *J Proteome Res*, v. 14(1), p. 557-66, 2014.
- SÜCÜRÜ, H. A.; AKSOY, N.; OZGÖZTAS, O.; SEZEN, H.; YESILOVA, Y.; TURAN, E. Prolidase activity in chronic plaque psoriasis patients. *Postep Derm Alergol*, v. 2, p. 82–87, 2015.
- VILLANOVA, F.; MEGLIO, P. D.; NESTLE, F. O. Biomarkers in Psoriasis and Psoriatic Arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 72, p. 104-110, 2013.
- WEGER, W. Current status and new developments in the treatment of psoriasis and psoriatic arthritis with biological agents. *British Journal of Pharmacology*, v. 160, p. 810–820, 2010.

#### 6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT\_if) pelo apoio financeiro.



ÁREA DE SUBMISSÃO: PESQUISA CLÍNICA E PRÉ-CLÍNICA – PC 8

## DERIVADOS HÍBRIDOS DO INDOL-TIOFENO COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA PARA TRATAMENTO DE CÉLULAS DE LEUCEMIA AGUDA RESISTENTE

M. W. L. QUIRINO<sup>1</sup>, L.V.N. CARVALHO<sup>1</sup>, F.A. DOS SANTOS<sup>1</sup>, W.L.B. DE SENA<sup>1</sup>, T.B. DE OLIVEIRA<sup>1</sup>, F.J.B.M. JUNIOR,<sup>2</sup> I. R. PITTA<sup>1</sup>, M. C. A. LIMA<sup>1</sup>, M. G. R. PITTA<sup>1</sup>, M. J. B. M. RÊGO<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica

<sup>2</sup> Pesquisador do Núcleo de Pesquisa para Inovação Terapêutica Suely Galdino NUPIT-SG, CCB – UFPE

E-mail: michaelwilla@hotmail.com; moacyr.rego@gmail.com

**RESUMO-** *Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antineoplásica de novos derivados tiofênicos em células resistentes a quimioterapia. Para este fim, os ensaios de citotoxicidade foram realizados em uma linhagem de células resistente a múltiplas drogas, HL-60-MX1, deste modo os valores de IC<sub>50</sub> dos novos derivados tiofênicos foram determinados SB-30 (IC<sub>50</sub>>100), SB-68 (IC<sub>50</sub>.68,02), SB-200 (IC<sub>50</sub>.9,36), SB-44 (IC<sub>50</sub>.14,48) e SB-83 (IC<sub>50</sub>.7,94). Os derivados SB-200 e SB- 83 mostraram a melhor atividade citotóxica, como também apresentaram um promissor índice de seletividade de 3,61 e 4,26 respectivamente. A utilização destes derivados não produziu efeito na atividade das caspases 3 e 7, indicando que os mecanismos de morte celular são independentes da via extrínseca de ativação da apoptose. Palavras-chave: câncer; inovação terapêutica; citotoxicidade.*

**ABSTRACT-** *This study aimed to evaluate the anticancer activity of new thiophenic derivatives in cells resistant to chemotherapy. To this end, cytotoxicity assays were performed in a strain resistant cells to multiple drugs, HL-60-MX1 thus IC<sub>50</sub> values of the new thiophenic derivatives were determined SB-30 (IC<sub>50</sub>> 100), SB-68 (IC<sub>50</sub>.68,02) SB-200 (IC<sub>50</sub>.9,36), SB-44 (IC<sub>50</sub>.14,48) and SB-83 (IC<sub>50</sub>.7,94). The derivative SB-200 and SB-83 showed the best cytotoxic activity but also showed a promising selectivity index of 3.61 and 4.26 respectively. The use of these derivatives has no effect on the activity of caspases 3 and 7, indicating that cell death mechanisms are independent of the extrinsic apoptosis pathway activation. Keywords: cancer; therapeutic innovation; cytotoxicity.*

### 1. INTRODUÇÃO

A grande capacidade de resistência das células cancerosas tem sido cada vez mais um problema central para a oncologia clínica e experimental.

A partir desta perspectiva, se faz necessária à busca de novas moléculas como alternativas terapêuticas no tratamento do câncer (INCA, 2016). Entre essas moléculas estão os derivados tiofênicos, compostos que possuem amplo poder farmacológico, pois mimetizam estruturas biológicas e têm sido empregados como agentes antineoplásicos (SAKER & NAHAR, 2009).

Este trabalho propôs-se a utilizar e avaliar o efeito citotóxico de cinco derivados tiofênicos como agentes quimioterápicos em uma linhagem de Leucemia aguda multidroga resistente, HL60/MX1, como também avaliar se o mecanismo de morte induzido seria por apoptose através da via das caspases 3 e 7.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foi utilizada a linhagem HL-60/MX1 (Leucemia aguda resistente a mitoxantrona) obtidas da *American Type Cell Culture* (ATCC®, USA), essas células foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Gibco®) contendo 10 % Soro Fetal Bovino (Gibco®), adicionou-se também 3g/litro de Bicarbonato de Sódio (Sigma-Aldrich®) e 1% de Penicilina/Estreptomicina (Gibco®).

Para os ensaios de citotoxicidade foram utilizados derivados tiofênicos sintetizados e fornecidos pelo Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF/UFPE), descritos na Tabela 1. Todos os compostos foram caracterizados e tiveram suas estruturas confirmadas por RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (MENDONÇA-JUNIOR et al, 2011). A citotoxicidade foi avaliada, através do método de redução do MTT, 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium. As células foram plaqueadas na concentração de 1.10<sup>4</sup> células/100 µl e incubadas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> e a 37°C por 24 horas. Em seguida os compostos LPSF/SB-30, SB-44, SB-68, SB-83 e SB-200, diluídos em DMSO e adicionados em concentrações que variaram de 10nM a 100µM, a fim de estabelecer o IC<sub>50</sub> (concentração inibitória cinquenta por cento). Foi utilizado DMSO (0,1 e 0,2 %) como controle veículo e poços contendo apenas células, controle negativo. Após a adição dos compostos, as placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> e a 37°C. Ao término deste período, foram adicionados 20 µL de MTT e as placas foram novamente incubadas em estufa de CO<sub>2</sub>. Ao fim de três horas, foi aplicado 130 µL de SDS a 20%. A absorbância foi lida após o período de 24 horas no espectrofotômetro de placa ELx808 Microplate Reader (Biotek®, EUA) a 570 nm. A viabilidade foi calculada através da razão da absorbância dos compostos, pela absorbância do DMSO com o objetivo excluir a atividade citotóxica do solvente nos poços que tiveram adição dos compostos.

Após o estabelecimento do IC<sub>50</sub>, a fim de avaliar se a morte celular era produzida através da via de clivagem de caspase 3/7, as células HL-60 / MX1 foram cultivadas 5x10<sup>5</sup> /poço em placas de 6 poços e incubadas a 37 ° C a 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Após esse período, as células foram tratadas com os SB-83, 44 e 200 de acordo com o valor de IC<sub>50</sub> para 48 horas e depois foram lavadas 2x com PBS. Posteriormente, foram ressuspensas em meio completo e marcadas com CellEvent® Caspase 3/7 (Vida Technologies®, EUA) e incubadas durante 30 minutos em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> a 37 ° C. Subsequentemente, as células foram marcadas com SYTOX ® AADvanced durante 5 minutos para marcar as células necróticas. Em seguida, as células foram avaliadas usando o citômetro Attune (Biosystems® Aplicada, EUA) os resultado foram analisados utilizando o FlowJo Software®. Foram realizados dois experimentos independentes.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios de citotoxicidade realizados em células neoplásicas mostraram que, exceto para o SB-30, todos os compostos exibiram toxicidade em células HL-60/MX1 (células de leucemia

aguda resistente). Os derivados SB-83 e SB-200 tiveram os melhores valores de  $IC_{50}$  (7,94 e 9,36  $\mu M$ , respectivamente), conforme mostra a Tabela 1. A fim de determinar a seletividade dos SBs, os ensaios de toxicidade foram realizados em células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Os SB-30 e SB-68 não apresentaram toxicidade contra PBMC ( $IC_{50} > 100\mu M$ ). No entanto, eles apresentaram os menores valores de IS. A Tabela 1 mostra que o SB-83 e SB-200 apresentaram valores IS superiores a três, indicando o seu potencial seletivo (SI = 4,26 e 3,61, respectivamente), (Bézivin, em 2003).

Tabela 1- Valores do  $IC_{50}$  ( $\mu M$ ) e índice de seletividade (SI) dos compostos SBs em PBMC e leucemia de células agudas resistente

	SB-30	SB-68	SB-200	SB-44	SB-83
PBMC	>100	>100	33,84	37,61	33,82
HL-60/MX1	>100	68,02±14,28	9,36	14,48±1,7	7,94±2,26
SI*	>1	>1,47	3,61	2,6	4,26

\*IS (Índice de seletividade) =  $IC_{50}$  células normais/ $IC_{50}$  células tumorais.

A via de ativação das caspases -3 e -7 foi avaliada por citometria de fluxo em células de leucemia aguda resistentes, após 48 horas de tratamento com o  $IC_{50}$  dos SB-44, SB-83 e SB-200. Como mostrado na Figura 1, nenhum dos compostos testados induziu alterações significativas da porcentagem de células necróticas, bem como nas atividades da caspase 3 e 7. As células duplamente positivas apresentaram valores pouco expressivos quando comparados com o controle não tratado, como é possível visualizar na figura 1.

Como é possível observar na figura 1, os derivados SBS utilizados não foram capazes de afetar a porcentagem de caspase-3/7 ativadas como também não aumentaram a porcentagem de células necróticas, indicando que outros mecanismos de morte além da necrose e apoptose são ativados após o tratamento, fato que ocorre com outros agentes quimioterápicos (Brumatti et al, 2016). Ensaios subsequentes devem ser realizados a fim de elucidar o mecanismo de ação pelo qual o SB-44, SB-83 e SB-200 induzem as células HL60/MX1 à morte. Evidências recentes indicam que a inibição da apoptose dependente de caspase sensibiliza muitas células neoplásicas a uma forma de morte celular não apoptótica denominada de necroptose (Moriwaki, 2015).

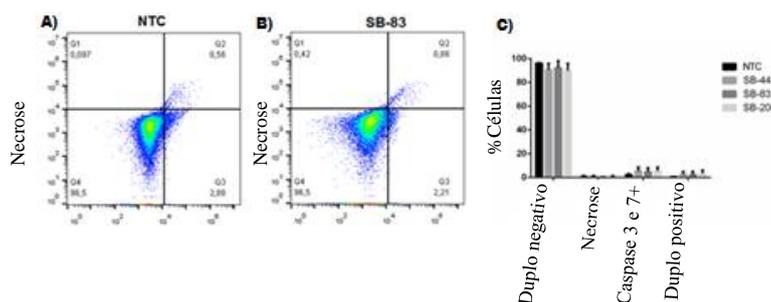


Figura 1- Efeito dos SBs na via das caspases 3 e 7.

#### 4. CONCLUSÕES

Os Derivados tiofenos SB-200 e SB-83 exibiram seletividade acima de 3 e potenciais efeitos antineoplásicos in vitro em células HL60/ MX-1. A morte celular induzida pelos derivados tiofênicos é independente da via das caspases 3 e 7. Portanto, é necessário investigar em estudos futuros por qual mecanismo as células foram induzidas à morte, a partir da utilização dos SBs. De qualquer modo, estes derivados tiofênicos são candidatos potentes para o desenvolvimento de novas terapias eficazes contra o tratamento da leucemia aguda.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil, 2015 Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>. Acessado em: 26 de outubro de 2016.
- BÉZIVIN C.; TOMASI S.; LOHÉZIC-LE DÉVÉHAT F.; BOUSTIE J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine.*, v. 10, p. 499-503, 2003.
- BRUMATTI G, MA C, LALAOUI N, NGUYEN NY, NAVARRO M, TANZER MC, RICHMOND J, GHISI M, SALMON JM, SILKE N, POMILIO G, GLASER SP, DE VALLE E, GUGASYAN R, GURTHRIDGE MA, CONDO SM, JOHNSTONE RW, LOCK R, SALVESEN G, WEI A, VAUX DL, EKERT PG, SILKE J. The caspase-8 inhibitor emricasan combines with the SMAC mimetic birinapant to induce necroptosis and treat acute myeloid leukemia. *Sci Transl Med.*, v. 8, p. 339-369, 2016
- S.D SAKER.; L.; NAHAR. Compostos heterocíclicos e seus derivados. In: Química Para Estudantes De Farmácia: *Química Geral, Orgânica E De Produtos Naturais*. São Paulo, Ed. Guanabara Koogan, 2009. p. 121-129.
- K MORIWAKI.; J BERTIN.; P J GOUGH.; G M ORLOWSKI.;F KM CHAN, Differential roles of RIPK1 and RIPK3 in TNF-induced necroptosis and chemotherapeutic agent-induced cell death. *Cell Death and Dis.* v. 6, p. 1-11, 2015.

#### 6. AGRADECIMENTOS

CAPES, FACEPE, INCT\_if e PROPESQ/UFPE



ÁREA DE SUBMISSÃO: PESQUISA CLÍNICA E PRÉ-CLÍNICA – PC 9

## HIPERCOLESTEROLEMIA: O POTENCIAL DO EXTRATO DE *Kalanchoe brasiliensis* COMO TRATAMENTO?

DIAS, C. N. N. C<sup>1</sup>; FONSECA, A. G<sup>1</sup>; DANTAS, L. L. S. F. R. D<sup>1</sup>; T. R. A, LOPES, GURGEL, G. P<sup>1</sup>; LOPES, M. M. G. D<sup>1</sup>; CARVALHO, H. H. G<sup>1</sup>; L. A. L. SOARES<sup>2</sup>; S. M. Z LANGESSNER<sup>1</sup> E LEMOS, T. M. A. M<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Norte Laboratório de Pesquisa em Bioquímica Clínica e Experimental – LPBCE, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco Docente/pesquisador do Departamento de Farmácia da  
E-mail para contato: natyfarmacia@hotmail.com

**RESUMO** – *Kalanchoe brasiliensis* conhecida como saião, é usada popularmente como expectorante, tratamento de bronquites e úlceras gástricas. Para sua eficácia e segurança terapêutica comprovados é necessário realizar testes adequados. O objetivo do presente estudo foi avaliar se o extrato citado tem a capacidade de manter as concentrações de normalidade no perfil lipídico após administração via oral do extrato hidroetanólico das folhas de *K. brasiliensis*. Foram utilizados camundongos adultos machos (35±3g peso corporal), divididos em grupos controle e teste (n=6/grupo). No grupo teste foi administrado o extrato, na dose de 2000 mg/Kg, diluído em solução fisiológica 0,9%, e solução fisiológica 0,9% no grupo controle. Após 14 dias da administração do extrato, foi coletado o sangue dos animais por punção cardíaca e realizadas dosagens bioquímicas de triglicerídeos e colesterol (protocolo na CEUA/UFRN nº 02/2013). Os grupos controle e teste apresentaram médias de concentração, respectivamente, triglicerídeos 202,67±73,75 e 222,0±59,24 mg/dL; colesterol 104,45±30,27 e 108,09±28,57 mg/dL. Não foi observada diferença significativa entre as médias encontradas (p-valor>0,05). O extrato das folhas de *K. brasiliensis* não desenvolveu alterações no perfil lipídico podendo ter um potencial anti-aterogênico com mais estudos, purificação do extrato, ensaios clínicos e analíticos mais sofisticados.

**Palavras-chaves:** Estudos pré-clínicos, perfil lipídico, saião.

**ABSTRACT** - *Kalanchoe brasiliensis* known as full skirt, commonly is used as an expectorant, treatment of bronchitis and gastric ulcers. For its effectiveness and proven therapeutic safety it is necessary to conduct appropriate tests. The aim of this study was to assess whether the said extract has the ability to keep in the lipid profile of normal concentrations after oral administration of hydroethanol extract from *K. brasiliensis* leaves. We used adult male mice (35 ± 3g body weight) were divided into control and

*test groups (n = 6 / group). In the test group was given the extract, at a dose 2000 mg / kg, diluted in 0.9% saline, and 0.9% saline in the control group. After 14 days of extract administration, blood was collected from animals by cardiac puncture and performed measurements of triglycerides and cholesterol (protocol in CEUA / UFRN No. 02/2013). The control and test groups had mean concentration, respectively, triglyceride  $202.67 \pm 73.75$  and  $222.0 \pm 59.24$  mg / dL; Cholesterol  $104.45 \pm 30.27$  and  $108.09 \pm 28.57$  mg / dL. There was no significant difference between the averages found ( $p > 0.05$ ). The extract from *K. brasiliensis* leaves not developed changes in lipid profile may have an anti-atherogenic potential with further studies, extract purification, clinical trials and more sophisticated analytical.*

*Keywords: pre-clinical studies, lipid profile, full skirt.*

## 1. INTRODUÇÃO

A Hipercolesterolemia trata-se de um aumento da concentração de lipídeos no sangue em especial o colesterol. É uma forma de hiperlipidemia e hiperlipoproteinemia. As lipoproteínas plasmáticas são classificadas de acordo com a sua densidade: a VLDL (de muita baixa densidade), LDLc de densidade intermédia aonde a LDL oxidada é bastante aterogênica, tendo um caráter importante em desencadear doenças cardio vasculares e a HDLc que possui um efeito protetor fazendo o transporte reverso do colesterol (Durrington, 2003; Biggerstaff e Wooten, 2004; Carmena, Duriez e Fruchart, 2004).

Mediante o uso de vários medicamentos, como as estatinas, com sérias reações vasculares resolvemos estudar a espécie *Kalanchoe brasiliensis* proveniente da flora nordestina, é um exemplo de planta que vem sendo utilizada em diversas pesquisas e tem apresentado atividades satisfatórias, principalmente com ação anti-inflamatória, antiulcerogênica e com potencial efeito analgésico e anti-inflamatório, resolvemos estudar este extrato para investigar se o mesmo possui alguma atividade nas dislipidemias. (Trevisan *et al.*, 2006), antifúngico, bactericida (Silva, 2009), anti-ulcerogênico (Cruz, 2011) e antituberculose (Leitão *et al.*, 2013).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

A matéria-prima vegetal (folhas sem talos a fresco) foi processada por turboextração em liquidificador industrial por 5 minutos com álcool etílico PA 50%, na proporção 1:1, p/v (droga vegetal: solvente). O extrato processado foi filtrado a vácuo, obtendo-se então o extrato hidroetanólico 50% das folhas (EH) de *K. brasiliensis*. Esse extrato foi liofilizado para a avaliação da toxicidade. Os animais camundongos swiss machos adultos ( $35 \pm 3$ g peso corporal), divididos em grupos controle e teste ( $n=6$ /grupo). No grupo teste foi administrado o extrato, na dose de 2000 mg/Kg, diluído em solução fisiológica 0,9%, e solução fisiológica 0,9% no grupo controle. Após 14 dias da administração do extrato, foi coletado o sangue dos animais por punção cardíaca e realizadas dosagens bioquímicas de triglicérides e colesterol (protocolo na CEUA/UFRN nº 02/2013).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Vários estudos de plantas com efeitos hipocolesterolemiantes relacionam este efeito à inibição destas enzimas por ação, principalmente dos flavonoides, apresentando mecanismo de ação semelhante aos medicamentos da classe das estatinas. Outros estudos também associam este efeito à atividade antioxidante dos flavonoides presentes através da diminuição da lipoperoxidação e aumento da atividade de enzimas antioxidantes (Bursil *et al*, 2007, Cardozo *et al*, 2008).

O colesterol total demonstra a atividade do organismo em metabolizar lipídios. Obteve-se uma média para os grupos controle e teste de respectivamente 104,45±30,27 e 108,09±28,57 mg/dL. Triglicerídeos são depósitos de combustível metabólicos armazenados por células especializadas que formam o tecido adiposo sobre a pele, os triglicerídeos apresentaram-se como o esperado, dentro dos valores normais para controle e teste, respectivamente, 202,67±73,75 e 222,0±59,24 mg/dL. O grupo apresentou uma pequena variação, porém não sugere associação com efeitos do extrato. Não foi observada diferença significativa entre as médias encontradas ( $p$ -valor>0,05).

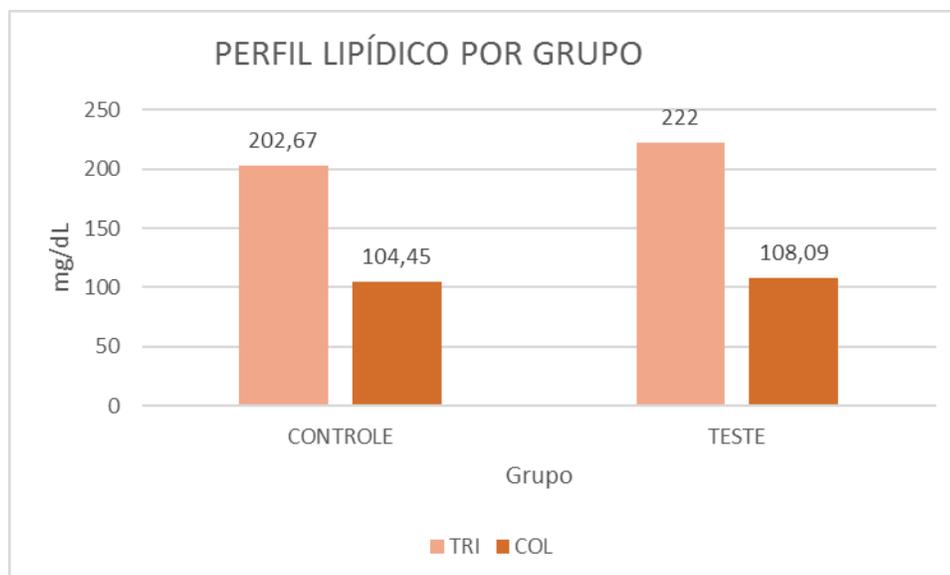


Figura 1: Distribuição das médias de concentração de triglicerídeos e colesterol total entre os grupos de animais, no ensaio agudo.

### 4. CONCLUSÃO

O extrato de folhas da *Kalanchoe brasiliensis* não desenvolveu alterações no perfil lipídico, podendo ter um potencial anti-aterogênico com mais estudos específicos e aprofundados, purificação do extrato, ensaios clínicos e analíticos sofisticados.

### 5. REFERÊNCIAS



BIGGERSTAFF, K. D.; WOOTEN, J. S. Understanding lipoproteins as transporters of cholesterol and other lipids. *Adv Physiol Educ.* V. 28, n. 3, p. 105-106, 2003.

BURSILL, C. A., ABBEY, M., ROACH, P. D. A green tea extract lowers plasma cholesterol by inhibiting cholesterol synthesis and upregulating the LDL receptor in the cholesterol- fed rabbit. *Atherosclerosis.* v.193, n. 1, p. 86-93, 2007.

CARDOZO, S., BONA, L. R., BARBOZA, L. T., BOECK, R., VIEIRA, V., FRANTZ, M. A., MORISSO, F. D. P., COITINHO, A. S., TAVARES, R. G. Hypolipidemic activity of *Cordia salicifolia* extract in mice on a hyperlipidemic diet. *Revista da AMRIGS*, Porto Alegre, v. 52, n. 3, p. 182-186, jul.-set. 2008

CARMENA, R.; DURIEZ, P.; FRUCHART, J. C. Atherogenic lipoprotein particles in atherosclerosis. *Circulation.* V. 109 (23 Supl 1), p. 2-7. 2004.

CRUZ B. P.; CHEDIER L. M.; R L. FABRI; PIMENTA D. S. Chemical and agronomic development of *Kalanchoe brasiliensis* Camb. And *Kalanchoe pinnata* (Lamk.) Pers under light and temperature levels. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 83, n. 4, p. 1435-1441, 2011.

DURRINGTON, P. Dyslipidaemia. *The Lancet.* V. 362, Issue 9385, p. 717-731, DOI:10.1016/S-140-6736(03)14234-1 PMID 12957096, 2003.

LEITTE CARTAXO, S.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, Pernambuco, v. 131, n. 2, p.326-342, 17 jul. 2010.

LEITÃO, F.; LEITÃO, S. G; ALMEIDA, M. Z.; CANTOS, J.; COELHO, T.; SILVA, P. E. Medicinal plants from open-air markets in the State of Rio de Janeiro, Brazil as a potential source of new antimycobacterial agents. *Journal of Ethnopharmacology.* Rio de Janeiro. v. 149, n.2, p. 513–521. Set., 2013

SILVA, J. G.; PEREIRA, M. S. V.; GURGEL, A. P. D.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; SOUZA, I. A. Atividade inibitória das folhas e caule de *Kalanchoe brasiliensis* Cambess frente a microrganismos com diferentes perfis de resistência a antibióticos. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy.* v.19, n. 3, p. 790-794, Jul./Set. 2009

TREVISAN, M. T. S.; BEZERRA, M. Z. B.; SANTIAGO, G. M. P.; FEITOSA, C. M.; VERPOORTE, R.; BRAZ FILHO, R. Atividades larvicida e anticolinesterásica de plantas do gênero *Kalanchoe*. *Química Nova* [online], São Paulo. v. 29, n.3, p. 415- 418, 2006.

## 6. AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal do Rio Grande do Norte pela a oportunidade de contribuir com a comunidade acadêmica e científica. Ao Laboratório de Pesquisa em Bioquímica Clínica e Experimental - LPBCE pelo o incentivo e investimento em docentes de iniciação científica dentro da Faculdade de Farmácia – UFRN, CNPQ, CAPES e FAPERN.



ÁREA DE SUBMISSÃO: PESQUISA CLÍNICA E PRÉ-CLÍNICA – PC 12

## AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS NOVOS DERIVADOS SINTÉTICOS DA CURCUMINA EM LINHAGEM CELULAR DE LEUCEMIA HL60

L.V. GALDINO<sup>1</sup>; M.B.O. CHAGAS<sup>1</sup>; V.C.M. COSTA<sup>1</sup>; C. I. LINO<sup>2</sup>; M.G.R.PITTA<sup>1</sup>;  
I.R.PITTA<sup>3</sup>; OLIVEIRA, R.B<sup>2</sup>; M.J.B.M.RÊGO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT SG), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

<sup>2</sup> Centro de Biociências, Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF), UFPE

<sup>3</sup> Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais

E-mail para contato: liliavieiragaldino@gmail.com

**RESUMO** – *O câncer constitui uma classe de doenças que possui em comum o crescimento desordenado de células com capacidade de invadir tecidos e órgãos podendo espalhar-se para regiões adjacentes. As leucemias são um grupo de neoplasias malignas que acometem as células da medula óssea e geralmente, o sangue periférico. Contudo, apesar dos recentes avanços no combate as leucemias, a alta taxa de mortalidade e de resistência as terapias disponíveis, é incentivada a busca por novas alternativas terapêutica. A curcumina é um pigmento cujos efeitos biológicos como ação anticâncer, tem sido extensamente estudados. Neste sentido, o presente estudo visa avaliar os derivados sintéticos da curcumina (RS 11 e RI 58) sobre linhagem de leucemia aguda (HL60). As moléculas em testes de citotoxicidade pelo método do 3-(4,5-dimetil-2 tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium apresentaram IC<sub>50</sub> de 42,7µM (RS11) e 4,66µM (RI58). A partir dos resultados foi possível elaborar um perfil dose resposta, podendo ser alvo de novos estudos para que venha a se tornar um provável agente anticâncer*

**Palavras chave:** 3-(4,5-dimetil-2 tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium; câncer; quimioterapia.

**ABSTRACT-** *Cancer is a class of diseases that have, in common, the uncontrolled growth of cells with ability to invade tissues and organs and can spread to adjacent regions. Leukemia are a group of malignant neoplastic disease affecting the cells of the bone marrow and usually the peripheral blood. However, despite recent advances in fighting leukemia, the high mortality rate and resistance to available therapies, it is encouraged to*



*search for new therapeutic alternatives. Curcumin is a yellow pigment which biological effects as anticancer action has been extensively studied. In this sense, the present study aims to evaluate the synthetic derivatives of curcumin (RS 11 and IR 58) on acute leukemia line (HL60). The molecules in cytotoxicity tests by the method of 3- (4,5-dimethyl-2-thiazole) -2,5-diphenyl-2 H-tetrazolium bromide showed IC50 42,7 $\mu$ M (RS11) 4,66 $\mu$ M and (RI58 ). From the results it was possible to develop a dose-response profile and may be subject to further studies that it may become a potential anticancer agent.*

*Keywords: 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide; cancer; chemotherapy*

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer constitui um conjunto de mais de 100 doenças que possui em comum o crescimento desordenado de células com capacidade de invadir tecidos e órgãos podendo espalhar-se para regiões adjacentes (Almeida *et al.*, 2005). Entre os principais tipos de câncer, destacam-se as leucemias que acometem a medula óssea acumulando células anormais e geralmente, o sangue periférico.

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima que para os anos de 2016-2017 ocorram dez mil novos casos de leucemia. Dentre os tratamentos disponíveis atualmente destacam-se a quimioterapia, cirurgia, radioterapia e transplante de medula óssea. O mais utilizado é a quimioterapia, contudo, muitos deles são agressivos ao paciente, apresentando elevados efeitos colaterais.

A *Curcuma longa* Linn. é uma espécie de planta com propriedades medicinais que apresenta em seu rizoma a curcumina, um pigmento amarelo. Sua estrutura é composta de dois anéis metoxifenol unidos por estrutura  $\beta$ -dicetona, sendo caracterizado como um polifenólico lipossolúvel. A curcumina tem sido estudada devido aos efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e anticâncer (Leonardo, 2012). Nesse contexto, o presente resumo tem como objetivo avaliar a citotoxicidade de novos compostos de derivados sintéticos da curcumina, RS 11 e RI 58 em células de leucemia aguda - HL60.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

**2.1 Manutenção de células tumorais** – a linhagem celular de leucemia aguda HL60 foi obtida do banco de células do Rio de Janeiro, mantidas em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com soro fetal bovino 10% (Gibco), 200 U/ml de estreptomicina e de penicilina (Gibco), HEPES 10 mM (Gibco) à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

**2.2 Ensaio de citotoxicidade in vitro em células neoplásicas**- A citotoxicidade celular foi quantificada pelo método colorimétrico do 3-(4,5-dimetil-2 tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT). O teste de citotoxicidade foi realizado em placas de 96 poços, utilizando 4x10<sup>4</sup>

(células por poço), após o período de 24 horas foram tratadas com diferentes concentrações (0,1, 1,10 e 100 $\mu$ M) dos compostos RS11 e RI58, incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> durante 72h. Posteriormente ao período de incubação foram adicionados 20  $\mu$ L da solução de MTT, as placas foram então protegidas da luz e incubadas mais uma vez em estufa úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por um período de 3h. A reação foi cessada pela adição de 130  $\mu$ L de SDS 20% e a densidade óptica medida após 24 horas no comprimento de onda de 560 nm. A leitura foi realizada em um leitor de microplacas (EL808 - Biotek®) (RÊGO *et al.*, 2014). O potencial citotóxico dos compostos avaliados foram calculados com relação ao controle tratado com DMSO a 0,1%. A determinação da concentração do composto necessária para 50% de inibição *in vitro* (IC<sub>50</sub>) foi calculado com o auxílio do programa OriginPro 8. O Programa GraphPadPrism, foi utilizado para a construção dos gráficos dose-resposta.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As alterações estruturais dos compostos são estratégias para melhorar a atividade farmacológica de diversas moléculas e nesse estudo a molécula modificada foi da curcumina (PADHYE, *et al.*, 2010). Os resultados iniciais obtidos como testes dos derivados da curcumina em linhagem de leucemia aguda (HL60) estão representados pela medida de porcentagem de viabilidade celular nos gráficos dose resposta (figura 1a e 1b). Foi observado redução da viabilidade de células para os dois compostos de forma crescente com a concentração. As determinações do potencial citotóxico dos compostos testados foram calculadas para indicar a concentração necessária de inibição 50% do número de células viáveis -IC<sub>50</sub> (CORDEIRO, 2012).

No gráfico dose-resposta do composto RS11 (figura 1a), foi necessário uma concentração de 42,7  $\mu$ M para proporcionar 50% de morte celular.

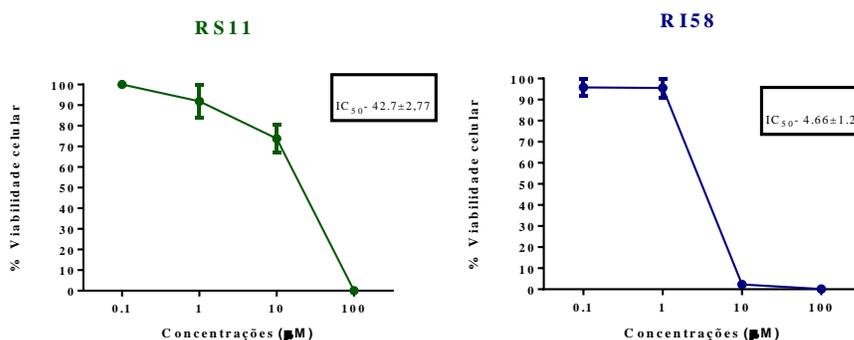


Figura 1 – Gráfico dose resposta do composto RS11 e RI 50 e seus respectivos IC<sub>50</sub>

Em conformidade com a figura 1b, o composto RI58 apresentou maior eficácia na linhagem de leucemia aguda (HL-60) quando comparado com RS11 na mesma linhagem. O RI58 foi capaz de inibir 50% do número de células viáveis na concentração de 4,66 $\mu$ M. A presença dos dois anéis metoxifenol no composto RI58 demonstra que pode haver potencial destaque na atividade anticâncer



para o grupo metóxi quando comparado ao RS11, cujo grupo é ausente (Leonardo, 2012). Segundo o NCI60, programa desenvolvido pela NIH visando à prospecção de moléculas anticâncer, compostos com  $IC_{50}$  menor que  $10 \mu M$  como a molécula RI58 são consideradas promissoras e devem ser investigadas.

#### 4. CONCLUSÃO

Os compostos RS 11 e RI 58 apresentaram atividades citotóxicas na linhagem tumoral de leucemia testada, devendo ser submetidos a novos testes e avaliação de toxicidade em células normais para que venha a se tornar um provável agente anticâncer.

#### 5. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, VL *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quim Nova*, v. 28, n. 1, p. 118-29, 2005.
- CORDEIRO, N. C.C. Novos agentes anticâncer tiazacridínicos substituídos: síntese, características físico-químicas e avaliação da citotoxicidade *in vitro*. 2012.
- INCA - Instituto Nacional do Câncer José de Alencar - *Estimativas 2016-2017: Incidência de câncer no Brasil*. 2016. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/por-tipos.asp> em 31 out. 2016.
- LEONARDO, M.M. Avaliação de uma preparação hidrossolúvel de curcumina sobre a toxicidade induzida pelo quimioterápico cisplatina: possíveis efeitos protetores *in vitro* e *in vivo*, e identificação da expressão do gene Tp53. 2012. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.
- NIH – National Cancer Institute - NCI Development Therapeutics Program . Disponível em: <https://ntp.cancer.gov/> em 03 nov. 2016
- PADHYE, S.; CHAVAN, D.; PANDEY, S.; DESHPANDE, J.; SWAMY, K. V.; SARKAR, F. H. Perspectives on chemopreventive and therapeutic potential of curcumin analogs in medicinal chemistry. *Mini Rev Med Chem*, v.10, n.5, p. 372–87, 2010.

#### 6. AGRADECIMENTOS

INCT\_if. FACEPE, UFPE

ÁREA DE SUBMISSÃO: PESQUISA CLÍNICA E PRÉ-CLÍNICA – PC 13

## INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA E CITOTÓXICA DE CANDIDATOS A FÁRMACOS ANTICHAGÁSICOS

A. C. C. SILVA<sup>1</sup>, S. B. da SILVA<sup>2</sup>, A. P. O. MENDES<sup>3</sup>; M. C. A. B. de CASTRO<sup>4</sup>; D. R. M.  
MOREIRA<sup>5</sup>, A. C. L. LEITE<sup>6</sup>, V. R. A. PEREIRA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde/Fiocruz-PE

<sup>2</sup>Bolsista PIBITI/Fiocruz-PE

<sup>3</sup>Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória

<sup>5</sup>Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/Fiocruz-BA

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Farmácia

E-mail para contato: catarinacristovao@outlook.com

*RESUMO – Um dos grandes desafios no tratamento da doença de Chagas é a descoberta de fármacos mais eficazes e menos tóxicos no combate a mesma. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi investigar in vitro a ação tripanocida e citotóxica de nove novos compostos tiazolidinônicos. A atividade tripanocida foi avaliada frente a epimastigotas e tripomastigotas de Trypanosoma cruzi. Para investigar a atividade citotóxica, macrófagos da linhagem J774A foram avaliados utilizando-se MTT. Os compostos de maior destaque relacionando a atividade tripanocida e a citotoxicidade foram TD-05, TD-08 e TD-09, comparando-se ao benzonidazol, droga de referência. Os resultados incentivam a continuidade da avaliação com o objetivo de encontrar uma nova abordagem terapêutica para a doença de Chagas.*

*Palavras-chave: doença de Chagas, tiazolidinônicos, Trypanosoma cruzi*

*ABSTRACT - A great challenge in the treatment of Chagas disease is the discovery of more effective and less toxic drugs. Thus, the objective of this study was to investigate the in vitro trypanocidal and cytotoxic activity of nine new tiazolidinonic compounds. The trypanocidal activity was evaluated against Trypanosoma cruzi epimastigotes and trypomastigotes. To investigate the cytotoxic activity, J774A macrophage lineage was evaluated using MTT. The most prominent compounds relating the trypanocidal and cytotoxicity activity were TD-05, TD-08 and TD-09, compared to the benzonidazol, the drug currently used. The results encourage us to continue the evaluation in order to find a new therapeutic approach for the Chagas disease.*

*Key words: Chagas disease, tiazolidinonics, Trypanosoma cruzi*

## 1. INTRODUÇÃO

Um dos enfoques das pesquisas em relação à doença de Chagas, um importante problema de saúde pública, tem sido o desenvolvimento de medidas eficazes para seu controle (Hide, 2002). Um dos grandes desafios inclui a descoberta e estudo de fármacos mais eficazes no combate a essa enfermidade. Nenhuma droga foi aprovada nos últimos 40 anos para o tratamento da doença (Bellera *et al*, 2015). O tratamento utilizado atualmente é baseado em duas drogas: o benzonidazol (produzido pelo LAFEPE como Benznidazol LAFEPE® no Brasil e pela Maprimed/ELEA na Argentina como Abarax®) e o Nifurtimox (Lampit™, Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Germany), porém eles são mais efetivos na fase aguda da doença em detrimento da fase crônica, além de possuírem uma alta toxicidade (Morilla; Romero, 2015). Apenas o tratamento com o benzonidazol é permitido no Brasil.

As pesquisas por novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas têm evoluído sensivelmente nas últimas décadas. Várias moléculas vêm sendo exploradas em programas de química medicinal com a aplicação de métodos de planejamento de fármacos baseados na estrutura do receptor (SBDD - *structure-based drug design*) e na estrutura do ligante (LBDD - *ligand-based drug design*) (Dias *et al*, 2009). A cruzaina, também chamada cruzipaina (GP57/51 ou TCC), alvo dos compostos testados no presente trabalho, constitui a mais abundante proteína da família das cisteíno proteases do *T. cruzi*, e é a enzima-chave da replicação intracelular do parasita, representando um alvo molecular para o desenho de novos fármacos anti-parasitários (Clayton, 2010).

Sendo assim, candidatos a novos fármacos tripanocidas, compostos tiazolidinônicos foram investigados *in vitro* quanto à ação anti-*T. cruzi* em ensaios sobre formas epimastigotas e tripomastigotas desse parasito. Também foi avaliada a citotoxicidade *in vitro* desses compostos sobre macrófagos da linhagem J774A.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os 9 compostos testados (TD-01 a 09) foram solubilizados em DMSO e estocados a -20°C. Para os ensaios, cada composto foi diluído na concentração apropriada utilizando-se o meio de cultura adequado. Para determinar o efeito anti-proliferativo para *T. cruzi*, formas epimastigotas da cepa DM28c ( $1 \times 10^5$  parasitas/poço), mantidas em meio LIT+1% de antibiótico+10% de SFB, foram semeadas em placas de 96 poços por 96h a 26°C, juntamente com diferentes concentrações dos compostos (0,19-100 µg/ml). Já para o teste frente as formas tripomastigotas da cepa Y, o que diferiu foi o meio de cultura utilizado (RPMI+1% de antibiótico+10% de SFB), a quantidade de células ( $4 \times 10^6$  parasitas/ml), o tempo e a temperatura de incubação com os compostos (24h, 37°C), além de 5% de atmosfera de CO<sub>2</sub>. Cada composto foi testado em duplicata. O controle negativo da reação foi obtido em poços contendo apenas meio de cultura e parasitos (sem tratamento) e a droga de

referência utilizada foi o benzonidazol (Bzn). A viabilidade dos parasitos foi determinada por contagem direta em câmara de Neubauer e, a partir desses valores, foi obtida a IC<sub>50</sub> (concentração que inibe em 50% o crescimento dos parasitas) por meio de uma regressão linear simples utilizando o *software* Prisma 5.0 Graphpad. Para avaliar a citotoxicidade, os macrófagos da linhagem J774A foram semeados em placas de 96 poços contendo meio DMEM completo em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 24h. Posteriormente, foram adicionados os compostos em diferentes concentrações (0,19-100 µg/ml), sendo novamente incubados durante 48h. Cada composto foi testado em duplicata. Após esse período, foi adicionado MTT (5 mg/mL em PBS), seguido de nova incubação por 2h. Foi acrescentado DMSO para dissolução dos cristais de formazan e a absorbância foi lida a 570 nm. O controle negativo da reação foi obtido em sem tratamento. Também foi avaliada a atividade da droga de referência (Bzn). A partir dos valores de inibição da cultura, foi obtida a CC<sub>50</sub> (concentração citotóxica para 50% das células) por meio de uma regressão linear simples utilizando o “software” Prisma 5.0 Graphpad.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Três compostos se destacaram com relação a sua atividade antiepimastigotas em relação ao Bzn (2,74 µg/ml), que foram TD-03 (1,2 µg/ml), TD-06 (1,97 µg/ml) e TD-09 (2,38 µg/ml) (Tabela 1). Com relação à atividade anti-tripomastigotas, os destaques foram TD-07 (7,69 µg/ml), TD-08 (5,25 µg/ml) e TD-09 (2,7 µg/ml), comparando-se ao Bzn (1,63 µg/ml) (Tabela 1). Todos os compostos testados pela metodologia do MTT mostraram algum grau de atividade citotóxica, com os valores de CC<sub>50</sub> variando de 8,15 µg/ml a 29,88 µg/ml (Tabela 1). A maioria dos compostos demonstrou menor toxicidade em relação ao Bzn.

Tabela 1 – Atividade antiparasitária e citotóxica de uma nova classe de compostos tiazolidinonicos

Código	Epimastigotas (DM28c) IC <sub>50</sub> (µg/ml)	Tripomastigotas (cepa) IC <sub>50</sub> (µg/ml)	Citotoxicidade (J774A) CC <sub>50</sub> (µg/ml)
TD-01	29,63	22,2	22,56
TD-02	18,51	12,54	11,22
TD-03	1,2	ND	18,34
TD-04	ND	11,14	29,88
TD-05	5,71	9,86	12,31
TD-06	1,97	12,45	27,45
TD-07	6,55	7,69	8,15
TD-08	11,74	5,25	29,31
TD-09	2,38	2,7	12,98
Bzn	2,74	1,63	11,62

Os compostos que tiveram resultado Não Determinado (ND) serão novamente testados. Os compostos de maior destaque relacionando a atividade tripanocida e a citotoxicidade foram TD-05, TD-08, TD-09.

## 4. CONCLUSÃO

Alguns dos compostos se destacaram relacionando a atividade tripanocida e a baixa citotoxicidade, o que nos incentiva a continuar a investigação desses compostos com o objetivo de encontrar uma nova abordagem terapêutica para a doença de Chagas.

## 5. REFERÊNCIAS

BELLERA, C. L. et al. Computer-guided drug repurposing: Identification of trypanocidal activity of clofazimine, benidipine and saquinavir. *European journal of medicinal chemistry*, v. 93, p. 338-348, 2015.

CLAYTON, J. Chagas disease: pushing through the pipeline. *Nature*, v. 465, n. 7301 p. S12-S15, 2010.

DIAS, L. C. et al. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. *Química Nova*, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009.

HIDE, G. Trypanosomiasis and leishmaniasis: novel biology versus practical disease control. *Trends in parasitology*, v. 18, n. 11, p. 477-478, 2002.

MORILLA, M. J.; ROMERO, E. L. Nanomedicines against Chagas disease: an update on therapeutics, prophylaxis and diagnosis. *Nanomedicine*, v. 10, n. 3, p. 465-481, 2015.

## 6. AGRADECIMENTOS

A Fiocruz-PE pela bolsa de A. C. C. SILVA e S. B. da Silva.



ÁREA DE SUBMISSÃO: PESQUISA CLÍNICA E PRÉ-CLÍNICA – PC 18

## AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA CURCUMINA EM LINHAGENS NEOPLÁSICAS DE MELANOMA E PRÓSTATA

M. S. SILVA<sup>1</sup>, F. A. SANTOS<sup>1</sup>, C. G. B. MARTINS<sup>1</sup>, M. J. B. M. RÊGO<sup>1</sup>, I. R. PITTA<sup>1,2</sup>, M. G. R. PITTA<sup>1</sup> e M. C. PEREIRA<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêutica (LINAT), Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT)

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Laboratório de Síntese e planejamento de fármacos (LPSF), Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT)

E-mail: michelly2305@yahoo.com.br

**RESUMO** – *Os atuais tratamentos sistêmicos para melanoma e câncer de próstata são ainda pouco eficazes e muitas vezes as células tumorais tornam-se resistentes. Visto que a incidência de ambas as doenças é extremamente alta, faz-se necessário o estudo de novos fármacos que sejam mais eficazes e menos tóxicos no tratamento destas doenças. O objetivo do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade da curcumina em linhagens de câncer de próstata (PC-3 e DU-145) e melanoma (A375, UACC62 e SK-MEL-28) através do método colorimétrico de MTT. Os resultados obtidos demonstraram que a curcumina possui um efeito dose-resposta nos dois tipos de câncer. Entretanto, nas linhagens de melanoma a curcumina apresentou maior citotoxicidade. Os valores de IC<sub>50</sub> calculados para as linhagens de câncer de próstata DU-145 e PC-3 foram respectivamente 32,58 μM ± 4,89 e 31,14 μM ± 4,60; nas linhagens de melanoma, as doses de IC<sub>50</sub> foram 27,95 μM ± 9,03 (SK-MEL-28), 17,37 μM ± 3,23 (A375) e 15,66 μM ± 3,71 (UACC62). As linhagens de melanoma foram mais sensíveis a curcumina, mas ambas linhagens apresentaram redução da viabilidade de maneira dose dependente. Novos ensaios, posteriormente, serão realizados para avaliação do mecanismo anticâncer da curcumina nas células de melanoma e câncer de próstata.*  
**Palavras-chave:** cúrcuma, câncer, citotoxicidade

**ABSTRACT** – *Current treatment for melanoma and prostate cancer are not yet completely effective and there are many risks to be overcome. Since the incidence of both diseases are extremely high, it becomes necessary to develop new, more effective and less toxic drugs. The objective of the present study is to evaluate the cytotoxic activity of curcumin in prostate cancer (DU-145 and PC-3) and melanoma (A375, SK-MEL-28 and UACC62) cell lines by the colorimetric MTT method. The results showed*



*that curcumin has a dose-response effect against both types of cancer. However, in melanoma cell lines it showed higher cytotoxicity. The IC50 values calculated for the prostate cancer cell lines DU-145 and PC-3 were respectively 32,58mM ± 4,89 e 31,14mM ± 4,60. Whereas, for melanoma cell lines. The doses were calculates as 27,95 mM ± 9,03 (SK-MEL-28), 17,37 mM ± 3,23 (A375) and 15,66 mM ± 3,71 (UACC62). Prostate câncer showed higher resistance to the treatment. Therefore, curcumin was more effective to reduce melanoma cell lines viability. Nevertheless, other assessment must be performed to completely evaluate curcumin mechanism of action in these cell lines.*

*Keywords: curcuma, cancer, citotoxicity*

## 1. INTRODUÇÃO

Cerca de 12 milhões de pessoas por ano são diagnosticadas com câncer no mundo (INCA 2016). Com o aumento exacerbado de casos que surgem anualmente e a baixa eficácia dos atuais tratamentos sistêmicos, faz-se necessário a busca por novos fármacos anticâncer. O câncer de próstata, por sua vez, é um câncer prevalente em homens idosos a estimativa é que mais de 140.000 homens desenvolvam a doença por ano no Brasil, e mais de 20.000 homens irão morrer anualmente por conta da neoplasia (Arap *et al.*, 2010). Esse tipo de neoplasia geralmente danifica o tecido circundante e interfere na função normal da próstata, quando a doença está avançada, as células carcinomatosas podem propagar-se e migrar para outros tecidos e órgãos causando ainda mais danos. (Guo *et al.*, 2015) Estudos recentes demonstram que a cúrcuma possui atividade inibitória e apoptótica em linhagens de câncer de próstata, assim tendo a possibilidade de tornar-se um novo quimioterápico. Em relação ao melanoma, este está em primeiro lugar em causa de mortes, ocorrendo com mais frequência em países com baixo desenvolvimento. Por ser o principal câncer cutâneo maligno e ser também muito resistente aos quimioterápicos e a radioterapia a busca por novas moléculas que surtissessem um bom efeito tornou-se de suma importância (Figueiredo *et al.*, 2003)..

A curcumina é um componente ativo da cúrcuma, possui cor amarela e é proveniente do rizoma de *Cúrcuma longa*. É significativamente conhecida por possuir propriedades anti-inflamatórias e anticancerígenas (Kurapati *et al.*, 2012). Diversos estudos atuais aludem que a curcumina leva a apoptose pois ela é capaz de modular múltiplas vias de sinalização para desempenhar o seu efeito anticancerígeno, trata-se de um forte supressor da viabilidade celular e da invasão, e respectivamente induz a autofagia nas células de melanoma (Zhao *et al.*, 2016). Estudos recentes demonstram que a cúrcuma possui atividade inibitória e apoptótica em linhagens de câncer de próstata, assim tendo a possibilidade de tornar-se um novo quimioterápico. O presente estudo objetivou avaliar a citotoxicidade da curcumina nas linhagens de próstata e melanoma para posteriormente estudar o mecanismo molecular de indução de morte desta substância e utilizá-la como agente sensibilizante de outros fármacos.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Cultivo de células

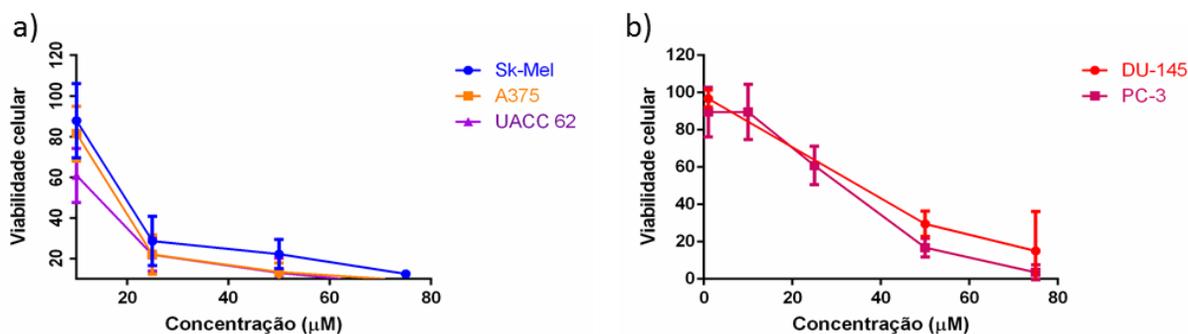
As células das linhagens tumorais DU-145, SK-MEL-28, A357 e UACC62 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, bicarbonato e 1% U/mL de Penicilina/Estreptomicina. A linhagem de câncer de próstata PC-3 foi cultivada em meio F12 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e 1% U/mL de Penicilina/Estreptomicina. Todas as linhagens foram mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> 5% a 37°C e foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro.

## 2.2 Ensaios de citotoxicidade em células neoplásicas: MTT

As células neoplásicas foram plaqueadas na concentração de  $1 \times 10^4$  células/100µl. A curcumina foi testada nas doses de 1, 10, 25 50 e 75 µM. As células foram incubadas com o composto por 72 horas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C e submetidas ao método colorimétrico de MTT. Em seguida, foi adicionado 20 µl da solução de MTT (sal de tetrazolium) por poço, e as placas foram incubadas por 3 horas. A absorbância em espectrofotômetro de placa a 550 nm foi lida após dissolução do precipitado com lauril sulfato de sódio (SDS).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como pode ser observada na Figura 1a), a curcumina inibiu o crescimento celular de maneira dose dependente, das três linhagens de melanoma, a partir da dose de 25 µM. A linhagem UACC62, mostrou-se mais sensível, com um IC<sub>50</sub> 15,66µM (Tabela 1). Em um estudo realizado por Jiang e colaboradores (2015) foi observado que curcumina inibiu de forma seletiva o crescimento de células de melanoma sem afetar as células normais. Segundo Zhao (2016) o tratamento com curcumina na concentração de 25 µM durante 72 h reduziu significativamente o potencial invasivo das células de melanoma A375. Neste estudo, os resultados do ensaio de MTT mostraram que após 48 h de tratamento, a propagação de células A375 foi expressivamente menor.



**Figura 1.** a) Viabilidade e concentração das linhagens SK-MEL, A375, UACC62. b) Viabilidade e concentração das linhagens DU-145 E PC-3

Como pode ser visto na Figura 1b), a curcumina também reduziu o crescimento celular das linhagens de câncer de próstata DU-145 e PC3, de maneira dose dependente. Na análise do IC<sub>50</sub> observamos valores semelhantes para as duas linhagens (Tabela 1), indicando que a

curcumina foi eficiente mesmo na linhagem de caráter mais agressivo PC3. Estes resultados corroboram outros estudos; Kurapat e colaboradores (2012) mostraram que a curcumina mostrou efeito inibitório significativo, com capacidade de inibir a formação de colônias na linhagem PC3 nas concentrações de a 20 e 40  $\mu\text{g} / \text{mL}$ .

Linhagem	Du-145	PC-3	SK-MEL-28	A375	UACC-62
IC <sub>50</sub>	32,58 $\mu\text{M} \pm$ 4,89	31,14 $\mu\text{M} \pm$ 4,60	27,95 $\mu\text{M} \pm$ 9,03	17,37 $\mu\text{M} \pm$ 3,23	15,66 $\mu\text{M} \pm$ 3,71

**Tabela 1.** Análise do IC<sub>50</sub>

#### 4. CONCLUSÃO

A curcumina mostrou-se capaz de reduzir a viabilidade das linhagens tumorais de melanoma e de próstata tendo efeito dose-resposta. Novos ensaios serão realizados para identificar as proteínas-alvo da curcumina nestes dois tipos tumorais.

#### 5. REFERÊNCIAS

- ARAP, M. A.; COELHO, R.F. Câncer de Próstata. *Medicina Net*. v. 51, p. 3093-3131, 2010.
- FIGUEIREDO, L.C., *et al.* Câncer de pele: estudo dos principais marcadores moleculares do melanoma cutâneo. *Rev Bras de Cancerologia*. v.49.3, p.179-183, 2003.
- GUERRA, M. R., *et al.* Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. *Rev bras cancerol*. v. 51.3, p.227-34, 2005.
- GUO, H.; XU, Y; FU, Q. Curcumin inhibits growth of prostate carcinoma via miR-208-mediated CDKN1A activation. *Tumor Biology*. v. 36, p. 8511-8517, 2015.
- JIANG, A., *et al.* Curcumin induces apoptosis through mitochondrial pathway and caspases activation in human melanoma cells. *Molecular biology reports*. v. 42.1, p. 267-275, 2015.
- KURAPATI, K.; RAO, V., *et al.* Combinatorial cytotoxic effects of Curcuma longa and Zingiber officinale on the PC-3M prostate cancer cell line. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*. v. 23.4, p. 139-146, 2012.
- LUTHRA, P. M.; LAL, N. Prospective of curcumin, a pleiotropic signalling molecule from Curcuma longa in the treatment of Glioblastoma. *European journal of medicinal chemistry*. v.109, p. 23-35, 2016.
- MINELLI, L.; PREIRA, V. L. Melanoma-estudo casuístico do Instituto de Cancer de Londrina. *An. bras. Dermatol*. v. 58.2, p.81-4, 1983.
- REZENDE, M. L.; CORRÊA, M. P.; DUARTE, M. D. Estimativa do custo do tratamento de câncer de pele tipo melanoma no Estado de São Paulo-Brasil. *An Bras Dermatol*. v. 84.3, p.237-43, 2009.
- ZHANG, Y. P., *et al.* Effect of curcumin on the proliferation, apoptosis, migration, and invasion of human melanoma A375 cells. *Genet Mol Res*. v. 14.1, p. 1056-67, 2015.
- ZHAO, G., *et al.* Curcumin induces autophagy, inhibits proliferation and invasion by downregulating AKT/mTOR signaling pathway in human melanoma cells. *Oncology reports*. v. 35.2, p. 1065-1074, 2016.

#### 6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos o apoio dos Órgãos de Fomento Capes, CNPQ, FACEPE e INCT-if pelo apoio financeiro para o desenvolvimento da pesquisa.



ÁREA DE SUBMISSÃO: PESQUISA CLÍNICA E PRÉ-CLÍNICA – PC 19

## AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PPGALNAC-T14 EM AMOSTRAS DE TUMORES PRIMÁRIOS DE CÂNCER GÁSTRICO

M.S.S. ALBUQUERQUE<sup>1,2</sup>, A.F. S. FILHO<sup>1,2</sup>, M. R. MARTINS<sup>3</sup>; M.C.PEREIRA<sup>1,2</sup>; M.G. R. PITTA<sup>1,2</sup>; M.J.B.M. REGO<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), Universidade Federal de Pernambuco

<sup>2</sup>Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica - Suely Galdino (NUPIT-SG), Universidade Federal de Pernambuco

<sup>3</sup>Cirurgião do Trato Gastrointestinal do Hospital de Câncer de Pernambuco – HCP

E-mail para contato: marioalbuquerque91@gmail.com

**RESUMO** – *O câncer gástrico possui altas taxas de incidência e mortalidade no mundo . Atualmente, existem várias classificações patológicas sendo a de Lauren a classificação mais utilizada. Porém não existe um único marcador preditivo que ajude a compreender como funcionam os mecanismos moleculares que regem o desenvolvimento morfológico e comportamento dos tumores gástricos, bem como a sua associação com os dados clínicos e experimentais. O presente estudo pretende correlacionar a avaliação da expressão da glicosiltransferase ppGalNAc-T14 por imunohistoquímica, responsável pela síntese de mucinas, com os dados clínicos dos pacientes. Os 17 pacientes analisados foram divididos em 2 grupos, um corresponde a expressão positiva da enzima e o outro a negativa e foi observado uma correlação entre a expressão positiva da enzima com um prognóstico menos favorável, porém ainda se faz necessário aumentar o N dos pacientes para uma confirmação mais conclusiva.*

*Palavras-chave: Imunohistoquímica, Biomarcador, Glicobiologia, Glicosiltransferases*

**ABSTRACT** – *gastric cancer according to some of their altered genetic characteristics presents alarming statistics. Currently, there are various pathological classifications and the most widely used classification is that of Lauren, however there is no positive predictive biomarker that helps us understand how the mechanism of molecules prior to these morphological characteristics and establish a relationship between the clinical data and experimental . This study intends to correlate the expression evaluation of ppGalNAc-T14 glycosyltransferase by immunohistochemistry, responsible for the synthesis of mucins, with clinical patient data. The 17 patients analyzed were divided into 2 groups, one corresponds to a positive expression of the enzyme and the other negative*



*and the correlation was observed between the positive expression of the enzyme with a less favorable prognosis, however is still necessary to increase the N patients for a more conclusive verification.*

*Keywords: Immunohistochemistry, Biomarker, Glycobiology, Glycosyltransferases*

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer gástrico representa o quinto lugar em incidência por câncer no mundo. . Em relação a esta doença, apenas 20% dos pacientes sobrevive mais de 5 anos após o diagnóstico; muitos dos casos são diagnosticados de modo tardio, remetendo a um tratamento paliativo quimioterápico com uma sobrevida consequente de cerca de 1 ano; além de possuir baixa sobrevida, onde somente cerca de 20% dos indivíduos acometidos pela doença não recidivam, muito em parte devido a sua complexidade e heterogenicidade(DENG, N. et al,2012; STEWART, B. W.)

A classificação patológica mais utilizada tem como base os critérios morfológicos de Lauren (MA, J. et al, 2016). porém mais estudos são necessários a fim de se compreender como funcionam os mecanismos das moléculares que determinam as características morfológicas e comportamentais destes tumores

As alterações de padrão molecular menos estudadas são as glicobiológicas, que podem ajudar na compreensão do desenvolvimento dos tecidos malignos em relação ao seu perfil de glicosilação aberrante variável, quando comparado com os seus homólogos normais. (OPPENHEIMER, S. B et al, 2011).

As enzimas responsáveis por parte do metabolismo que constrói a árvore glicobiológica são as glicosiltransferases. Uma destas, a ppGalNAc-T14 carrega UDP-N-acetilgalactosamina (UDP-GalNAc) para o grupo hidroxila de uma serina ou treonina, servindo como substrato para adição de glicanos específicos em proteínas alvo. Contribuindo de forma direta para a síntese das mucinas que estão presentes no estômago. (WANG, H. et al, 2003).A partir disto, o presente estudo visou avaliar esta glicosiltransferase e a sua correlação com parâmetros clínicos e histopatológicos.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

**Amostras clínicas:** Amostras parafinizadas de câncer gástrico selecionadas do arquivo do Serviço de Patologia do Hospital de Câncer de Pernambuco- HCP. Foram incluídos no estudo apenas casos diagnosticados no período de 2013 a 2016 confirmados como tumores primários. Dos prontuários médicos foram obtidas as seguintes informações: idade, sexo, tamanho do tumor no momento do diagnóstico, número e local de linfonodos, estadiamento patológico, recorrência e óbito entre outras.

**Imunohistoquímica:** Os blocos foram desparafinizados em xilol e reidratados em concentrações decrescentes de etanol (100, 95, 80, e 75%). Em seguida foi feita a recuperação antigênica em tampão citrato 100mM, pH 6.0 em micro-ondas 300W por 15 min. Após o resfriamento, as lâminas

foram incubadas com bloqueador de peroxidase endógena por 10` à temperatura ambiente posteriormente foi feito o bloqueio das ligações inespecíficas com bloqueador proteico por 10` a temperatura ambiente. Os cortes histológicos foram incubados com o seguinte anticorpo primário: PPGALNAC-T14 e diluído em PBS-BSA 5% (p/v) overnight a 4°C. Foi aplicado o sistema de amplificação do kit comercial Easylink One por 10` a 25` a temperatura ambiente, e revelados com DAB-H2O2. Os controles positivos foram utilizados segundo indicação do fabricante e os controles negativos foram estabelecidos através da substituição do anticorpo primário por anticorpo anti-IgG humana (DAKO).

**Análise de Dados:** A análise morfológica foi realizada com a utilização sistema integrado de análise de imagens EVOS® FL que utiliza software e câmera monocromática sensível Sony ICX445 (resolução de 1280 x 960 pixels) disponível no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas- LINAT. A análise semi-qualitativa das células marcadas será feita analisando dez campos aleatórios em cada caso. Devido ao pequeno número amostral, não foi possível realizar análise estatística.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão positiva para a ppGalNAc-T14 representou um prognóstico inicial menos favorável que os pacientes com expressão negativa, visto que, eles apresentaram as seguintes características em comparação ao grupo negativo: uma média de idade menor, um número maior de linfonodos retirados em cirurgias, um número maior de casos de reicidiva, um número maior de invasão angiolinfática, Os resultados encontrados estão de acordo com o estudo de Dong Hua (2012), onde uma analoga da sua mesma família ppGalNAc-T2 regula o comportamento associado à metástase celular no câncer gástrico.

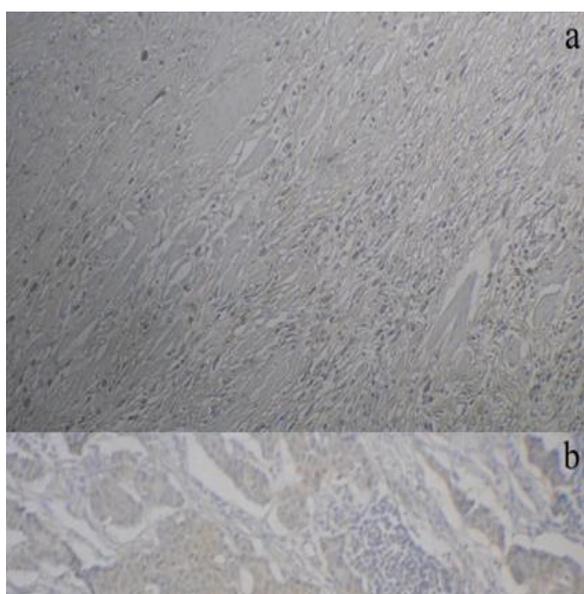


Figura 1- (a) Controle Negativo amostra tumor primario de cancer gastrico.  
(b) Amostra positiva de tumor primario cancer gastrico para glicosiltransferase

Tabela 1 - Dados clínicos dos pacientes.

Tabela 1	Positivo	Negativo
Nº Amostral	13	4
Sexo	9H / 4M	2H / 2M
Estadiamento	I - 23,08% II - 7.69% III - 69.23%	III -100%
Média das Idades	60	62
Média dos Linfonodos Retirados	21	14.75
Média dos Linfonodos Positivos	2.23	2.25
Casos de Reicidiva	2	1
Pacientes em Quimioterapia	53,85%	100%
Pacientes em Radioterapia	46,15%	25%



Classificação de Lauren	I - 15,38%	III -100%
	II - 23,08%	
	III – 61.54%	
Invasão Angiolinfática	2	0

#### 4. CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que há possibilidades de ppGalNAcT-14 representar um fator de prognóstico eficaz para o câncer gástrico, contudo são necessários mais estudos.

#### 5. REFERÊNCIAS

- A. OPPENHEIMER, S. B. in Cancer Therapeutics. *Acta histo.*, v. 113, n. 3, p. 236–247, 2011.
- ANDERGASSEN, U. et al. Glycosyltransferases as Markers for Early Tumorigenesis. *BioMed Res. Inter.*, v. 2015, p. 1–11, 2015.
- DENG, N. et al. A comprehensive survey of genomic alterations in gastric cancer reveals systematic patterns of molecular exclusivity and co-occurrence among distinct therapeutic targets. *Gut*, v. 61, n. 5, p. 673–84, 2012.
- HUA, D. et al. Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2 regulates cellular metastasis-associated behavior in gastric cancer. *Inter. Jour. of Mol. Med.* 1267-1274, 2012 p. 1267–1274, 2012.
- MA, J. et al. Lauren classification and individualized chemotherapy in gastric cancer. *Onco. letters*, v. 11, n. 5, p. 2959–2964, 2016.
- STEWART, B. W., WILD, C. P. World Cancer Report 2014. *WHO*, 2014.
- WANG, H. et al. Cloning and characterization of a novel UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, pp-GalNAc-T14. *Bioch. and Bioph. Res. Comm.*, v. 300, n. 3, p. 738–744, 2003.

#### 6. AGRADECIMENTOS

UFPE, LINAT, NIPIT-SG, HCPE.



**PRODUTOS NATURAIS E  
QUÍMICA MEDICINAL**

ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL – PNQM 3

## CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA DA LÂMINA FOLIAR DE *Psidium guajava* L.

R. D. SÁ<sup>1,2</sup>, A. S. C. O. SANTANA<sup>1</sup>, A. L. VASCONCELOS<sup>1,2</sup> e K. P. RANDAU<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Farmacognosia.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica.

E-mail para contato: dsa.rafaela@gmail.com

**RESUMO** – *Psidium guajava* L., popularmente conhecida no Brasil como goiabeira, é uma árvore frutífera de até 7 m de altura, originária da América Central e do Sul, mas com ocorrência em todo o mundo. Seu uso medicinal popular mais citado na literatura é para o tratamento da diarreia. É uma das espécies presentes na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde. O objetivo do trabalho foi realizar testes histoquímicos na lâmina foliar de *P. guajava*. Secções transversais de lâminas foliares frescas foram submetidas a diferentes reagentes. Foram identificados compostos fenólicos, taninos, compostos lipofílicos, óleos essenciais, triterpenos e esteroides, lignina e foi demonstrado que os cristais são de oxalato de cálcio. O estudo revelou os locais de acúmulo e/ou síntese dos compostos químicos da espécie e auxilia na sua padronização farmacobotânica.

**Palavras-chave:** Farmacobotânica. Goiabeira. Padronização.

**ABSTRACT** – *Psidium guajava* L., popularly known in Brazil as “goiabeira”, is a fruit tree of up to 7 m in height, originating in Central and South America, but occurring worldwide. His popular medicinal use most often cited in the literature is for the treatment of diarrhea. It is one of the species in the National Relation Medicinal Plants of Interest to Unified Health System. The study aimed to perform histochemical tests on the leaf blade of *P. guajava*. Cross-sections of fresh leaf blades were subjected to different reagents. They were identified phenolic compounds, tannins, lipophilic compounds, essential oils, triterpenes and steroids, lignin and it was demonstrated that the crystals are of calcium oxalate. The study revealed the local of accumulation and/or synthesis of chemical compounds of the species and assists in their pharmacobotanical standardization.

**Keywords:** Goiabeira. Pharmacobotany. Standardization.



## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a família Myrtaceae aparece entre as famílias mais comuns na maioria das formações vegetais (Souza; Lorenzi; 2005). O gênero *Psidium* é representado por 61 espécies (Sobral *et al.*, 2016). Dentre elas, destaca-se *Psidium guajava* L., que é conhecida popularmente no Brasil como goiabeira. É uma árvore frutífera de até 7 m de altura, originária da América Central e do Sul, mas com ocorrência em todo o mundo (Joly, 1985; Lorenzi; Matos, 2002). Seus frutos, mais conhecidos como goiaba, guaiaba, guava e araçá-goiaba, podem apresentar polpa de coloração branca, rosa ou quase vermelha e são muito apreciados pelo sabor agradável (Sousa *et al.*, 2004; Lorenzi; Lacerda; Bacher, 2015).

Seu uso medicinal popular mais citado na literatura é para o tratamento da diarreia. As folhas são a parte da planta mais indicadas para esse fim, sendo preparadas na forma de infusão ou decocção (Ribeiro *et al.*, 2014). A indicação é tomar o chá duas a três vezes ao dia (Tölke, 2014). Há vários estudos científicos que justificam esse uso popular das folhas da espécie como antidiarreica (Almeida *et al.*, 1995; Salgado *et al.*, 2006; Birdi *et al.*, 2010; Gupta; Birdi, 2015; Mazumdar *et al.*, 2015).

Outros usos medicinais mencionados para as folhas da espécie são para o tratamento de diabetes (Sousa *et al.*, 2004); disenteria, vômitos, problemas digestivos e dor de estômago, dor de cabeça, dor e afecções da garganta (Albuquerque *et al.*, 2007; Messias *et al.*, 2015); gripe (Coutinho *et al.*, 2002); inflamações num geral, gengivite e alívio do incômodo do nascimento dos dentes em crianças (Baptistel *et al.*, 2004; Albuquerque *et al.*, 2007; Messias *et al.*, 2015).

A planta está presente na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) (Brasil, 2009). No intuito de ampliar as informações científicas sobre a espécie, o trabalho teve como objetivo realizar a caracterização histoquímica da lâmina foliar de *P. guajava* através de microscopia óptica de luz.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL VEGETAL

O material vegetal foi coletado em dezembro de 2015, no bairro de Aldeia, em Camaragibe-PE, Brasil e uma exsicata foi depositada no Herbário Dárdano de Andrade Lima, no Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), sob número de tombamento 88150.

### 2.2 HISTOQUÍMICA

Testes histoquímicos foram realizados em secções transversais de várias lâminas foliares frescas, obtidas à mão livre, usando lâminas de aço e medula do pecíolo de embaúba (*Cecropia* sp.) como material de suporte. Os reagentes relacionados a seguir foram utilizados para indicar a presença das substâncias: dicromato de potássio (10%) para compostos fenólicos (Johansen, 1940); vanilina

clorídrica para taninos (Mace; Howell, 1974); Sudan III para compostos lipofílicos (Sass, 1951); Nadi para óleos essenciais (David; Carde, 1964); tricloreto de antimônio para triterpenos e esteroides (Mace *et al.*, 1974); Dragendorff para alcaloides (Brasil, 2010); Lugol para amido (Johansen, 1940); floroglucinol para lignina (Johansen, 1940) e ácido clorídrico (10%) para estabelecer a natureza dos cristais (Jensen, 1962).

Controles foram realizados em paralelo aos testes histoquímicos e lâminas semipermanentes foram preparadas contendo as secções transversais (Johansen, 1940; Sass, 1951). A análise das lâminas histológicas foram conduzidas em imagens em software (*Toup View Image*), obtidas por uma câmera digital acoplada a um microscópio óptico de luz (*Alltion*).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os compostos fenólicos foram evidenciados após a utilização do dicromato de potássio (10%) nas células parenquimáticas da nervura e nas camadas parenquimáticas sub-epidérmicas. Os taninos foram encontrados no mesofilo, nas células que circundam as cavidades secretoras, além de estarem presentes também no parênquima e colênquima da nervura e nas células epidérmicas.

O Sudan III demonstrou a presença de compostos lipofílicos na cutícula e nas cavidades secretoras. Nessas estruturas também ficou evidente a presença de óleos essenciais, com o uso do Nadi. Triterpenos e esteroides foram visualizados no parênquima e colênquima da nervura central.

A lignina presente no xilema foi evidenciada com o uso do floroglucinol. O ácido clorídrico (10%) confirmou que os cristais são de oxalato de cálcio, após a dissolução dos mesmos. Os testes para alcaloides e amido foram negativos.

Os constituintes químicos das folhas de *P. guajava* reportados na literatura são fenóis, flavonoides, taninos e terpenos (Sohafy *et al.*, 2009; Alencar *et al.*, 2010; Okamoto; 2010; Park *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2012; Díaz-de-Cerio *et al.*, 2016). Encontra-se na literatura ainda uma grande quantidade de estudos que relatam o isolamento desses compostos, principalmente dos flavonoides e dos terpenos (Seo *et al.*, 2014; Begum *et al.*, 2015; Jian *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016; Ouyang *et al.*, 2016).

Os compostos fenólicos são indicados como os responsáveis pela atividade antidiabética da planta (Liu *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015). O óleo essencial das folhas de *P. guajava* tem sido estudado com relação a sua composição, a qual demonstra uma variabilidade de acordo com o local de coleta da planta, e também acerca de suas atividades biológicas (Ogunwande *et al.*, 2003; Khadhri *et al.*, 2014; Satyal *et al.*, 2015).

Os oxalatos podem ser encontrados em quantidades que variam de 3 a 80% do peso seco das plantas (Nguyen; Savage, 2013). O oxalato de cálcio é frequentemente encontrado em diferentes tecidos vegetais, a exemplo do espinafre, ruibarbo, acelga, beterraba, tomate, nozes e cacau (Krause; Mahan, 1991; Massey *et al.*, 1993).



#### 4. CONCLUSÃO

O trabalho forneceu informações sobre a histolocalização dos componentes químicos da lâmina foliar de *P. guajava*, confirmando a presença de metabólitos descritos na literatura e contribuindo com a padronização farmacobotânica da espécie.

#### 5. REFERÊNCIAS

- ALENCAR, N. L.; ARAÚJO, T. A. S.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. The inclusion and selection of medicinal plants in traditional pharmacopoeias-evidence in support of the diversification hypothesis. *Econ. Bot.*, v. 64, n. 1, p. 68-79, 2010.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopeia Brasileira*. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010.
- GUPTA, P.; BIRDI, T. *Psidium guajava* leaf extract prevents intestinal colonization of *Citrobacter rodentium* in the mouse model. *J. Ayurveda Integr. Med.*, v. 6, p. 50-52, 2015.
- JOHANSEN, D. A. *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc., 1940.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.
- METCALFE, C. R.; CHALK, L. *Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses*. Oxford: Clarendon Press, 1950.
- NGUYEN, H. V. H.; SAVAGE, G. P. Oxalate content of New Zealand grown and imported fruits. *J. Food Compost. Anal.*, v. 31, p. 180-184, 2013.
- SASS, J. E. *Botanical microtechnique*. 2. ed. Ames: The Iowa State College Press, 1951.
- SATYAL, P.; PAUDEL, P.; LAMICHHANE, B.; SETZER, W. N. Leaf essential oil composition and bioactivity of *Psidium guajava* from Kathmandu, Nepal. *Am. J. Essent. Oils Nat. Prod.*, v. 3, p. 11-14, 2015.

#### 6. AGRADECIMENTOS

Capes.



ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL – PNQM 4

## APLICAÇÃO DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DE SOLUÇÃO EXTRATIVA PADRONIZADA DE *Spondias mombin* JACQ.

J. C. B. MACHADO<sup>1</sup>, M. R. A. FERREIRA<sup>1,2</sup>, L. A. L. SOARES<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFPE

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Centro de Ciências Biológicas, UFPE

E-mail para contato: janaina\_carla29@hotmail.com

**RESUMO** – *Spondias mombin Jacq.*, conhecida popularmente como cajazeira, é uma árvore frutífera de grande porte utilizada tradicionalmente e que apresenta polifenóis relatados na sua composição. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi padronizar soluções extrativas das folhas de *Spondias mombin Jacq.*, através de planejamento fatorial, a fim de determinar as melhores condições para o maior rendimento em teor polifenóis totais (TPT). Os experimentos foram realizados de acordo com um desenho fatorial 2<sup>3</sup>, empregando com os fatores a quantidade de droga (10, 15 e 20 g) e proporção de etanol (40, 60 e 80%, v/v). O TPT foi determinado conforme a Farmacopeia Brasileira 5 ed., e os resultados avaliados com auxílio do programa Statistica 6.0. Os dados foram usados para gerar superfícies de respostas e gráficos de paretos. De acordo com a análise estatística, a proporção de EtOH foi fator que mais influenciou o TPT. Na sequência, o termo quadrático da quantidade de droga teve papel importante na resposta do TPT. Desta forma, o fator EtOH no nível máximo (80%, v/v) e o nível intermediário para quantidade de droga (15g) foram as condições mais favoráveis para a maximização do teor de polifenóis.

**Palavras-chaves:** Cajá; Padronização; Planejamento fatorial.

**ABSTRACT** – *Spondias mombin Jacq.*, commonly known as cajazeira, is a large fruit tree traditionally used and has polyphenols reported in its composition. In this way, the aim of this study was to standardize extractive solutions from the leaves of *Spondias mombin Jacq.*, by using factorial design in order to optimize the extractive conditions for the highest yield in total polyphenols content (TPC). The experiments were performed according to a factorial design 2<sup>3</sup> using as factors the amount of herbal drug (10, 15 and 20 g) and ethanol ratio (40, 60 and 80% v / v). The TPC was determined according to the Brazilian Pharmacopoeia 5th ed., and the results were evaluated using the software Statistica 6.0. The data were used to generate the response surface and Pareto chart. According to the statistical analysis, the proportion of EtOH was the major factor that influenced the response. After that, the quadratic term of the quantity of drugs had an

*important role in TPT response. Thus, the maximum factor in EtOH (80%, v/v) and the intermediate level to amount of drug (15g) were the most favorable conditions for maximizing the TPC.*

*Keywords: Cajá; Standardization; Factorial design.*

## 1. INTRODUÇÃO

*Spondias mombin* Jacq., conhecida popularmente como cajazeira, é uma árvore frutífera de grande porte utilizada tradicionalmente como diurético, febrífugo, emético, antidiarreico, descrito na literatura por apresentar propriedades antibacteriana e antiviral (Rodrigues; Hesse, 2000; Ayoka *et al.*, 2008). Quanto a composição fitoquímica, grande quantidade de compostos fenólicos e derivados de flavonoídicos foram descritos e em análise por cromatografia líquida de alta eficiência indicou a ocorrência de ácido clorogênico, ácido elágico e isoquercetina (Cabral, *et al.*, 2016). A presença de saponinas, esteróis e triterpenos, flavonoides e alcaloides também foram descritos na literatura (Matos, 2002; Njoku; Akumefala, 2007).

Considerando o desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos, a padronização da solução extrativa é fundamental para assegurar a qualidade e reprodutibilidade das características de preparações vegetais. Assim, a investigação e quantificação de efeitos dos fatores que possam atuar sobre os parâmetros extrativos permitem maximizar a qualidade e minimizar a variabilidade. Com isto, os planejamentos fatoriais geram subsídios para detectar e estudar o efeito destes fatores, empregando modelos estatísticos que permitam assegurar um resultado com menos erros aleatórios (Cunha *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2015).

Desta forma, o objetivo do trabalho foi padronizar soluções extrativas das folhas de *Spondias mombin* Jacq. empregando planejamento experimental para quantificação dos fatores envolvidos no rendimento da extração de polifenóis totais.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

A extração foi realizada por turbólise empregando as folhas secas e moída de *Spondias mombin*, empregando 4 ciclos de 1 minuto com intervalos de 5 minutos. As influências da quantidade de droga vegetal (10, 15 e 20 g) e da proporção de etanol (40, 60 e 80%, v/v) sobre o teor de polifenóis totais (TPT) foram avaliadas através de um planejamento fatorial do tipo 2<sup>3</sup>. O TPT foi determinado por espectrofotometria UV-Vis utilizando metodologia de Folin-ciocalteu conforme a Farmacopeia Brasileira (FB5, 2010). Os dados do desenho experimental foram analisados com o auxílio do programa Statistica<sup>®</sup> 6.0 (StatSoft, USA) e usados para gerar gráfico de Paretos e superfície de respostas.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A superfície de resposta e o gráfico de Paretos obtidos a partir do desenho fatorial estão apresentados na figura 1.

De acordo com o gráfico de Paretos (figura 1A), a extração de polifenóis é orientada principalmente pela concentração do líquido extrator. A influência positiva do fator indica que a resposta experimental (TPT) acompanha a concentração EtOH. Por outro lado, o termo quadrático negativo significativo observado para o solvente, indica a presença de curvatura com valores mínimos. Na sequência, a importância significativa para o termo quadrático positivo do fator droga, confere a variável curvatura com ocorrência de máximo. Os dados significativos observados no gráfico de Paretos ficam mais nítidos quando observamos a superfície de resposta (figura 1B). A nítida influência do termo linear para o solvente denota as respostas máximas em soluções extrativas preparadas com EtOH 80%. Por outro lado, a redução na resposta segue a influência do termo quadrático com queda acentuada até a concentração de EtOH 60% e sofre menor decaimento até o EtOH 40%.

A influência da proporção de droga vegetal é menos importante que o EtOH, mas as contribuições significativas para o termo quadrático para este fator e a termo referente a interação dos fatores (figura 1A), revelam que a curvatura detectada para a proporção de droga vegetal apresenta máximos importantes e não deve ser desconsiderada.

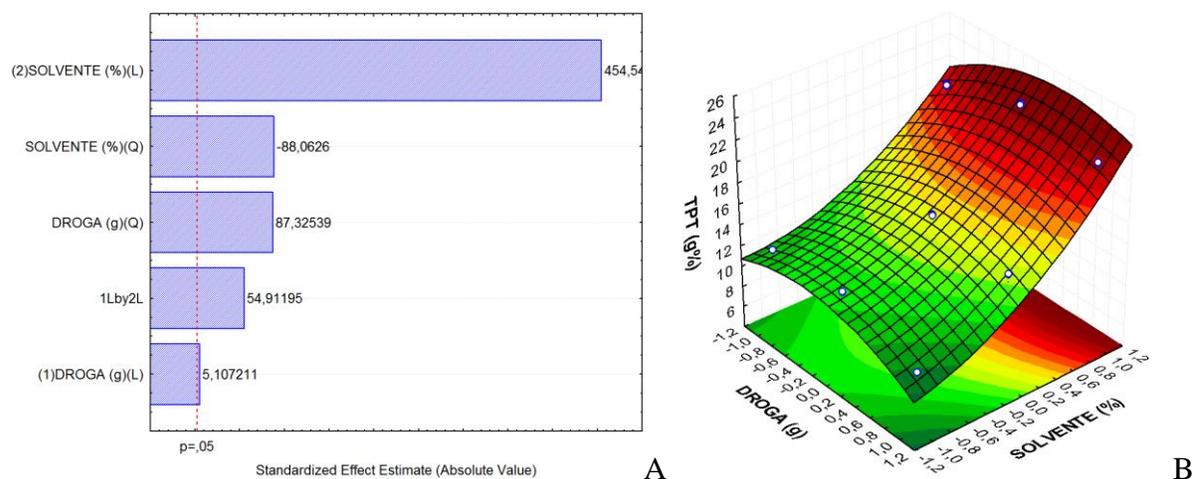


Figura 1 – Gráfico de Paretos (A) e superfície de resposta (B) para os dados do fatorial.

Por fim, a combinação das condições mais favoráveis para maximização da extração de polifenóis totais a partir das folhas de *S. mombin* incluem o emprego de 15 g da droga vegetal e etanol 80% (v/v) como solvente extrator. Nestas condições, o teor de polifenóis totais foi de 22,68%.

#### 4. CONCLUSÃO

O emprego de desenho experimental seguido de superfície de resposta para avaliar as influências da proporção de droga vegetal e da concentração de etanol sobre o teor de polifenóis totais de extratos das folhas de *S. mombin*; permitiram identificar as condições mais propícias dentro do campo experimental estudado, para maximizar a extração destes compostos. Os dados revelaram a importância do solvente sobre a extração com contribuição proporcional a sua concentração. A



proporção de droga apresentou menor influência sobre a variável de resposta (TPT), entretanto como é possível observar a tendência a maiores respostas na proporção intermediária. Em conclusão, a condição ótima para preparação de extratos das folhas de *S. mombin* com maior conteúdo dos polifenóis foi ajustada em 15 g de droga vegetal extraídas com etanol 80% (v/v), cujo rendimento em polifenóis foi de 22,68 %.

## 5. REFERÊNCIAS

- AYOKA, A. O.; AKOMOLAFE, R. O.; AKINSOMISOYE, O. S.; UKPONMWAN, O. E. Medicinal and economic value of *Spondias mombin*. *African Journal of Biomededical Research*, v.11, p. 129–36, 2008.
- CABRAL, B.; SIQUEIRA, E. M. S.; BITENCOURT, M. A. O.; LIMA, M. C. J. S.; LIMA, A. K.; ORTMANN, C. F. et al. Phytochemical study and anti-inflammatory and antioxidant potential of *Spondias mombin* leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 26, p. 1-8, 2016.
- CUNHA, F. P.; COSTA, L. J. L.; FERNANDES, A. J. D.; SOUZA, T. P.; SOARES, L. A. L.. Development and optimization of extractives from *Astronium urundeuva* (allemão) Engl. by factorial design. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 52, p. 647-652, 2009.
- LIMA, B. S.; RAMOS, C. S.; SANTOS, J. A.; RABELO, T. K.; SERAFINI, M. R.; SOUZA, C. S.; SOARES, L.A.L.; QUINTANS-JUNIOR, L. J.; MOREIRA, J. C.; GELAIN, D. P.; ARAUJO, A. A.; SILVA, F. A.. Development of standardized extractive solution from *Lippia sidoides* by factorial design and their redox active profile. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 25, p. 301-306, 2015.
- NJOKU, P. C.; AKUMEFALA, M. I. Phytochemical and nutrient evaluation of *Spondias mombin* leaves. *Pakistan Journal of Nutrition*, v.6, p.613–615, 2007.
- RODRIGUES, K. F.; HESSE, M. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. *Journal of Basic Microbiology*, v. 40, p. 261–267, 2000.
- TIWARI, P. et al. Phytochemical screening and Extraction: A Review. *International Pharmaceutica Scientia*, v.1, n.1, p.98-106, 2011.

## 6. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa PIBIC concedida, a qual possibilitou o desenvolvimento do trabalho. Os autores agradecem ainda à FACEPE (APQ-0493-4.03/14) e ao CNPq (308386/2015-9).



ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL – PNQM 5

## UTILIZAÇÃO DE PLANEJAMENTO FATORIAL COMO ESTRATÉGIA PARA OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO EXTRATIVO DE *Morus nigra* L.

P. A. SAMPAIO<sup>1,2</sup>, N. A. C. de SOUZA<sup>1</sup>, H. A. P. TEIXEIRA<sup>1</sup>, E. C. V. PEREIRA<sup>1</sup>, J. M. T de ALENCAR FILHO<sup>1</sup>, P. J. ROLIM NETO<sup>4</sup>, J.R.G da SILVA ALMEIDA<sup>3</sup>, L. A. ROLIM<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Central de Análises de Fármacos, Medicamentos e Alimentos (CAFMA), Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Petrolina-PE, *Bet al.*

<sup>2</sup>Pós-graduação em Recursos Naturais do Semiárido, Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Petrolina-PE, *Bet al.*

<sup>3</sup>Núcleo de Estudos e Pesquisa de Plantas Medicinais (NEPLAME), Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Petrolina-PE, *Bet al.*

<sup>4</sup>Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE, *Bet al.*

E-mail para contato: sampaiopedrita@gmail.com

*RESUMO – Morus nigra L., conhecida popularmente com “amora-miúra”, é uma espécie utilizada na medicina tradicional para diferentes tipos de doenças. Este trabalho objetivou a otimização do processo extrativo da M. nigra (EEB Mn) a partir do planejamento fatorial (PF) 2<sup>2</sup>. Utilizou-se a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a arranjo de diodo (CLAE-DAD), com qual foi feita a análise quali-quantitativa da concentração de rutina (RUT) e isoquercetina (ISO), tanto do extrato obtido por maceração quanto pelos extratos desenvolvidos no desenho experimental. O PF utilizado foi de 2<sup>2</sup> para o EEB Mn e escolha do extrato padrão, o comparando-se estes dados com os obtidos, a partir da quantificação de RUT e ISO. A partir da análise por CLAE-DAD do EEB Mn obtido por maceração obteve-se para RUT de 0,86 ± 0,09 µg/mg e para ISO de 2,78 ± 0,13 µg/mg. A análise dos EEB Mn do desenho experimental, demonstrou que o fator aquecimento influencia positivamente 4,64 vezes e a agitação 2,55, ambos frente ao teor de RUT. Para ISO, o aquecimento influencia positivamente 2,51 assim como, a agitação 2,04. A partir desses dados pode-se determinar que as melhores condições extrativas para uma maior extração de RUT e ISO foi a influência do aquecimento e agitação, obtendo-se respectivamente as concentrações de > 12 µg/mg e > 30 µg/mg. Os resultados do desenho experimental fornecem informações importantes da otimização da obtenção do EEB de M. nigra L. Palavras chave: Rutina, Isoquercetina, Desenho experimental.*

*ABSTRACT – Morus nigra L., popularly known to "amora-miúra" is a species used in traditional medicine in the treatment of different types of diseases. This study aimed to*

*optimize the extraction process of M. nigra (Mn CEE) from the factorial design (PF) 2<sup>2</sup>. We used the technique Liquid Chromatography High Performance coupled diode array (HPLC-DAD), with which it was made qualitative and quantitative analysis of concentration of rutin (RUT) and isoquercetin (ISO) both of the extract obtained by maceration as extracts developed by the experimental design. PF used was 2<sup>2</sup> for Mn CEE and choice of standard extract, by comparing these data with those obtained from the RUT and ISO quantification. From the analysis by HPLC-DAD Mn CEE obtained by maceration was obtained for RUT  $0.86 \pm 0.09 \mu\text{g}/\text{mg}$  and ISO of  $2.78 \pm 0.13 \mu\text{g}/\text{mg}$ . The analysis of Mn CEE experimental design, showed that positively influences the heating factor and stirring 4.64 times 2.55, both compared to the RUT content. ISO, heating positively influences 2.51 as well as the agitation 2.04. From this data we can determine the best extraction conditions for greater extraction RUT and ISO was the influence of heating and stirring, yielding respectively the concentrations of  $> 12 \mu\text{g}/\text{mg}$  and  $> 30 \mu\text{g}/\text{mg}$ . The results of the experimental design provide important information of optimizing the achievement of CEE M. nigra L.*

*Keywords: Rutin, Isoquercetin, Experimental design.*

## 1. INTRODUÇÃO

A espécie *Morus nigra* L. é conhecida pela população na região do Vale do São Francisco como “amora-miúra”, esta apresenta utilização muito difundida na forma de chá (decocto), principalmente para o tratamento de diabetes, colesterol, problemas cardiovasculares, obesidade e gota (Oliveira et al., 2013). Oliveira e colaboradores (2013) avaliou a toxicidade pré-clínica do decocto e observou que apresenta baixa toxicidade.

Existe vários compostos vegetais que podem influenciar o aumento da regulação sobre o perfil antioxidante, como o ácido betulínico, já identificado em extratos de folhas de *Morus nigra* L. (Padilha et al., 2010). A padronização e controle desses fatores na produção das drogas e derivados vegetais são imprescindíveis para a qualidade do produto fitoterápico (Fonseca, 2009).

Diante das atividades farmacológicas comprovadas em estudos anteriores da espécie *M. nigra* L. e a importância da padronização da droga vegetal. Neste trabalho, os objetivos alcançados neste trabalho foram a padronização do extrato etanólico bruto (EEB) de *M. nigra* L., utilizando-se o planejamento para controle de variáveis independentes assim como, a identificação e quantificação de flavonoides por CLAE-DAD.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Otimização do EEB Mn utilizando-se planejamento fatorial

Primeiramente foi obtido o EEB Mn por maceração exaustiva a partir de folhas pulverizadas. Para otimização do EEB Mn foi realizado um PF 2<sup>2</sup>. Esses níveis são chamados de baixo e alto, sendo representados por convenção, (-1) e (+1), respectivamente. Neste caso, utilizou-se como fatores independentes: a agitação (200 RPM) e aquecimento (40 °C); e dois níveis: presença (+1) e ausência (-1), fixando-se 120 minutos como tempo para cada condição Tanto os extratos quanto as análises foram feitas em triplicata.

## 2.2 Determinação quali-quantitativa de flavonoides por CLAE-DAD

As análises foram realizadas utilizando um cromatógrafo líquido Shimadzu® (LC-20 AT). As soluções extrativas de estudo (EEB Mn) foram submetida individualmente à análise (triplicata) na concentração de 1mg/mL nas seguintes condições cromatográficas: como fase estacionária foi utilizada uma coluna C18 (Thermo Scientific® Hypersil), como fase móvel: solução A - água + 0,01% (v/v) de ácido trifluoracético (TFA) e solução B: acetonitrila (ACN), com fluxo de 0,8 mL/min e volume de injeção de 5 µL.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Perfil cromatográfico do EEB Mn

A análise por CLAE-DAD dos EEB Mn permitiu determinar o perfil cromatográfico deste extrato e com isso quantificar os marcadores analíticos (Figura 1). A partir da análise por CLAE-DAD do extrato obtido por maceração obteve-se como resultado para RUT (B) de  $0,86 \pm 0,09$  µg/mg e para ISO (C) de  $2,78 \pm 0,13$  µg/mg.

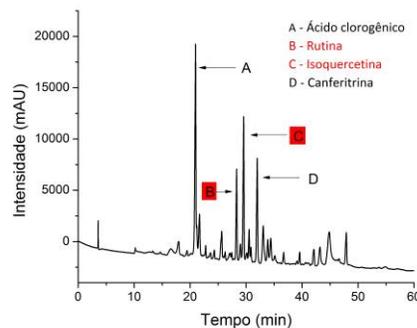


Figura 1- Perfil cromatográfico do EEB Mn

### 3.2 Otimização do processo extrativo do EEB Mn

De acordo, com as barras horizontais de cima para baixo, o resultado demonstra que o fator aquecimento apresenta valor positivo de 4,64 vezes e a agitação influenciou 2,55 vezes frente ao teor de RUT (Figura 2). Na figura 3 observa-se que a região de máxima extração de RUT encontra-se nos níveis + 1, tanto para aquecimento quanto para agitação, obtendo-se o máximo de extração de RUT (> 12 µg/mg). Na análise dos resultados para ISO observa-se que o fator aquecimento apresenta valor positivo de 2,51 vezes e a agitação influenciou 2,04 vezes frente ao teor de ISO (Figura 4). Na figura 5, observa-se que a região de máxima extração de ISO encontra-se nos níveis + 1, tanto para aquecimento quanto para agitação, obtendo-se o máximo de extração de RUT (> 30 µg/mg).

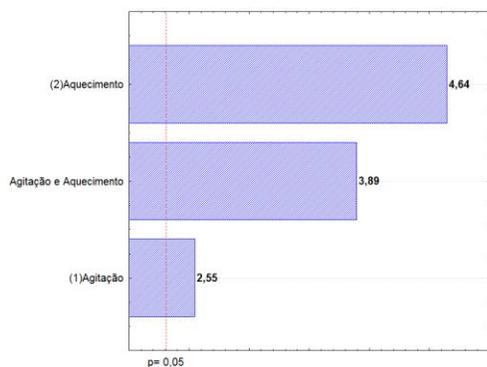


Figura 2 – Gráfico de Pareto do EEB Mn para RUT.

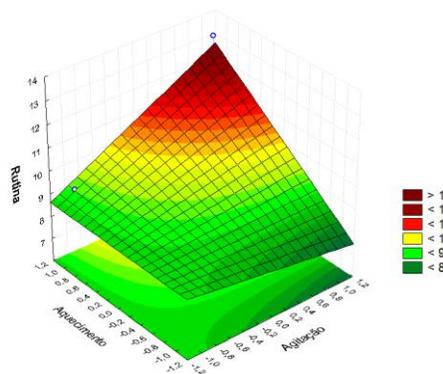


Figura 3 – Curvas de nível da superfície resposta.

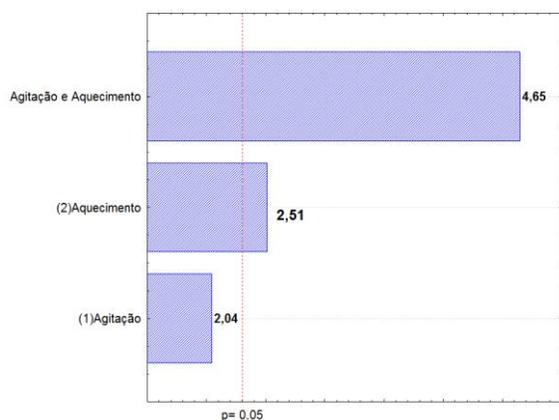


Figura 4 – Gráfico de Pareto do EEB Mn para ISO.

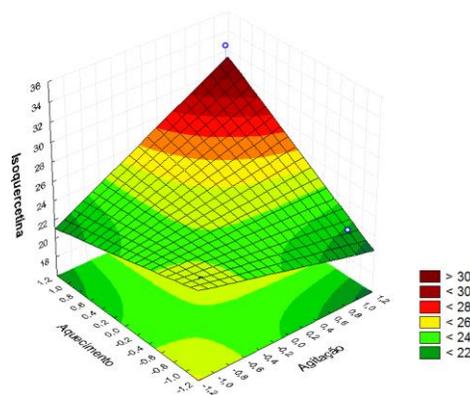


Figura 5- Curvas de nível da superfície resposta

## 4. CONCLUSÃO

A padronização do processo extrativo utilizando-se o desenho experimental avaliada analiticamente quanto ao teor de rutina e isoquercetina nos extratos. Evidenciou que os melhores parâmetros de extração para o EEB Mn é a presença de aquecimento e agitação. Os resultados deste estudo fornecem informações importantes quanto a padronização desta droga vegetal e com isso a utilização destes dados no futuro desenvolvimento de um produto fitoterápico a base de *Morus nigra* L. Esses dados servirão ainda como base para futuros estudos farmacológicos que poderão evidenciar a atividade antinociceptiva dessa espécie vegetal.

## 5. REFERÊNCIAS



FONSECA, Francisco Noé. Desenvolvimento tecnológico de fitoproduto a partir de *Justicia pectoralis*- Chambá: obtenção de extrato seco padronizado (CLAE-DAD) e avaliação farmacológica. 2009. 131f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Ceará, Campus Fortaleza, Fortaleza-CE, 2009

OLIVEIRA, A.C.B. et al. Avaliação toxicológica pré-clínica do chá das folhas de *Morus nigra* L. (Moraceae). Revista *Bet aleira* de Plantas Mediciniais. v. 15, n.2, p. 244-249, 2013.

PADILHA, M. M. et al. Estudo farmacobotânico das folhas de amoreira-preta, *Morus nigra* L., Moraceae. Revista *Bet aleira* de Farmacognosia, Curitiba, v.20, n.4, 2010.

## 6. AGRADECIMENTOS:

FACEPE, UNIVASF, CAFMA e NEPLAME.

ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL – PNQM 6

## PERFIL FITOQUÍMICO DE FOLHAS DE *Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss. (APIACEAE)

G. S. CAVALCANTI<sup>1</sup>, B. M. NUNES<sup>1</sup>, R. D. SÁ<sup>1,2</sup> e K. P. RANDAU<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Farmacognosia.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica.

E-mail para contato: girl.lenesilva@hotmail.com

**RESUMO** – *Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss. é uma erva aromática pertencente à família *Apiaceae*, sendo atualmente cultivada em todo o mundo. É conhecida como salsa, salsinha ou cheiro verde e é muito utilizada como condimento alimentar, principalmente pelo seu efeito aromatizante. O óleo essencial é um dos metabólitos mais estudados da planta, tendo sua composição determinada. Os demais metabólitos ainda são pouco conhecidos. Por isso, o trabalho teve como objetivo realizar uma prospecção fitoquímica das folhas de *P. crispum*. Os principais grupos de metabólitos foram caracterizados por Cromatografia em Camada Delgada, utilizando extrato metanólico obtido por infusão. Na prospecção fitoquímica foram identificados: monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos, esteroides, saponinas, flavonoides, derivados cinâmicos, taninos hidrolisáveis e açúcares redutores. Os testes para alcaloides, cumarinas e taninos condensados foram negativos. Os resultados apresentados contribuem para o conhecimento da composição química da espécie. **Palavras-chave:** Salsa, Cromatografia em Camada Delgada, Padronização.

**ABSTRACT** – *Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss. is an aromatic herb belonging to the family *Apiaceae*, currently being grown worldwide. It is known as “salsa”, “salsinha” or “cheiro verde” and it is widely used as a food flavoring, mainly for their flavoring effect. The essential oil is one of the most studied plant metabolites, having its composition determined. The other metabolites are still poorly known. Therefore, the study aimed to conduct a phytochemical screening of the leaves of *P. crispum*. The main groups of metabolites were characterized by Thin Layer Chromatography, using methanolic extract obtained from infusion. In the phytochemical screening were identified: monoterpenes, sesquiterpenes, triterpenes, steroids, saponins, flavonoids, cinnamic derivatives, hydrolysable tannins and reducing sugars. The test for alkaloids, coumarins and condensed tannins were negative. The presented results contribute to the knowledge of the chemical composition of the species.

**Keywords:** Sals, Standardization, Thin layer chromatography.



## 1. INTRODUÇÃO

A espécie *Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss. é conhecida popularmente como salsa, salsinha ou cheiro-verde. Tem sua origem na região do Mediterrâneo, no sul da Europa e atualmente é cultivada em todo o mundo. Pertence à família Apiaceae, sendo uma erva fortemente aromática, anual ou bianual (Lorenzi; Matos, 2002).

A espécie fresca ou seca é bastante utilizada como condimento alimentar, principalmente por seu efeito aromatizante, podendo também ser escolhida para fazer parte de ornamentações (Alves, 2007). Seu óleo essencial pode ser extraído a partir das sementes e folhas, a partir da planta colhida na formação de sementes, antes da maturação. É utilizado como um agente aromatizante ou fragrância em perfumes e cremes (Farzaei *et al.*, 2013).

Alguns estudos relatam que o óleo essencial obtido das folhas possui componentes como:  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, sabineno,  $\rho$ -cimeno, limoneno,  $\alpha$ -felandreno,  $\beta$ -felandreno,  $\alpha$ -terpineno, hexanal, carotol,  $\alpha$ -terpineno, cariofileno, fenilacetaldéido, terpineol, thujeno, canfeno, 3-careno, tolueno, campeno,  $\alpha$ -terpinoleno, eugenol,  $\rho$ -1,3,8-menthatrieno, cis-hex-3-en-1-ol, propanodiol, além de miristicina e o apiol. Esses dois últimos compostos são os responsáveis pela atividade antioxidante do óleo (Zhang *et al.*, 2006; Azees *et al.*, 2008).

De acordo com Zengh *et al.* (1992), a miristicina que pode ser um agente quimiopreventivo do câncer eficaz. Muitos relatos mencionam as folhas dessa planta devido as suas atividades farmacológicas, como imunomoduladora, antioxidante, antidiabética, antifúngica, entre outras (Delespaul *et al.*, 2000; Ozsoy-Sacan *et al.*, 2006; Farzaei *et al.*, 2013).

Entretanto, são poucos os estudos sobre os demais metabólitos secundários presentes nas folhas da espécie. Por isso, o objetivo do trabalho foi realizar uma prospecção fitoquímica das folhas de *P. crispum*.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

As folhas frescas de *P. crispum* foram coletadas no Sítio Canha em Vitória de Santo Antão-PE, Brasil e foram submetidas à infusão metanólica a 10% (v/v), sob agitação durante 30 minutos. Após o extrato obtido, foi realizada uma triagem fitoquímica através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) para analisar qualitativamente os diversos grupos de metabólitos presentes na espécie. As análises foram efetuadas empregando-se como fase estacionária placas prontas de gel de sílica (Macherey–Nagel), fases móveis variadas e reveladores adequados, obedecendo a um protocolo desenvolvido no Laboratório de Farmacognosia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, apoiado em estudos de Harborne (1998) e Wagner e Bladt (2001), com modificações.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O quadro 1 mostra os resultados obtidos após a prospecção fitoquímica das folhas de *P. crispum*, utilizando extrato metanólico.

Quadro 1 - Resultados da prospecção fitoquímica das folhas de *Petroselinum crispum*

METABÓLITOS	FOLHA
Alcaloides	-
Mono e sesquiterpenos	+++
Triterpenos e esteroides	++
Saponinas	+++
Flavonoides	+
Derivados cinâmicos	++
Cumarinas	-
Taninos condensados	-
Taninos hidrolisáveis	+
Açúcares redutores	+

-: ausência de bandas; +: até duas bandas evidenciadas; ++: duas a cinco bandas evidenciadas; +++: acima de cinco bandas evidenciadas.

De acordo com Pápay *et al.* (2012) a apigenina e seus glicosídeos são os principais flavonoides encontrados nas folhas de *P. crispum*. Segundo Patel *et al.* (2007), a apigenina é um agente quimiopreventivo promissor na prevenção e tratamento do câncer. Já a apiina confere ação diurética para a planta (Mohammad, 2010).

A presença de mono e sesquiterpenos encontra-se de acordo com a literatura, sendo estes compostos normalmente presentes nos óleos essenciais (Farzaei *et al.*, 2013). Gonçalves *et al.* (2015) identificaram terpenos e saponinas em extratos aquosos e alcoólicos da planta. Entretanto, estes autores não identificaram taninos e esteroides, o que diverge do resultado encontrado neste trabalho. Porém, Gonçalves *et al.* (2015) realizaram sua triagem fitoquímica utilizando a planta desidratada.

Encontra-se na literatura estudos que afirmam a presença de cumarinas, o que não foi verificado neste trabalho (Reyes-Munguía *et al.*, 2012; Farzaei *et al.*, 2013).

O tipo de açúcar apiose, pode ser encontrado em sementes, caule e folhas de *Petroselinum crispum* (Hudson, 1949).

### 4. CONCLUSÃO

A identificação de metabólitos nas folhas de *P. crispum* é relevante, visto que essa espécie possui importância tanto no segmento industrial, como também na terapêutica, o que pode contribuir na literatura e ainda em estudos que podem estar associadas a esses compostos. Além disso,



informações obtidas nesse trabalho contribuem para a padronização farmacognóstica da espécie.

## 5. REFERÊNCIAS

DELESPAUL, Q.; BILLERBECK, V. G. D.; ROQUES, C. G.; MICHEL, G.; VINUALES, C.M.; BESSIERE, J.M. The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods. *J. Essent. Oil Res.*, v. 12, 2000.

FARZAEI, M. H.; ABBASABADI, Z.; ARDEKANI, M. R. S.; RAHIMI, R.; FARZAEI, F. Parsley: a review of ethnopharmacology, phytochemistry and biological activities. *J. Tradit. Chin. Med.*, v. 33, p. 815-826, 2013.

GONÇALVES, J. H. T.; SANTOS, A. S.; MORAIS, H. A. Atividade antioxidante, compostos fenólicos totais e triagem fitoquímica de ervas condimentares desidratadas. *Rev. Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações*, v. 13, p. 486-497, 2015.

HARBORNE, J. B. *Phytochemical methods*. 2. ed. London: Chapman & Hall, 1984.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. *Plantas medicinais no Brasil - Nativas e Exóticas*. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2002.

WAGNER, H.; BLADT, S. *Plant Drug Analysis – A thin layer chromatography atlas*. 2. ed. New York: Spinger, 2001.

ZHENG, G. Q.; KENNEY, P. M.; ZHANG, J.; LAM, L. K. Inhibition of benzo [a] pyrene-induced tumorigenesis by myristicin, a volatile aroma constituent of parsley leaf oil. *Carcinogenesis*, v. 3, p. 1921-1923, 1992.

## 6. AGRADECIMENTOS

Universidade Federal de Pernambuco.



ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL – PNQM 7

## OTIMIZAÇÃO DO DECOCTO DA RAIZ DE *Bromelia laciniosa* UTILIZANDO DESIGN EXPERIMENTAL

E. C. V. PEREIRA<sup>1</sup>, J. M. T. de ALENCAR FILHO<sup>1</sup>, P. A. SAMPAIO<sup>1</sup>, P. J. ROLIM-NETO<sup>2</sup>, L. A. ROLIM<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Central de Análise de Fármacos, Medicamentos e Alimentos, UNIVASF

<sup>2</sup> Laboratório de Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Pernambuco.

E-mail para contato: emanuella.chiara@gmail.com

*RESUMO – A Bromelia laciniosa é uma espécie encontrada na caatinga cujo decocto das raízes é utilizado pela população para o tratamento de hepatite, icterícia, diarreia e outros distúrbios. A fim de se estudar a forma mais eficaz de preparar o decocto foi aplicado o planejamento fatorial 3<sup>2</sup> avaliando o tempo de fervura e proporção droga:solvente mais adequados de serem utilizados bem como qual a influencia dessas variáveis na extração dos compostos majoritários do decocto. Os resultados demonstraram que a proporção droga solvente influencia negativamente a extração dos componentes majoritários, sendo a menor proporção indicada como a mais adequada. O tempo de fervura não mostrou influência significativa na eficiência de extração do decocto, mas o tempo de 30 minutos demonstrou ser o mais adequado. Para análise dos compostos majoritários foi utilizada a técnica de HPLC-DAD. Foi demonstrado que o decocto que extrai de forma mais eficaz os compostos majoritários foi o decocto 2 preparados na proporção 15:1 droga:solvente e com tempo de fervura de 30 minutos. Palavras chave: Macambira de porco, CLAE-DAD, Planejamento fatorial*

*ABSTRACT– The Bromelia laciniosa is a species found in Caatinga whose decoction of the roots is used by the population for the treatment of hepatitis, jaundice, diarrhea and other disorders. In order to study the most effective way to prepare the decoction was applied factorial design 3<sup>2</sup> to determine what the boiling time and ratio drug: solvent more suitable to be used and what the influence of these variables on the extraction of the major compounds of decoction. The results showed that the drug solvent ratio negatively influences the extraction of the majority of the extract components being the most appropriate proportion. The boiling time showed no significant influence on the decoction of the extraction efficiency, but the time of 30 minutes proved to be the most appropriate. For the analysis of major compounds was used HPLC-DAD technique. It has been shown that the decoction extracting more effectively the major compounds was prepared in the ratio 15: 1 drug: solvent and 30 minutes boiling time.*

*Keywords: Macambira de porco, HPLC-DAD, Factorial design*

## 1. INTRODUÇÃO

A *Bromelia laciniosa* pertencente à família Bromeliaceae é uma espécie nativa da Caatinga conhecida popularmente como macambira de porco. Estudos etnofarmacológicos relatam a indicação do decocto desta espécie para tratar hepatite (Agra *et al.*, 2007), cólica infantil, diarreia, febre, icterícia e caspa (Albuquerque *et al.*, 2007). É uma planta ainda pouco estudada, com poucos relatos científicos a respeito das suas propriedades químicas e farmacológicas incluindo sobre o decocto é utilizado pela população. A fim de definir qual a melhor forma de preparo do decocto das raízes dessa espécie, realizou-se um estudo avaliando a proporção de material vegetal e tempo de fervura que leva a uma maior extração dos componentes majoritários desta preparação.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os decoctos foram preparados a partir das raízes da *B. laciniosa* utilizando uma matriz de planejamento fatorial  $3^2$  onde foram avaliadas duas variáveis em três níveis distintos: proporção droga:solvente nos níveis: 15:1, 30:1 e 45:1 e o tempo de fervura nos níveis de 15, 30 e 45 min, resultando em nove decoctos diferentes que foram analisados em triplicata.

Os decoctos foram analisados por CLAE-DAD utilizando como parâmetros cromatográficos: fase móvel composta de solvente A – 0,1% de ATA diluído em água ultrapurificada e solvente B 100% acetonitrila, com fluxo de 0,6 mL/min., começando o gradiente com 80% de A e 20% de B, aos 40 min. esse gradiente atingiu 60% de A e 40% de B, permanecendo isocrático por 10 min. A fase estacionária foi uma coluna Agilent® (250x4,6 mm, 5µm C18) mantida a 30°C.

Para avaliar qual extrato por decocção foi mais eficaz somou-se as áreas dos dois picos majoritários do cromatograma utilizando esse valor das Áreas (A) como variável dependente frente às variáveis independentes analisadas. Utilizando-se do software STATISTICA StatSoft 8, avaliou-se a influencia das variáveis independentes no incremento das áreas dos picos majoritários, definindo os melhores parâmetros a serem utilizados na preparação do decocto.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Quadro 1 pode-se observar o valor de área calculada dos dois picos majoritários para os 9 decoctos produzidos:

Quadro 1- Decoctos produzidos de acordo com a matriz do planejamento fatorial  $3^2$

Decocto	Temperatura (°C)	Proporção droga:solvente (%)	A
1	15	15:1	201389,3333
2	30	15:1	404913
3	45	15:1	282583,5
4	15	30:1	122775
5	30	30:1	119663
6	45	30:1	163005,3333
7	15	45:1	27063,33333
8	30	45:1	86676,66667
9	45	45:1	90437,33333

Foi possível observar que o decocto que extraiu com mais eficiência os compostos

majoritários foi o decocto 2 preparado na proporção de 15:1 da droga:solvente e que permaneceu em fervura por 30 minutos. Este resultado pode ser melhor visualizado na Figura 1 onde percebe-se que o ponto alto do gráfico, referente a maior área desses compostos é justamente o ponto que combina essas condições de tempo e proporção droga:solvente

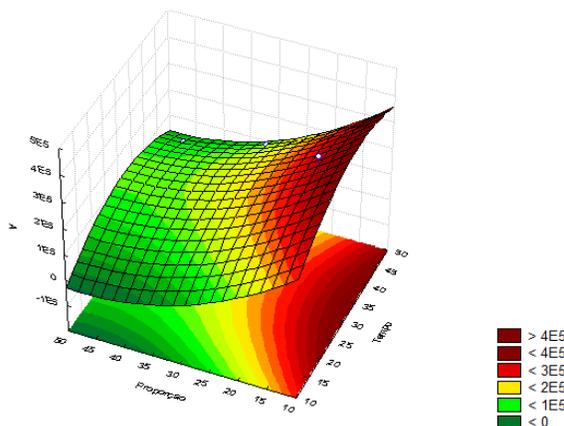


Figura 1- Gráfico de superfície resposta demonstrando o incremento de A de acordo com as variáveis de Tempo de Fervura e Proporção droga:solvente.

Conforme pode ser observado no gráfico de Pareto (Figura 2) a variável proporção é aquela que influencia significativamente no processo extrativo, essa influência se dá de maneira negativa (-4,30053) ou seja a medida que eu aumento a proporção droga:solvente há uma queda no valor de A. Não foi possível observar uma influência significativa do tempo de fervura no processo extrativo, entretanto a Figura 3 demonstra que o tempo de 30 min. contribui para uma melhor extração dos componentes majoritários:

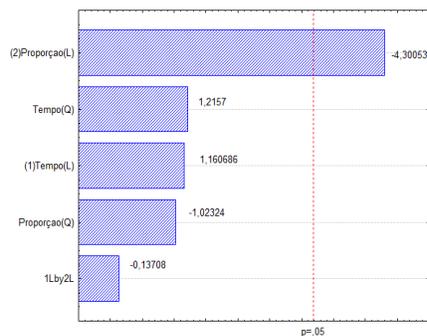


Figura 2- Gráfico de Pareto demonstrando a influência das variáveis analisadas.

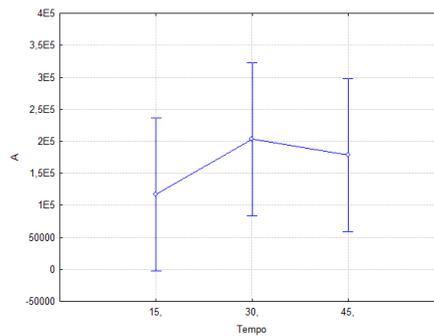


Figura 3- Influência do tempo de fervura no incremento de A.

da *B. laciniosa*. Na figura 4 é possível visualizar o cromatograma deste decocto contendo os dois picos majoritários utilizados na escolha do melhor decocto:

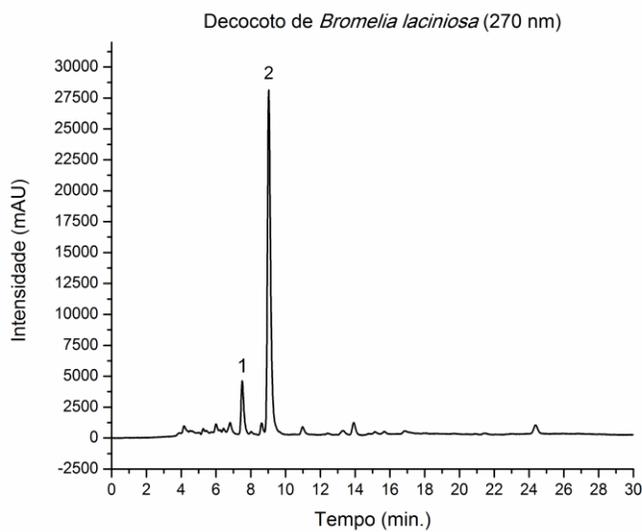


Figura 4- Cromatograma do decocto 2 da *B. laciniosa*.

#### 4. CONCLUSÃO

Com base nos experimentos realizados é possível concluir que para a preparação do decocto a partir das raízes de *B. laciniosa* com maior eficiência extrativa dos componentes majoritários é aquela realizada com a proporção de 15:1 droga:solvente em um tempo de fervura de 30 minutos.

#### 5. REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri”. *Brazil Journal of Ethnopharmacology*, 2007.
- ALBUQUERQUE, U. P., et al. Medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007.

#### 6. AGRADECIMENTOS

UNIVASF, FACEPE, CAFMA E LTM.



ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL – PNQM 8

## CARACTERIZAÇÃO FARMACOGNÓSTICA FÍSICO-QUÍMICA DA DROGA VEGETAL E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE-DAD PARA *FINGERPRINT* DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE *Alternanthera brasiliana* KUNTZE

J. M. T de ALENCAR FILHO<sup>1</sup>, H. A. P. TEIXEIRA<sup>1</sup>, P. A. SAMPAIO<sup>1,2</sup>, E. C. V. PEREIRA<sup>1</sup>, N. A. C. de SOUZA<sup>1</sup>, I. A. AMARIZ<sup>1</sup>, P. J. ROLIM NETO<sup>3</sup>, L. A. ROLIM<sup>1,2</sup>, E. C. da C. ARAÚJO<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Central de Análises de Fármacos, Medicamentos e Alimentos (CAFMA), Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Petrolina-PE, Brasil.

<sup>2</sup>Pós-graduação em Recursos Naturais do Semiárido, Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Petrolina-PE, Brasil.

<sup>3</sup>Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brasil.

E-mail para contato: ze.marcos.alencar@gmail.com

**RESUMO** – *Os objetivos deste trabalho foram a caracterização farmacognóstica da matéria prima a base da espécie vegetal Alternanthera brasiliana, e o desenvolvimento de uma metodologia analítica por CLAE-DAD para fingerprint dos compostos fenólicos do extrato etanólico bruto. Os testes para caracterização foram realizados conforme preconizado pela Farmacopeia Brasileira 5ª Edição. O método analítico foi desenvolvido utilizando a ferramenta de planejamento fatorial 3<sup>3</sup>. Para a caracterização, os parâmetros estavam dentro do preconizado. Em relação ao método analítico, a fase móvel utilizada em gradiente era composta por água ultrapurificada acidificada com ácido trifluoroacético 0,01% e acetonitrila (TFA:ACN) de 90:10 de 0 a 30 min; TFA:ACN 60:40 isocrático de 30 a 40 min, TFA:ACN 90:10 de 40 a 50 min, com tempo de corrida total de 60 min, volume de injeção de 20 µL e fluxo de 0,8 mL/min. A partir dos resultados, obtiveram-se parâmetros físico-químico para padronização da droga vegetal, assim como um método analítico para realização de fingerprint do extrato etanólico.*

*Palavras chave:* Caracterização farmacognóstica, Desenho experimental, Desenvolvimento de metodologia analítica, HPLC-DAD.

**ABSTRACT** – *The aim of this study were the pharmacognostic characterization of the raw material base of the plant species Alternanthera brasiliana, and the development of an analytical methodology by HPLC-DAD for fingerprint of phenolic compounds from ethanol extract. Tests for characterization were performed as recommended by the*



*Brazilian Pharmacopoeia 5th Edition. The analytical method was developed using experimental design tool 3<sup>3</sup>. For the characterization the parameters were within the recommended. Regarding the analytical method used in the mobile phase gradient was composed of ultrapure water acidified with 0.01% trifluoroacetic acid and acetonitrile (TFA:ACN) 90:10 from 0 to 30 min; TFA:ACN 60:40 isocratic 30 to 40 minutes, TFA:ACN 90:10 40 to 50 min with a total run time of 60 min, injection volume of 20 µL, and flow of 0.8 ml/min. From the results, were obtained physicochemical parameters for standardization of plant drug, as well as an analytical method to conduct fingerprint of the plant extract.*

*Keywords: Pharmacognostic characterization, Experimental design, Development of analytical methodology, HPLC-DAD.*

## 1. INTRODUÇÃO

*Alternanthera brasiliana* (L.) KUNTZE (Amaranthaceae), popularmente conhecida no Brasil como “Penicilina”, “Benzetacil” ou “Terramicina”, é um arbusto que chega até 1,5 m de altura, e é usada na medicina popular como anti-inflamatória, cicatrizante e antidiarreica (Barua *et al.*, 2013).

A atividade cicatrizante de feridas do extrato metanólico das folhas de *A. brasiliana* foi reportada em diversos modelos experimentais (Barua *et al.*, 2013; Barua *et al.*, 2012).

Silva *et al.* (2014) comprovaram a atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH da fase acetato de etila obtida por partição líquido-líquido do extrato etanólico das partes aéreas de *A. brasiliana*, com CE<sub>50</sub> de 28,9±1,08 µg/mL.

Os objetivos alcançados neste trabalho foram a caracterização farmacognóstica físico-química da matéria prima a base da espécie vegetal *A. brasiliana*, visto que esta espécie é um potencial fitoterápico, assim como o desenvolvimento de uma metodologia analítica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD) para *fingerprint* dos compostos fenólicos do extrato etanólico bruto (EEB) das partes aéreas da espécie supracitada.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Caracterização farmacognóstica físico-química da droga vegetal

Foram realizados os ensaios de determinação da granulometria dos pós, perda por dessecação (método gravimétrico), cinzas totais, cinzas insolúveis em ácido, cinzas sulfatadas, índice de espuma e substâncias extraíveis por álcool (método c: extração a frio). Os testes foram realizados conforme preconizado pela Farmacopeia Brasileira 5ª Edição (Brasil, 2010), em triplicata. Os resultados são expressos em média ± desvio padrão.

### 2.2 Desenvolvimento do método analítico por CLAE-DAD

Foi realizado através da utilização de um planejamento fatorial (PF) 3<sup>3</sup>, utilizando como fatores dependentes as condições de gradientes inicial, intermediário e o fluxo da fase móvel, em três níveis, resultando em 27 corridas cromatográficas. Para o cálculo do fator hierárquico de resposta cromatográfica (HCRF) foi levado em consideração o número de picos no cromatograma e a resolução do pico majoritário, analisados em triplicata, a partir da seguinte equação:

$HCRF = (10*a) + (100*b)$ , onde *a* é o número de picos no cromatograma e *b* é a resolução do

pico majoritário.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização farmacognóstica físico-química da droga vegetal

A tabela 1 mostra os parâmetros físico-químicos analisados na caracterização farmacognóstica. O teor de umidade de um material vegetal é um importante dado, pois sugere muito

Parâmetros (média ± DP; n = 3)					
Perda por dessecação	Granulometria média	Substâncias extraíveis por álcool	Cinzas totais	Cinzas insolúveis em ácido	Cinzas sulfatadas
3,41 ± 0,16%	373,51 µm	4,75 ± 0,07%	9,93 ± 0,44%	10,02 ± 0,22%	12,77 ± 0,01%

acerca de sua qualidade. A granulometria do pó tem influência direta no resultado de substâncias extraíveis por álcool, uma vez que quanto menor as partículas da droga vegetal, maior a superfície de contato do pó com o solvente, logo mais eficiente se torna o processo de extração. A Farmacopeia Brasileira (2010) não estabelece valores-limite para cinzas, deve-se verificar a existência de monografia específica para espécie e comparar os resultados. A determinação do teor de cinzas visa verificar o teor de impurezas inorgânicas não voláteis que podem estar presentes como contaminantes. A determinação de cinzas insolúveis em ácido refere-se à quantificação de sílica e constituintes silicosos na droga vegetal. O teste de determinação do índice de espuma foi negativo.

Tabela 1 – Parâmetros analisados na caracterização farmacognóstica físico-química de *A. brasiliiana*.

#### 3.2 Desenvolvimento do método analítico por CLAE-DAD

O Gráfico de Pareto (figura 1) mostra que as condições que influenciaram positivamente no desenvolvimento do método foram o fluxo (Q) e o gradiente de TFA intermediário (L). O gráfico de superfície-resposta (figura 2) mostra nas áreas mais escuras os pontos em que as condições obtiveram melhores valores de HCRF para o método. Como resultado do cálculo do HCRF para o método selecionado, obteve-se o valor de 426,2.

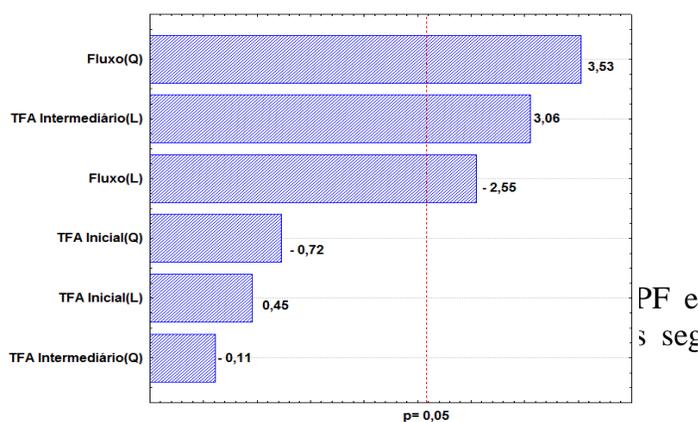


Figura 1 – Gráfico de Pareto do método

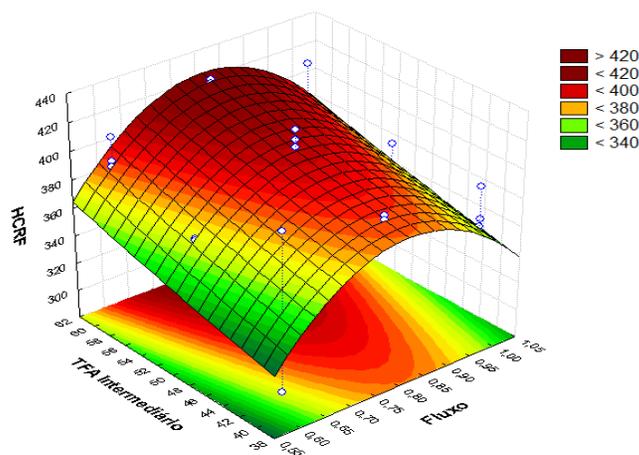


Figura 2 – Curvas de nível da superfície resposta do método analítico

composta por água ultrapurificada acidificada com ácido trifluoroacético 0,01% e acetonitrila (TFA:ACN) de 90:10 à 60:40 de 0 a 30 min; TFA:ACN 60:40 isocrático de 30 a 40 min, TFA:ACN de 60:40 à 90:10 de 40 a 50 min, com tempo de corrida total de 60 min; o volume de injeção foi de 20 µL e fluxo de 0,8 mL/min.

No cromatograma (figura 3) foram observados 32 picos. A resolução do pico majoritário foi de 1,196 e sua pureza esteve acima de 0,99, o que demonstra que não houve co-eluição com nenhum outro composto do extrato. O comprimento de onda escolhido para análises dos cromatogramas foi de 340 nm, pois é um comprimento de onda específico para visualizar absorção de flavonoides, que são os marcadores químicos da espécie em estudo.

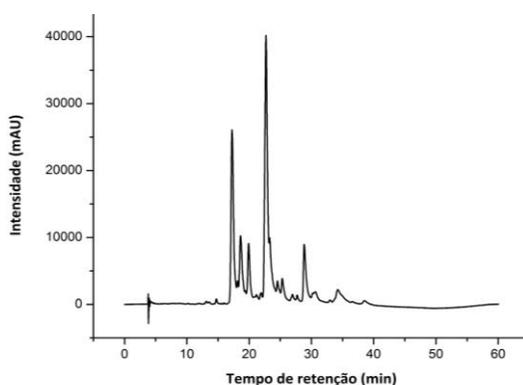


Figura 3 – Perfil cromatográfico de *Alternanthera brasiliana*

#### 4. CONCLUSÃO

Até então não existia nenhum parâmetro físico-químico para controle de qualidade da droga vegetal a base de *A. brasiliana*, de forma que os resultados obtidos fornecem informações importantes para a qualidade da droga. A condição cromatográfica de número 13 foi a melhor para realização de *fingerprint* do extrato etanólico bruto de *A. brasiliana*. Como perspectiva, esse método poderá ser utilizado para determinação quali-quantitativa dos seus marcadores químicos.

#### 5. REFERÊNCIAS

- BRASIL. Farmacopeia Brasileira. 5ª Edição. Vol. 1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010.
- BARUA, C. C. *et al.* Influence of *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze on altered enzyme profile during cutaneous wound healing in immunocompromised rats. *International Scholarly Research Network – ISRN Pharmacology*, v. 2012, p. 1-8, 2012.
- BARUA, C. C. *et al.* Wound healing activity of *Alternanthera brasiliana* Kuntze and its antioxidant profiles in experimentally induced diabetic rats. *JAPHAC*, v. 3, nº 10, p. 161-166, 2013.
- SILVA, E. E. S. *et al.* Identification of glycosyl flavones and determination *in vitro* of antioxidant and photoprotective activities of *Alternanthera brasiliana* L. Kuntze. *Res. J. Phytoch.* vol. 8, p. 148-154, 2014.

#### 6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a UNIVASF, FACEPE, CAFMA e LTM pelo apoio.

ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL – PNQM 9

## ***Eclipta alba* (L.) Hassk. (ASTERACEAE): DETERMINAÇÃO DO PERFIL FITOQUÍMICO DE FOLHAS**

M. B. CADENA<sup>1</sup>, A. V. SANTOS<sup>1</sup>, R. D. SÁ<sup>1,2</sup>, E. L. ARAÚJO<sup>3</sup> e K. P. RANDAU<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Farmacognosia.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica.

<sup>3</sup> Faculdade Pernambucana de Saúde, Laboratório de Farmacobotânica.

E-mail para contato: mariliacadena20@gmail.com

**RESUMO** – *Eclipta alba* L. é uma erva que ocorre em todo o Brasil e em outras regiões tropicais e subtropicais. É conhecida como erva-botão ou agrião-do-brejo e é empregada na medicina caseira no Brasil para a asma, úlceras de pele, hepatite e doenças do fígado. Várias atividades biológicas já foram comprovadas para a espécie, sendo associadas à presença de diversos metabólitos secundários. O trabalho teve como objetivo realizar uma prospecção fitoquímica das folhas de *E. alba*. Os principais grupos de metabólitos foram caracterizados por Cromatografia em Camada Delgada, utilizando extrato metanólico obtido por decocção. Na prospecção fitoquímica foram identificados: flavonoides, derivados cinâmicos, taninos condensados, monoterpenos e sesquiterpenos, lactonas sesquiterpênicas, triterpenos e esteroides, saponinas e açúcares redutores. Os testes para alcaloides, cumarinas, taninos hidrolisáveis e antraquinonas foram negativos. Os resultados apresentados contribuem para o conhecimento da composição química da espécie e sua padronização farmacognóstica. **Palavras-chave:** Agrião-do-brejo. Cromatografia em camada delgada. Padronização.

**ABSTRACT** – *Eclipta alba* L. is an herb that occurs in Brazil and in other tropical and subtropical regions. It is known as “erva-botão” or “agrião-do-brejo” and is used in folk medicine in Brazil for asthma, skin ulcers, hepatitis and liver diseases. Several biological activities have been proven for the species, being associated with the presence of several secondary metabolites. The study aimed to conduct a phytochemical screening of the leaves of *E. alba*. The main groups of metabolites were characterized by Thin Layer Chromatography, using methanolic extract obtained from decoction. In the phytochemical screening were identified: flavonoids, cinnamic derivatives, condensed tannins, monoterpenes and sesquiterpenes, sesquiterpene lactones, triterpenes and steroids, saponins and reducing sugars. The test for alkaloids, coumarins, anthraquinones and hydrolysable tannins were negative. The presented



results contribute to the knowledge of the chemical composition of the species and its pharmacognostic standardization.

Keywords: Agriã- do-brejo, Standardization, Thin layer chromatography.

## 1. INTRODUÇÃO

A espécie *Eclipta alba* (L.) Hassk. (sinonímia *Eclipta prostrata* (L.) L.), pertencente à família Asteraceae e conhecida popularmente como erva-botão e agrião-do-brejo, é originária da Ásia, mas ocorre no Brasil e em outras regiões tropicais e subtropicais (Mondin, 2016). É uma erva anual, ereta, de ramos finos e lenhosos. Geralmente habita terrenos úmidos e sombreados, sendo considerada como planta daninha no Brasil (Lorenzi, 2008).

Na medicina popular brasileira seu uso é indicado para a asma, úlceras de pele, hepatite e doenças do fígado (Albuquerque *et al.*, 2007; Agra *et al.*, 2008). É uma das principais plantas da medicina indiana Ayurvedica, sendo utilizada como imunoestimulante e hepatocitoprotetora, sendo também consumida na alimentação (Matos, 2007).

Várias atividades biológicas para a espécie são reportadas na literatura, como antitumoral (Liu *et al.*, 2012), antidiabética (Jaiswal *et al.*, 2012), anticonvulsivante (Shaik *et al.*, 2013), antibacteriana (Ray *et al.*, 2013), antinociceptiva, anti-inflamatória e broncodilatadora (Leal *et al.*, 2000), diurética, hipotensiva e hipocolesterolêmica (Rangineni *et al.*, 2007), promotora de crescimento de cabelo (Datta *et al.*, 2009), cerebroprotetora (Mansoorali *et al.*, 2012) e nefroprotetora (Dungca, 2016).

Por se tratar de uma espécie de amplo interesse medicinal e sabendo que estudos comprovam importantes atividades farmacológicas, faz-se necessário também conhecer os principais grupos de metabólitos secundários presentes na mesma. Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar uma prospecção fitoquímica das folhas de *E. alba*.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL VEGETAL

O material vegetal foi coletado na Cidade Universitária em Recife, Pernambuco, Brasil e uma excisata foi depositada no Herbário Dárdano de Andrade Lima, no Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), sob número de tombamento 89342.

### 2.2 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

Após efetuar uma decocção metanólica 10% (p/v) das folhas frescas de *E. alba*, foi realizada uma triagem fitoquímica através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) para analisar qualitativamente os diversos grupos de metabólitos presentes na espécie. As análises foram efetuadas

empregando-se como fase estacionária placas prontas de gel de sílica (Macherey-Nagel), fases móveis variadas e reveladores adequados, obedecendo a um protocolo desenvolvido no Laboratório de Farmacognosia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, apoiado em estudos de Harborne (1998) e Wagner e Bladt (2001), com modificações.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O quadro 1 mostra os resultados obtidos após a prospecção fitoquímica das folhas de *E. alba* utilizando extrato metanólico. Foi identificada a presença de lactonas sesquiterpênicas, monoterpênicos, sesquiterpenos, triterpenos, esteroides, flavonoides, derivados cinâmicos, taninos condensados, saponinas e açúcares redutores. Os testes para taninos hidrolisáveis, cumarinas, antraquinonas e alcaloides foram negativos.

Quadro 1 - Resultados da prospecção fitoquímica das folhas de *Eclipta alba*

METABÓLITOS	FOLHA
Lactonas sesquiterpênicas	+++
Mono e sesquiterpenos	+++
Triterpenos e esteroides	++
Flavonoides	++
Derivados cinâmicos	++
Taninos condensados	+
Saponinas	+
Açúcares redutores	+
Taninos hidrolisáveis	-
Cumarinas	-
Antraquinonas	-
Alcaloides	-

-: ausência de bandas; +: até duas bandas evidenciadas; ++: duas a cinco bandas evidenciadas; +++: acima de cinco bandas evidenciadas.

Vários compostos tem sido isolados da planta toda, como flavonoides, cumestanos, saponinas, triterpenos, esteroides e alcaloides (Wagner *et al.*, 1986; Upadhyay *et al.*, 2001; Sureshkumar *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2012; Ray *et al.*, 2013). Alguns desses compostos demonstraram atividades farmacológicas, como a eclalbasaponina I, que apresentou uma atividade antitumoral (Liu *et al.*, 2012) e antibacteriana (Ray *et al.*, 2013).

Das partes aéreas foram isolados e identificados flavonoides, saponinas, triterpenos e alcaloides (Kumari *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2015; Tabata *et al.*, 2015).

Através de CCD, Leal *et al.* (2010) identificaram nas folhas de *E. alba* flavonoides, saponinas, taninos e cumarinas. Com relação a presença de cumarinas, percebe-se então que houve uma divergência com o resultado obtido neste estudo. Porém, no trabalho de Leal *et al.* (2010) a prospecção fitoquímica foi realizada com o extrato hidroalcolico. Entretanto, há concordância de



dados com os mesmos autores citados anteriormente a respeito da ausência de antraquinonas e alcaloides. Dalal *et al.* (2010) relatam a presença de açúcares redutores nas partes aéreas da espécie.

#### 4. CONCLUSÃO

A identificação de metabólitos nas folhas de *E. alba* são relevantes, visto que a espécie tem diversas atividades comprovadas na literatura e outras ainda em estudo que podem estar associadas a esses compostos. As informações obtidas nesse trabalho contribuem ainda para a padronização farmacognóstica da espécie.

#### 5. REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 18, p. 472-508, 2008.
- DALALA, S.; KATARIAB, S. K.; SAS TRYB, K. V.; RANAC, S. V. S. Phytochemical screening of methanolic extract and antibacterial activity of active principles of hepatoprotective herb, *Eclipta alba*. *Ethnobot. Leaflets*, v. 14, p. 248-258, 2010.
- LORENZI, H. *Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas*. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.
- MATOS, F. J. A. *Plantas medicinais – guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil*. 3. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2007.
- MONDIN, C. A. *Eclipta in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB16092>>. Acesso: 19 Out. 2016.
- TABATA, A.; TANIGUCHI, M.; SHIBANO, M. Ecliptamines A–D, four new guanidine alkaloids from *Eclipta prostrata* L. *Phytochem. Lett.*, v. 11, p. 224-228, 2015.
- WAGNER, H.; BLADT, S. *Plant Drug Analysis – A thin layer chromatography atlas*. 2. ed. New York: Spinger, 2001.

#### 6. AGRADECIMENTOS

Universidade Federal de Pernambuco.



ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL – PNQM 12

## ANÁLISE POR CLAE-DAD E AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIPROLIFERATIVO DE *Cnidoscolus quercifolius* POHL (EUPHORBIACEAE) EM CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO

R. G. de OLIVEIRA-JÚNIOR<sup>1</sup>, C. A. A. FERRAZ<sup>1</sup>, A. P. de OLIVEIRA<sup>1</sup>, P. A. SAMPAIO<sup>1</sup>, E. C. V. PEREIRA<sup>1</sup>, V. M. BAMBERGUE<sup>1</sup>, P. J. ROLIM-NETO<sup>2</sup>, L. A. ROLIM<sup>1</sup>, L. PICOT<sup>3</sup> e J. R. G. S. ALMEIDA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Vale do São Francisco, Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Mediciniais, Petrolina-PE, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos, Recife-PE, Brasil.

<sup>3</sup> Universidade de La Rochelle, Departamento de Biotecnologia, La Rochelle, França.

E-mail para contato: oliveira.farma.junior@gmail.com

**RESUMO** – *O presente estudo objetivou investigar o potencial antiproliferativo do extrato etanólico e frações obtidas das folhas de Cnidoscolus quercifolius. Além disso, o perfil químico das amostras bioativas foi analisado por CLAE-DAD. O efeito antiproliferativo foi avaliado pelo método do MTT e demonstrou que o extrato etanólico e a fração acetato de etila apresentam um melhor perfil de atividade, com valores de  $IC_{50}$  em torno de 59,29 e 16,07  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Esse resultado pode ser justificado, pelo menos em parte, pela presença do flavonoide rutina e de picos com parâmetros cromatográficos característicos de compostos fenólicos, conforme demonstrado pelas análises por CLAE-DAD. Contudo, outros estudos deverão ser realizados no intuito de isolar e avaliar a atividade antiproliferativa desses componentes.*

**Palavras-chaves:** Câncer, Plantas medicinais, Caatinga, Flavonoides, Compostos fenólicos.

**ABSTRACT** – *This study aimed to investigate the antiproliferative potential of ethanol extract and fractions obtained from the leaves of Cnidoscolus quercifolius. In addition, the chemical profile of bioactive samples was analyzed by HPLC-DAD. The antiproliferative effect was evaluated by the MTT assay, and showed that the ethanol extract and ethyl acetate fraction exhibit high activity ( $IC_{50}$  of 59.29 and 16.07  $\mu\text{g/ml}$ , respectively). This result can be explained, at least in part, by the presence of the flavonoid rutin and peaks with characteristic chromatographic parameters of phenolic*

*compounds, as demonstrated by HPLC-DAD analysis. However, other studies should be performed in order to isolate and evaluate the antiproliferative activity of these components.*

*Keywords: Cancer, Medicinal plants, Caatinga, Flavonoids, Phenolic compounds.*

## 1. INTRODUÇÃO

O melanoma é um dos tipos de tumores mais agressivos, cuja progressão celular evolui rapidamente, uma vez que as células cancerosas apresentam uma alta capacidade metastática e costumam ser resistentes aos quimioterápicos convencionais. Nesse sentido, os produtos naturais têm contribuído significativamente no fornecimento de novos agentes anticâncer, com mecanismos de ação diversificados, inclusive para o tratamento do melanoma (Costa-Lotufo *et al.*, 2010).

*C. quercifolius* (Euphorbiaceae) é uma planta medicinal amplamente distribuída no bioma Caatinga, sendo conhecida popularmente como “favela” ou “faveleira”. Em estudos farmacológicos realizados anteriormente, foi verificado o potencial antinociceptivo, anti-inflamatório e antiproliferativo da espécie. Entretanto, não existem relatos do efeito antiproliferativo da planta em células de melanoma humano, considerado um dos tipos de câncer mais incidentes na região Nordeste do país em virtude da frequente exposição solar (Sobrinho *et al.*, 2012; Paula *et al.*, 2016). Desse modo, esse trabalho objetivou avaliar o efeito antiproliferativo de extrato e frações obtidos das folhas de *C. quercifolius* frente à linhagem de células de melanoma humano, além de determinar o perfil fitoquímico cromatográfico das amostras testadas através de análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjos de Diodo (CLAE-DAD).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

As folhas de *C. quercifolius* foram coletadas, secas em estufa com circulação de ar (45-50 °C, durante 07 dias) e pulverizadas em moinho mecânico. O material vegetal seco e pulverizado foi submetido à maceração em etanol absoluto, resultando em 63 g de extrato etanólico bruto (Cq-EEB). Uma parte do extrato (15 g) foi submetida à Cromatografia Líquida sob Vácuo (CLV), utilizando sílica gel 60 e os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, em ordem crescente de polaridade. Após evaporação do solvente, foram obtidas as respectivas frações: Cq-Hex (0,16 g), Cq-CHCl<sub>3</sub> (2,0 g), Cq-AcOEt (2,0 g) e Cq-MeOH (10 g).

A atividade antiproliferativa do extrato e frações foi avaliada pelo ensaio do MTT, conforme descrito por Mossman (1983). Para isso, foi utilizada a linhagem A2058 (ATCC® CRL-11147) de células de melanoma humano. As células ( $4 \times 10^4$  céls/mL) foram cultivadas em meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa (37 °C, com atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>), durante 72 horas de tratamento com o extrato e frações de *C. quercifolius* (12,5 a 200 µg/mL). Os resultados foram convertidos em concentração de inibição de 50% do crescimento celular (CI<sub>50</sub>) por meio de análise de regressão não-linear, realizada com auxílio do software GraphPad Prism® 6.0. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média ± e.p.m (erro padrão da média).

Após a realização dos testes farmacológicos, Cq-EEB e Cq-AcOEt foram analisados por CLAE-DAD, em cromatógrafo líquido Shimadzu® (LC-20 AT) equipado com um detector de arranjo de diodos (SPD-M20A). Foi utilizada uma coluna Agilent® C-18, com pré-coluna Zorbax. Os extratos (10 mg/mL) foram analisados à temperatura de 37 °C, com fluxo de injeção de 1 mL.min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 50 µL, sendo o tempo de análise de 70 min e a fase móvel constituída de dois solventes: ácido fórmico 0,1% e acetonitrila, em eluição gradiente. A identificação dos compostos foi realizada com base na comparação do tempo de retenção e comprimentos de onda de absorção máxima de padrões analíticos disponíveis no laboratório. As análises foram realizadas em triplicata.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre as amostras avaliadas no ensaio do MTT, Cq-EEB e a fração Cq-AcOEt apresentaram o melhor perfil de atividade antiproliferativa, com valores de CI<sub>50</sub> de 59,29 e 16,07 µg/mL, respectivamente, conforme demonstrado na quadro 1. Esses resultados corroboram com o estudo que foi desenvolvido por Paula *et al.* (2016), no qual foi observado que extratos brutos obtidos das cascas da mesma espécie apresentaram atividade citotóxica frente às linhagens tumorais HL-60 (leucemia) e MCF-7 (câncer de mama), assim como seus constituintes isolados, sugerindo que *C. quercifolius* possa ser considerada uma promissora fonte de moléculas anticâncer.

Quadro 1 - Atividade antiproliferativa de extratos e frações obtidos das folhas de *C. quercifolius* frente à linhagem de células de melanoma humano (A2058). Os resultados são expressos como média da concentração inibitória de 50% do crescimento celular (CI<sub>50</sub>) ± e.p.m. (n=3).

Amostra	Cq-EEB	Cq-Hex	Cq-CHCl <sub>3</sub>	Cq-AcOEt	Cq-MeOH
CI <sub>50</sub> (µg/mL)	59,29 ± 8,27	>200	159,25 ± 13,86	16,07 ± 2,18	120,37 ± 25,09

Por apresentarem uma melhor atividade antiproliferativa, Cq-EEB e Cq-AcOEt foram escolhidos para serem analisados por CLAE-DAD. As análises revelaram a presença de quatro componentes majoritários em Cq-EEB, dos quais foi possível identificar o flavonoide rutina. Para Cq-AcOEt, os cromatogramas obtidos demonstraram um perfil químico diferente do que foi observado para Cq-EEB, o que pode ter influenciado no efeito antiproliferativo apresentado pela fração. Apesar de nenhum composto ter sido identificado em Cq-AcOEt, a maioria das substâncias apresentaram um perfil de absorção na região UV característico de compostos fenólicos. Os cromatogramas obtidos para Cq-EEB e Cq-AcOEt são apresentados na figura 1.

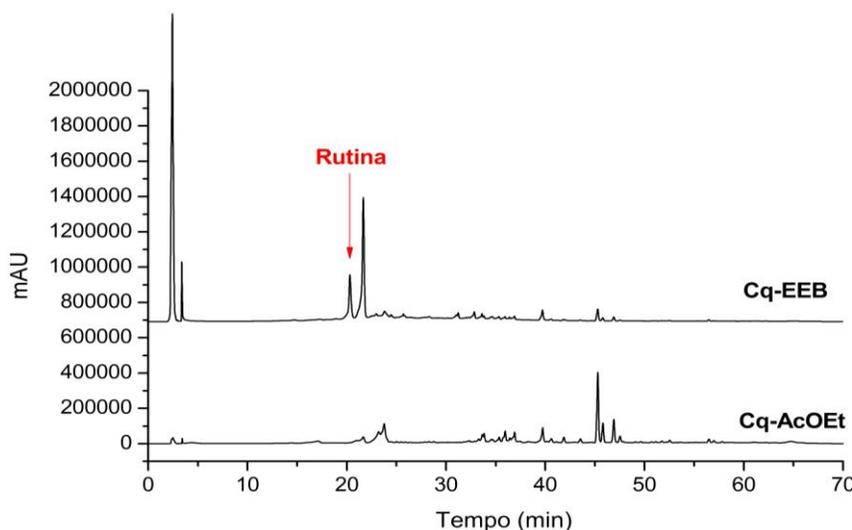


Figura 1 – Cromatogramas obtidos para Cq-EEB e Cq-AcOEt após análise por CLAE-DAD.

#### 4. CONCLUSÃO

Em resumo, Cq-EEB e Cq-AcOEt apresentaram melhor atividade antiproliferativa. As análises por CLAE-DAD demonstraram a presença de rutina em Cq-EEB e de picos característicos de compostos fenólicos em Cq-AcOEt. Dessa forma, o efeito antiproliferativo observado pode ser atribuído, pelo menos em parte, à presença desses constituintes.

#### 5. REFERÊNCIAS

- COSTA-LOTUFO, LV. *et al.* A contribuição dos Produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. *Rev. Vir. Quím.*, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.
- PAULA, AC. *et al.* Constituintes Químicos e Atividade Citotóxica de *Cnidocolus phyllacanthus*. *Rev. Vir. Quím.*, v. 8, n. 1, p. 231-241, 2016.
- SOBRINHO, TJSP. *et al.* Antiproliferative activity of species of the genus *Cnidocolus* against HT-29, Hep-2 and NCI-H292 cells. *Mol. Clin. Pharmacol.*, v. 3, p. 55-61, 2012.
- MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Met.*, v. 65, p. 55-63, 1983.

#### 6. AGRADECIMENTOS: FACEPE e CNPq

ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL – PNQM 13

## CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA DA FOLHA DE *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L.Burt & R.M.Sm.

B. P. L. ARAÚJO<sup>1</sup>, R. D. SÁ<sup>1,2</sup>, E. L. ARAÚJO<sup>3</sup>, F. C. L. SILVA<sup>4</sup>, L. A. L. SOARES<sup>1,2</sup> e K. P. RANDAU<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Farmacognosia.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica.

<sup>3</sup> Faculdade Pernambucana de Saúde, Laboratório de Farmacobotânica.

<sup>4</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia.

E-mail para contato: barbaraplaraujo@hotmail.com

**RESUMO** – *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L.Burt & R.M.Sm., vulgarmente conhecida como colônia, é uma erva aromática e rizomatosa, nativa da Ásia Ocidental e cultivada no Brasil com finalidades medicinais e ornamentais. O estudo teve como objetivo realizar a caracterização anatômica de folhas e do pó das folhas de *A. zerumbet*. Foram confeccionadas e analisadas, em microscópio de luz, lâminas semipermanentes contendo secções transversais de pecíolo e lâmina foliar, além de secções paradérmicas de lâmina foliar. Caracterizou-se também o pó das folhas. A análise microscópica permitiu a identificação de estruturas importantes na diagnose da espécie, como pecíolo plano-convexo, lâmina foliar com estômatos tetracíticos, corpúsculos silicosos, cristais prismáticos e mesofilo dorsiventral. O pó atende a todas as características estabelecidas para espécie. O estudo contribuiu com a padronização farmacobotânica da espécie. **Palavras-chave:** Colônia. Farmacobotânica. Padronização.

**ABSTRACT** – *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L.Burt & R.M.Sm., commonly known as “colônia”, it is an aromatic and rhizomatous herb, native to Western Asia and cultivated in Brazil for medicinal and ornamental purposes. The study aimed to perform the anatomical characterization of leaves and leaves powder of *A. zerumbet*. Were prepared and analyzed, in light microscope, semipermanent slides containing cross-sections of petiole and leaf blade, besides paradermic sections of leaf blade. It is also characterized the leaves powder. The microscopic analysis allowed the identification of important elements in the diagnosis of the species, such as plan-convex petiole, leaf blade with tetracytic stomata, silica corpuscles, prismatic crystals and dorsiventral mesophyll. The powder complies with all the characteristics set for the species. The study contributes to the pharmacobotanical standardization of the species.

**Keywords:** Colonia. Pharmacobotany. Standardization.

## 1. INTRODUÇÃO

A família Zingiberaceae possui cerca de 50 gêneros e 1100 espécies nativas de regiões tropicais. Várias espécies são cultivadas para ornamentação, como as alpínias (*Alpinia* spp.), o falso-açafrão (*Curcuma zedoaria*) e o lírio-do-brejo (*Hedychium coronarium*) (Souza; Lorenzi, 2005).

A espécie *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L.Burt & R.M.Sm., vulgarmente conhecida como colônia, é uma erva aromática e rizomatosa, nativa da Ásia Ocidental. Foi introduzida no Brasil no tempo do Brasil Colonial, o que resultou no seu nome vulgar. Seu cultivo está presente em todos os estados brasileiros com finalidades medicinais e ornamentais (Matos, 2007).

A espécie é muito estudada em relação às suas propriedades farmacológicas. Estudos realizados com o óleo essencial de *A. zerumbet* confirmam a ação hipotensora, sendo o terpinen-4-ol o principal constituinte responsável por essa ação. O efeito anti-hipertensivo crônico foi demonstrado através do extrato hidroalcoólico da planta (Lahlou et al., 2003; Moura et al., 2005).

Tendo em vista a contribuição para o conhecimento e padronização farmacobotânica da espécie e taxonomia da família Zingiberaceae, o estudo teve como objetivo realizar a caracterização anatômica de folhas e do pó das folhas de *A. zerumbet*.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL VEGETAL

O material vegetal foi coletado na horta do Laboratório de Farmacognosia, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco e uma exsicata foi depositada no Herbário Dárdano de Andrade Lima, no Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), sob número de tombamento 89335.

### 2.2 CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA

Secções transversais de lâminas foliares e pecíolos frescos foram obtidas à mão livre, usando lâminas de aço e medula do pecíolo de embaúba (*Cecropia* sp.) como material de suporte. Para as lâminas foliares também foram realizadas secções paradérmicas nas faces adaxial e abaxial. Em seguida, as secções foram submetidas a uma solução de hipoclorito de sódio (50%) para processo de descoloração (Kraus; Arduin, 1997). Após lavagem em água destilada, as secções transversais foram coradas segundo técnica descrita por Bukatsch (1972), com safranina e azul de Astra; as secções paradérmicas foram coradas com azul de metileno (Krauter, 1985). Posteriormente, todas as secções foram montadas em lâminas semipermanentes, seguindo procedimentos usuais em anatomia vegetal (Johansen, 1940; Sass, 1951).

Realizou-se também a caracterização do pó das folhas. A análise das lâminas histológicas preparadas para a caracterização anatômica e a descrição do pó foram conduzidas em imagens em software (*Toup View Image*), obtidas por uma câmera digital acoplada a um microscópio óptico de luz (*Alltion*).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O pecíolo, em secção transversal, apresenta formato plano-convexo com projeção nas duas extremidades. A epiderme é unisseriada recoberta por uma cutícula delgada. Os feixes vasculares colaterais estão espalhados por todo o pecíolo, na região do bordo e na região central, acompanhados de bainha esclerenquimática não contínua nos polos do feixe. Hussin *et al.* (2000) observaram que em algumas espécies de *Alpinia*, como *A. galanga*, *A. aquatica* e *A. conchigera* a bainha esclerenquimática encontra com a epiderme abaxial, continuando com uma única camada abaixo dela. Um parênquima fundamental preenche o pecíolo. Em algumas células encontram-se cristais prismáticos.

A lâmina foliar é anfihipoestomática, com estômatos tetracíticos. Este resultado está de acordo com os dados de Hussin *et al.* (2000) e Albuquerque e Neves (2004), porém, Roman Junior (2013) citam a presença de estômatos tetracíticos e paracíticos. Em secção paradérmica na lâmina a face adaxial da epiderme mostra células de formato poligonal, contorno liso e poucos estômatos no mesmo nível das células epidérmicas; a face abaxial mostra células de epiderme de formato poligonal, contorno liso, numerosos estômatos e células sobre a nervura contendo corpúsculos silicosos. De acordo com Metcalfe e Chalk (1950) a presença desses corpúsculos silicosos é uma característica marcante na espécie estudada.

Em secção transversal, a epiderme é unisseriada e recoberta por cutícula delgada. São observadas uma a duas camadas de hipoderme logo abaixo da epiderme. O mesofilo é dorsiventral, formado por uma camada de parênquima paliçádico e duas a três camadas de parênquima esponjoso. A organização histológica típica do mesofilo de monocotiledôneas é a homogênea, entretanto, a espécie possui organização dorsiventral. Este fato é explicado por Albuquerque e Neves (2004) como sendo devido ao posicionamento das folhas, visto que se apresentam patentes, o que propicia a especialização em parênquima paliçádico e esponjoso. Feixes vasculares são envoltos por bainha esclerenquimática e estão espalhados ao longo do mesofilo.

Na região da nervura central, logo abaixo da epiderme, é possível observar duas camadas de hipoderme, duas camadas de células de parênquima, e espaços intercelulares. Hussin *et al.* (2000) demonstraram que a presença da hipoderme e a quantidade de camadas que a compõem são caracteres que auxiliam na diferenciação de espécies de *Alpinia*. Os feixes vasculares são do tipo colateral e circundado por polos de esclerênquima. Observa-se idioblastos com cristais prismáticos no parênquima.

O pó apresenta como características: elementos de vaso do tipo escalariforme, fragmentos de epiderme mostrando estômatos tetracíticos e fragmentos de parênquima esponjoso.

### 4. CONCLUSÃO

As características anatômicas descritas favorecem uma identificação confiável da planta, ampliando o conhecimento botânico acerca da espécie e de seu gênero.



## 5. REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, E. S. B.; NEVES, L. J. 2004. Anatomia foliar de *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt & Smith (Zingiberaceae). *Acta Bot. Bras.*, v. 18, p. 109-121, 2004.
- HUSSIN, K. H.; SENG, C. T.; IBRAHIM, H.; GEN, W. Q.; PING, L. J.; NIAN, L. Comparative leaf anatomy of *Alpinia* Roxb. species (Zingiberaceae) from China. *Bot. J. Linnean Soc.*, v. 133, p. 161-180, 2000.
- JOHANSEN, D. A. *Plant Microtechnique*. New York: Mc Graw Hill, 1940.
- KRAUTER, D. Erfahrungen mit Etzolds FSA-Färbung für pflanzenschnitte. *Mikrokosmos*, v. 74, p. 231-233, 1985.
- MATOS, F. J. A. *Plantas medicinais: guia de seleção e emprego das plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil*. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2005.
- METCALFE, C. R.; CHALK, L. *Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses*. Oxford: Clarendon Press, 1950.
- ROMAN JUNIOR, W. A. *Estudo farmacognóstico para as espécies medicinais Alpinia zerumbet, Solidago chilensis e Eugenia uniflora*. 191 f. Dissertação (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

## 6. AGRADECIMENTOS

Farmacopeia Brasileira e Agência Nacional de Vigilância Sanitária.



ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL – PNQM 14

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DO ALCALOIDE HARMANA ISOLADO DE *Simira gardneriana* M.R.V. BARBOSA & PEIXOTO (RUBIACEAE)

C. A. A. FERRAZ<sup>1</sup>, R. G. de OLIVEIRA-JÚNIOR<sup>1</sup>, S. S. G. CAMPOS<sup>1</sup>, K. S. D. de MORAES<sup>1</sup>, J. L. SILVA<sup>1</sup>, M. F. S. SILVA<sup>2</sup>, C. Ó. PESSOA<sup>2</sup>, J. A. SIQUEIRA-FILHO<sup>3</sup> e J. R. G. S. ALMEIDA<sup>1</sup>, X. P. NUNES<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Vale do São Francisco, Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Mediciniais (NEPLAME)

<sup>2</sup> Universidade Federal do Ceará, Laboratório Nacional de Oncologia Experimental

<sup>3</sup> Universidade Federal do Vale do São Francisco, Centro de Referência para Recuperação de Áreas Degradadas (CRAD/UNIVASF-Caatinga)

E-mail para contato: christianeferraz13@gmail.com

**RESUMO** – *Este trabalho objetivou investigar a atividade citotóxica do alcaloide harmana isolado do extrato metanólico bruto (EMB) das cascas de Simira gardneriana, uma Rubiaceae nativa do bioma Caatinga. Após sua obtenção, EMB foi submetido ao fracionamento por cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando solventes orgânicos em polaridade crescente. Uma das subfrações obtidas apresentou a formação de cristais amarelos que, após purificação por recristalização em clorofórmio, resultou no isolamento do alcaloide harmana, cuja estrutura foi caracterizada por técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). O efeito citotóxico foi avaliado pelo ensaio do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) frente a linhagens celulares tumorais - HCT-116 (colorretal), SF295 (glioblastoma) e HL-60 (leucêmica) - e não tumorais (L929). O alcaloide apresentou moderada atividade citotóxica, sobretudo frente à linhagem HCT-116, com percentual de inibição de crescimento de 56,84%. Contudo, também foi observado um percentual de inibição celular significativo para a linhagem não tumoral (30,50%), sugerindo baixa seletividade do composto pelas linhagens tumorais.*

*Palavras-chaves: Câncer, Produtos Naturais, Seletividade.*

**ABSTRACT** – *This study aimed to investigate the cytotoxic activity of harmana isolated from crude methanol extract (EMB) of Simira gardneriana, a native Rubiaceae*



from Caatinga biome. After obtaining, EMB was subjected to fractionation by column chromatography on silica gel using increasingly polar organic solvents. One of the subfractions obtained showed the formation of yellow crystals, and after purification by recrystallization with chloroform resulted in the isolation of alkaloid harmana, whose structure was characterized by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) techniques. The cytotoxic effect was measured by the MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) assay against tumor - HCT-116 (colorectal), SF295 (glioblastoma) and HL-60 (leukemic) - and non-tumor (L929) cell lines. The alkaloid presented moderate cytotoxic activity, particularly against the HCT-116 cell line, with 56.84% growth inhibition. However, it was also observed a significant inhibition on the non-tumor cell line (30,50%), indicating weak selectivity of the compound for tumor cell lines.

*Keywords: Cancer, Natural Products, Selectivity.*

## 1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais têm sido fonte de várias drogas modernas, incluindo aqueles para a terapia anticâncer. Estes compostos naturais podem agir como agentes preventivos, combativos e como fatores que aumentam a eficácia terapêutica dos medicamentos existentes, superando assim a resistência aos medicamentos de células cancerosas que é o principal fator determinante da falha na quimioterapia convencional (Catalani et al, 2016).

Para isso, têm feito uma busca por moléculas promissoras em diversas fontes naturais como a espécie *Simira gardneriana* que após estudos preliminares apresentou potencial químico e biológico (Menezes, 2014; Ferraz, 2016).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

As cascas de *Simira gardneriana* foram coletadas no município de Afrânio-PE (ano de 2015). Posteriormente, foram secas em estufa de ar circulante e trituradas em moinho mecânico de facas. O pó obtido passou por uma maceração inicial com hexano. Após isso, foi realizada nova maceração com metanol, com troca de solvente a cada 72 horas. O macerado obtido foi concentrado em evaporador rotativo, obtendo-se assim o Extrato Metanólico Bruto das cascas (EMB). Este (30 g) foi selecionado para etapa de fracionamento por cromatografia em coluna de sílica gel 60, utilizando hexano, CHCl<sub>3</sub>, AcOEt e MeOH, em ordem crescente de polaridade, sozinhos ou combinados em misturas binárias. A subfração 14 obtida apresentou a formação de cristais amarelos em forma de agulha, que foram submetidos ao processo de purificação por recristalização em CHCl<sub>3</sub>, resultando no isolamento do alcaloide harmana (12,3 mg), solúvel em metanol, e identificado através de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C. As análises por RMN foram realizadas com o aparelho Bruker Ascend™ 400, operando a 400 MHz para RMN de <sup>1</sup>H e 100 MHz para RMN de <sup>13</sup>C.

A análise da citotoxicidade do EMB e da harmana foi realizada pelo método do MTT, conforme descrito inicialmente por Mossman (1983). Foram utilizadas as linhagens tumorais HCT-116 (côlon humano), SF295 (glioblastoma) e HL-60 (leucêmica) cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA). A linhagem não tumoral L929 (fibroblasto murino) foi utilizada para avaliar o índice de seletividade da harmana, sendo este calculado dividindo-se o percentual de inibição promovido pela substância contra a linhagem tumoral pelo percentual de inibição observado para a linhagem não tumoral. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5 % de CO<sub>2</sub>. As amostras foram solubilizadas em DMSO puro estéril para concentrações estoque de 10 mg/mL (extratos e frações) e 1 mg/mL (compostos isolados), que posteriormente foram diluídas para serem testadas em concentração única de 50 µg/mL e 5 µg/mL, respectivamente. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados obtidos foram expressos em percentual de inibição de crescimento celular (IC%), como média ± desvio padrão.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O espectro de RMN <sup>1</sup>H obtido para a substância isolada apresentou seis sinais de hidrogênios aromáticos, sendo dois dubletos com constante de acoplamento compatível com um sistema AB de um anel heterocíclico, δ<sub>H</sub> 8,01 (d, *J* = 5,6 Hz, 1H) e 7,69 (d, *J* = 5,6 Hz, 1H), quatro sinais representando quatro hidrogênios vizinhos em um anel aromático dissubstituído, δ<sub>H</sub> 7,95 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,47 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,43 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H) e 7,14 (m, 1H), e um singleto em δ<sub>H</sub> 2,68 (3H) correspondente a um sinal de grupo metila ligado em um anel aromático. A análise conjunta dos espectros de RMN <sup>13</sup>C e DEPT-135 revelaram a presença de doze sinais: um metílico (C-14); seis metínicos (C-3; C-4; C-5; C-6; C-7 e C-8) e cinco carbonos não hidrogenados (C-1; C-10; C-11; C-12 e C-13), todos na região de carbonos aromáticos, exceto C-14. A posição da metila na molécula foi definida com base nas correlações observadas nos espectros do tipo HMBC, especificamente a correlação entre os sinais H-14 e C-1. Estes dados espectrais, o teste positivo com reagente de Dragendorff e a comparação com os valores registrados na literatura (ALVES et al., 2001) permitiu identificar a substância como sendo o alcaloide β-carbolínico harmana.

Quanto à avaliação do efeito citotóxico, EMB apresentou baixa atividade frente a todas as linhagens tumorais testadas. Entretanto, o alcaloide harmana demonstrou melhor perfil de atividade citotóxica, sobretudo frente à linhagem HCT-116, promovendo cerca de 56% de inibição do crescimento celular (Tabela 1). É importante ressaltar que frente à linhagem não tumoral (L929), o alcaloide apresentou cerca de 30% de inibição do crescimento, conferindo um índice de seletividade para a linhagem HCT-116 (1,86), SF295 (1,57) e, seletividade mais baixa para HL-60 (0,34). Nesse contexto, estudos posteriores deverão ser realizados no sentido de desenvolver sistemas farmacêuticos que possam diminuir a toxicidade do alcaloide em linhagens celulares não tumorais, aumentando o seu perfil de seletividade.

**Tabela 1.** Efeito citotóxico do alcaloide harmana e do extrato metanólico bruto (EMB) obtido das cascas de *S. gardneriana*, no ensaio do MTT, frente às linhagens tumorais de cólon humano (HCT-116), glioblastoma (SF295) e leucemia (HL-60), e à linhagem não tumoral de fibroblasto murino (L929). Os resultados são expressos em percentual de inibição celular (%IC), como média ± desvio padrão (n=3).



Amostra	Linhagem celular (%IC)			
	HCT-116	SF295	HL-60	L929
EMB	12,89 ± 9,46	10,31 ± 6,88	19,86 ± 2,62	-
Harmana	56,84 ± 1,37	47,95 ± 1,06	10,39 ± 3,75	30,50 ± 6,20

#### 4. CONCLUSÃO

Esse estudo conduziu ao isolamento do alcaloide harmana a partir do extrato metanólico das cascas de *S. gardneriana*, uma espécie vegetal nativa do bioma Caatinga. O alcaloide apresentou moderada atividade citotóxica frente a linhagens de células tumorais, porém foi observado um percentual de inibição celular significativo também para linhagem não tumoral.

#### 5. REFERÊNCIAS

- ALVES, C. C. F. et al. Triterpenes, glucosyl steroid and alkaloid isolated from *Simira glaziovii*. *Floresta e Ambiente*, v. 8, n.1, p. 174-179, 2001.
- CATALANI, E. et al. Natural products from aquatic eukaryotic microorganisms for cancer therapy: Perspectives on anti-tumour properties of ciliate bioactive molecules. *Pharmacological Research*, v. 113, p. 409-420, 2016.
- FERRAZ, A. C. C. et al. GC-MS analysis and in vitro bioactivity of fixed oil and fatty acid fraction obtained from seeds of *Simira gardneriana*, a Rubiaceae from Brazilian Caatinga Biome. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 10, n. 23, p. 493-500, 2016.
- MENEZES, I. M. G. B. Estudo químico e biológico das partes aéreas de *Simira gardneriana* M. R. Barbosa & A. L. Peixoto (Rubiaceae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina-PE, 2014.
- MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunology Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.

#### 6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida, à Universidade Federal do Vale do São Francisco e à Universidade Federal do Ceará pelo suporte técnico-científico.



ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL – PNQM 15

## INVESTIGAÇÃO *IN SILICO* DA AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTI-PROLIFERATIVA DE MOLÉCULAS ISOLADAS DE PRÓPOLIS ORGÂNICA BRASILEIRA

N.T.C. COSTA<sup>1</sup>, P.L. ROSALEN<sup>2</sup>, A.P. TIVERON<sup>3</sup>, S.M. ALENCAR<sup>3</sup>, A.G. FERREIRA<sup>4</sup>, M.G. da CUNHA<sup>2</sup>, M. FRANCHIN<sup>2</sup>, B.D. NANI<sup>2</sup>, M. Z. HERNANDES<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Farmacêuticas.

<sup>2</sup> Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Departamento de Ciências Fisiológicas.

<sup>3</sup> Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição.

<sup>4</sup> Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Química.

E-mail para contato: zaldini@ufpe.br

**RESUMO** – *O presente trabalho busca identificar possíveis mecanismos de ação (potencial de inibição do I $\kappa$ B kinase - IKK) para moléculas isoladas da própolis orgânica brasileira, com atividades anti-inflamatórias e anti-proliferativas, usando-se métodos in silico de docking molecular. Sete moléculas foram avaliadas, sendo o melhor resultado a Secoisolariciresinol, que possui uma estrutura grande, proporcionando maior número de interações com o alvo e assim uma maior estabilidade.*

**Palavras-chave:** *IKK, Docking molecular, Anti-inflamatória, Anti-proliferativa, Própolis*

**ABSTRACT** – *This study focused at the in silico characterization of isolated molecules from Brazilian organic propolis, with potential inhibition of I $\kappa$ B kinase (IKK), by using molecular docking approaches. This molecules presented anti-inflammatory and anti-proliferative activities. Seven molecules were calculated, and the best result was Secoisolariciresinol, which has a large structure, providing greater number of interactions with the target and thus greater stability for the interaction with it.*

**Keywords:** *IKK, Docking, Anti-inflammatory, Anti-proliferative, Propolis*



## 1. INTRODUÇÃO

Própolis é uma resina coletada por abelhas a partir de brotos e exudatos de plantas, e a própolis orgânica, que vem sendo estudada em colaboração com grupos de pesquisa experimentais, é a única variedade do mundo produzida de forma orgânica na mata atlântica, com uma rica diversidade química e atividade inibidora sobre a ativação do NF- $\kappa$ B e produção de citocina TNF- $\alpha$ . Há muitos estudos de isolamento e identificação dos compostos bioativos de própolis com o potencial de serem aplicados como novos agentes terapêuticos (da Cunha *et al.*, 2013; Ribeiro-Junior *et al.*, 2015). Segundo Ozes *et al* (1999) o NF- $\kappa$ B regula a expressão do gene na imunidade, respostas a estresse, inflamação e a inibição da apoptose. Normalmente, o NF- $\kappa$ B encontra-se em seu estado inativo, por estar em complexo com o seu inibidor, a I $\kappa$ B kinase (IKK), porém, através de estímulos extracelulares ocorre a fosforilação do I $\kappa$ B, levando à dissociação do complexo I $\kappa$ B/ NF- $\kappa$ B, liberando o NF- $\kappa$ B que é translocado para o núcleo, onde dá início o processo de transcrição de genes, genes esses que são responsáveis pela expressão de genes pró-inflamatórios, responsáveis por todos os sintomas característicos da inflamação (Palermo, 2011). A I $\kappa$ B, portanto, se torna um alvo farmacológico de grande importância devido ao seu papel fundamental para a ativação do NF- $\kappa$ B, e conseqüentemente todo o processo inflamatório. Desta forma, o objetivo desse trabalho é o de identificar moléculas isoladas da própolis orgânica com potencial de inibição do I $\kappa$ B kinase (IKK), determinando seu possível mecanismo de ação para as atividades anti-inflamatórias e anti-proliferativas, por meio da utilização de métodos *in silico* de *docking* molecular.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

As estruturas e propriedades eletrônicas das moléculas da própolis orgânica brasileira (coletadas entre o sul do Paraná e norte de Santa Catarina) foram obtidas por meio de cálculos de química quântica, a partir dos algoritmos implementados e disponíveis no programa SPARTAN 08<sup>7</sup>, usando-se critérios padrões de convergência. Os cálculos de *docking* molecular foram realizados utilizando-se como alvo a estrutura da I $\kappa$ B Kinase  $\beta$  humana - IKK (código PDB: 4KIK), que é composta de um complexo co-cristalizado com um inibidor conhecido como “K252A” (Liu *et al*, 2013) . O sítio ativo será definido pela região de contato com ligante co-cristalizado. Os resíduos LEU21, LYS44, MET96, GLU 97, TYR98, CYS99, ASP103, GLU149, ILE165, ASP166 foram tratados como flexíveis durante os cálculos, em busca do ajuste induzido. O programa GOLD 5.1 foi utilizado para cálculos de *docking*, seguido do programa BINANA (J.D. Durrant, J.A. McCammon, 2011) que foi utilizado para análise das interações moleculares presentes nos resultados de *docking*, utilizando a configuração padrão, exceto para a distância de ligação de hidrogênio, que foi alterado para o máximo de 3.5Å. As figuras foram geradas com o software PyMOL.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram gerados de acordo com a função de pontuação CHEMPLP (Korb *et al*, 2009). A tabela 1 mostra as diferenças entre os modos de ligação de todas as moléculas calculadas. É possível identificar os extremos na pontuação do *docking*, enquanto o Secoisolariciresinol apresenta a mais alta pontuação (96,36) o *Trans*-coniferilalcool apresenta a mais baixa pontuação (56,36). É possível observar um maior número de interações intermoleculares (contatos hidrofóbicos e ligações de hidrogênio) do alvo IKK com o Secoisolariciresinol, em comparação com o *Trans*-coniferilalcool. Como pode ser observado na tabela 1, os resíduos CYS99 e ASP103 apresentam a capacidade de ligação de hidrogênio com os dois ligantes, contudo com distâncias diferentes e, portanto, estabilidades diferentes (1.4Å versus 1.9Å). Além disso, existem mais duas ligações de hidrogênio existentes ente os resíduos ASP166 e GLU149 e apenas o Secoisolariciresinol (2.1Å e 2.0Å, respectivamente). Estes achados mostram evidências quantitativas para a maior estabilidade do complexo formado entre o Secoisolariciresinol e o IKK, explicando assim seu Score mais alto.

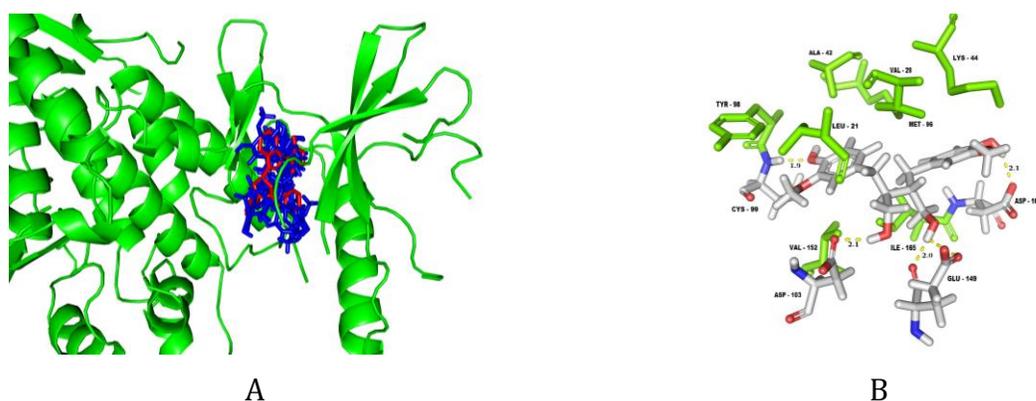


Figura 1. (A) Superposição das soluções de *docking* (em azul), além do ligante co-cristalizado “K252A” (em vermelho). (B) Resíduos envolvidos em contatos hidrofóbicos (em verde) e Ligação de Hidrogênio com a molécula Secoisolariciresinol.

Tabela 1. Interações intermoleculares entre os ligantes e o alvo IKK. CH significa “Contato Hidrofóbico” e os números são as distâncias (em Å) de Ligação de Hidrogênio.

Resíduos	Balajaponina D	Lariciresinol	Matairesinol	Pinoresinol	Secoisolariciresinol	<i>Trans</i> - Coniferaldeído	<i>Trans</i> - Coniferilalcool
LYS44	1,8		CH	2,0	CH		
THR23	2,1	2,1					
CYS99			2,0	1,7	1,4	2,1	1,9
TYR98		CH	CH		CH	CH	
VAL152	CH	CH	CH	CH	CH	CH	CH
ASP103			1,7		2,1		2,1
ILE165	CH	CH	CH	CH	CH	CH	CH
ASP166	2,1	2,0	2,0	2,1	2,1		
LEU21	CH	CH	CH	CH	CH	CH	CH
MET96			CH	CH	CH	CH	CH
VAL29	CH	CH	CH	CH	CH	CH	
GLY22		CH		CH		CH	
LEU68							
GLU149	CH	CH	CH		2,0		
VAL74		CH				CH	
ALA42				CH	CH		



GLU97		1,8				1,7	
Score	87,95	83,48	77,66	82,60	96,36	56,81	56,36

#### 4. CONCLUSÃO

O resultado deste trabalho indica que das moléculas isoladas da própolis orgânica brasileira, a Secoisolariciresinol, é a que apresenta a maior capacidade de ligação com a IKK, conforme visto nos modelos *in silico*. Como perspectivas, estamos concluindo ensaios biológicos *in vitro*, para realizar a comparação e validação dos resultados *in silico* versus *in vitro*.

#### 5. REFERÊNCIAS

- DA CUNHA, MG; FRANCHIN M; GALVÃO, CC; DE RUIZ, ALTG; DE CARVALHO, E; IKEGAKI, M; ALENCAR, SM; KOO, H. ROSALEN, PL. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Meliponascutellaris* geopropolis. *BMC Complement Altern Med* (2013) 13, 23.
- LIU, S.; MISQUITTA, Y. R.; OLLAND, A.; JOHNSON, M. A.; KELLEHER, K. S.; KRIZ, R.; LIN, L. L.; STAHL, M.; MOSYAK, L. J. *Biol. Chem.* 2013, 288, 22758-22767.
- KORB O; STÜTZLE T; EXNER TE. Empirical scoring functions for advanced protein-ligand docking with PLANTS. *J. Chem. Inf. Model*, 49 (2009), pp. 84–96 <http://dx.doi.org/10.1021/ci800298z>
- OZES, ON.; MAYO, LD.; GUSTIN, JA.; PFEFFER, SR.; PFEFFER, LM.; Donner, DB. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*.1999 Sep2;401(6748):82-5.
- PALERMO NY; NATARAJAN A. Beyond the frog: The evolution of homology models of human IKKb *Bioorg Med Chem Lett.* 2011 Oct 15;21(20):6081-4.
- RIBEIRO-JUNIOR, JA; FRANCHIN, M; CAVALLINI, ME; Denny C ;de Alencar, SM; Ikegaki, M; Rosalen, PL. Gastroprotective Effect of Geopropolis from *Meliponascutellaris* Is Dependent on Production of Nitric Oxide and Prostaglandin. *Evid Bas. Comp. Alt. Med* (2015) 459846.

#### 6. AGRADECIMENTOS

Breyer & Cia Ltda. pela iniciativa, incentivo e comprometimento no fornecimento da própolis orgânica certificada utilizada neste estudo. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP - 2010/52679-9, 2011/50651-2; e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq - 472848/2011-9 e 310522/2015-3. Agradecemos também à UFPE.

ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL – PNQM 16

## ANÁLISE FITOQUÍMICA DAS FOLHAS DE *Cinnamomum zeylanicum* BLUME (LAURACEAE) POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

E.C.G.S. BARBOSA<sup>1</sup>, R.T.M. RAMOS<sup>1</sup>, J.K.A. SILVA<sup>2</sup>, M.R.A. FERREIRA<sup>1,3</sup>, L.A.L. SOARES<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFPE

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Patologia, Centro de Ciências da Saúde, UFPE.

<sup>3</sup>Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Centro de Ciências Biológicas, UFPE.

E-mail para contato: elayne.cristina686@outlook.com

**RESUMO** – *Cinnamomum zeylanicum*, popularmente conhecida como canela-da-índia ou canela-do-ceilão, apresenta valor medicinal por desempenhar atividades antiinflamatória, antimicrobiana e contribuir para a redução das doenças cardiovasculares. Essas atividades se devem à presença de metabólitos secundários e uma correta avaliação desses compostos é de suma importância para garantir segurança e eficácia na identificação da espécie. Assim, o objetivo deste estudo foi realizar a prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada das folhas da espécie. Os cromatogramas foram obtidos utilizando a metodologia proposta por Wagner e Bladt (2001). Os resultados evidenciaram a presença de açúcares redutores, alcaloides, derivados cinâmicos, flavonoides, taninos condensados, taninos hidrolisáveis, terpenos e esteroides.

**Palavras-chave:** Canela; Fitoquímica; CCD.

**ABSTRACT** – *Cinnamomum zeylanicum*, popularly known as canela-da-índia or canela-do-ceilão, is a species of medicinal value for anti-inflammatory, antimicrobial activities and contributes to the reduction of cardiovascular diseases. These activities are due to the presence of secondary metabolites and a correct evaluation of the compounds is of great importance in ensure safety and effectiveness in the identification of the species. Thus, it is necessary to perform phytochemical screening of the species by thin-layer chromatograph. The chromatograms were obtained using the methodology proposed by Wagner and Bladt (2001). The results obtained showed the presence of reducing sugars, alkaloids, cinnamic derivatives, flavonoids, hydrolysable tannins, condensate tannins, terpenes and steroids.

**Key words:** Cinnamon; Phytochemistry; CCD.

## 1. INTRODUÇÃO

*Cinnamomum zeylanicum* Blume é popularmente conhecida no Brasil como canela-da-índia ou canela-do-ceilão, e destaca-se por apresentar uso na medicina e culinária (Lima *et al.*, 2005). Estudos realizados por Ranasinghe e colaboradores (2013) apontam que extratos das folhas de canela desempenham atividades antiinflamatória, antimicrobiana e contribuem para a redução das doenças cardiovasculares. As atividades relatadas estão associadas a estruturas químicas provenientes do metabolismo secundário, e a correta avaliação de seus compostos é de suma importância para garantir segurança e eficácia atribuídas a espécie.

Entre as metodologias que podem ser empregadas para este fim, destaca-se a cromatografia em camada delgada (CCD). A análise por CCD além da reconhecida reprodutibilidade, apresenta simplicidade, rapidez e baixo custo de execução. Adicionalmente, os resultados obtidos são de fácil interpretação (Vermaak *et al.*, 2010). Considerando a importância econômica e terapêutica de *C. zeylanicum*, a investigação da composição química poderá esclarecer atividades atribuídas a espécie, além de orientar a realização de estudos biomonitorados para identificação de novas aplicações biológica e farmacológicas para o táxon. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar qualitativamente por CCD os principais constituintes do metabolismo secundário das folhas de *C. zeylanicum*.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

As folhas de *C. zeylanicum* foram coletadas no campus da Universidade Federal de Pernambuco (Recife-PE). Em seguida, o material vegetal foi seco em estufa por um período de 7 dias sob temperatura de 40 °C e triturado em moinho de facas. Cerca de 1 g da droga vegetal seca e moída foi transferido para balão de fundo redondo e adicionados 10 mL de metanol. A solução foi mantida sob refluxo por 15 minutos sob 85 °C e, por fim, resfriada e filtrada. Do filtrado, alíquotas de 10 µL foram retiradas e aplicadas em placas de gel de sílica (Art. 1.05554.0001, Merck).

Os cromatogramas foram obtidos utilizando os procedimentos propostos por Wagner e Bladt (2001), de acordo com os sistemas de eluição e os padrões utilizados para as respectivas classes de metabólitos (Quadro 1). Após eluição, as cromatoplasmas foram secas em capela e observadas sob luz branca. Depois, as mesmas foram derivatizadas e observadas sob os comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise por CCD indicaram a presença de diversos grupos de substâncias do metabolismo secundário presentes na matéria prima vegetal. Entre os quais foram observados açúcares redutores, alcaloides, derivados cinâmicos, flavonoides, taninos (condensados e hidrolisáveis), terpenos e esteroides. Por outro lado, não foi detectada banda de coloração fluorescente indicativa da presença de cumarinas (Tabela 1).

Os resultados demonstram a presença de ácido gálico e elágico, quercetina e rutina, catequina, β-sitosterol na matéria prima, exibindo bandas de mesma coloração e R<sub>f</sub> (semelhantes) dos padrões.

Quanto aos açúcares redutores e alcaloides, o resultado positivo corresponde a presença de bandas com coloração semelhante as dos padrões, evidenciadas após derivatização.

Quadro 1 - Sistemas cromatográficos, reveladores e padrões utilizados para obtenção do perfil fitoquímico das folhas de *Cinnamomum zeylanicum*.

Metabólitos	Sistema de eluição	Reveladores	Padrões
Alcaloides	AcOEt:HCOOH:AcOH:H <sub>2</sub> O (100:11:11:26)	Dragendorff	Pilocarpina
Açúcares redutores	AcOEt:HCOOH:AcOH:H <sub>2</sub> O (50:20:10:10)	Timol 0,5% + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + Δ	D- Frutose/ D- Maltose
Cumarinas	EtOEt:Tolueno:AcOH10% (50:50:50)	KOH+UV	Cumarina
Derivados Cinâmicos	AcOEt:HCOOH:H <sub>2</sub> O (90:5:5)	NEU + PEG	Ácido Caféico
Flavonoides			Quercetina/ Rutina
Taninos hidrolisáveis		Cloreto Férrico	Ác. Gálico
Taninos condensados		Vanilina Clorídrica	Catequina
Terpenos/ esteroides	Tolueno:AcOEt (70:30)	Lieberman Buchard	B-sitosterol

AcOEt: Acetato de etila; HCOOH: Ácido fórmico, H<sub>2</sub>O: Água, AcOH: Ácido acético, EtOEt: Éter etílico; NEU: ácido etilborilaminoéster a 1% em metanol; PEG: Propilenoglicol; UV: Ultravioleta; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Ácido Sulfúrico; KOH: Hidróxido de Potássio.

Tabela 1 - Resultados da prospecção fitoquímica das folhas de *Cinnamomum zeylanicum* Blume.

Classe do metabolismo secundário	Resultados	Rf padrão	Rfs amostra
Açúcares redutores	+	0,70 0,73	0,51
			0,56
			0,63
			0,92
Alcaloides	+	0,50	0,80
			0,87
			0,97
Cumarinas	-	-	-
Derivados cinâmicos	+	0,21	0,18
			0,21
Flavonoides	+	0,32	0,32
			0,43
			0,51
			0,62
Taninos hidrolisáveis	+	0,18	0,76
			0,81
			0,91
Taninos condensados	+	0,73	0,73
Terpenos e Esteroides	+	0,23	0,23



#### 4. CONCLUSÃO

Os resultados da prospecção fitoquímica a partir das folhas de *C. zeylanicum* realizada por CCD, indicou a presença de diversos metabólitos importantes tais como: derivados cinâmicos, açúcares redutores, flavonoides, taninos condensados e hidrolisáveis, terpenos e esteroides. Deste modo, os dados deste estudo reiteram a importância do farmacógeno investigado como potencial matéria prima para obtenção de extratos e frações bioativos.

#### 5. REFERÊNCIAS

- LIMA M. P.; ZOGHBI M. G. B.; ANDRADE E. H. A.; SILVA T. M. D.; FERNANDES C. S. Constituintes voláteis das folhas e dos galhos de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). *Acta Amazonica*, v. 35, n. 3, 2005.
- LUIZ, H. S.; SANTOS, A. C. G.; LIMA, F. C.; MACHADO, K. R. G. Prospecção fitoquímica de *Himatanthus drasticus* Plumel (Apocynaceae), da mesorregião leste maranhense. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 16, n. 3, supl. I, p. 657-662, 2014.
- RANASINGHE, P.; PIGERA, S.; PREMAKUMARA, G. A. S.; GALAPPATHTHY, P.; CONSTANTINE, G. R.; KATULANDA, P. Medicinal properties of 'true' cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*): a systematic review. *BMC complementary and alternative medicine*, v. 13, n.1, p. 275-284, 2013.
- VERMAAK, I.; HAMMAN, J. H.; VILJOEN, A. M. High performance thin layer chromatography as a method to authenticate *Hoodia gordonii* raw material and products. *South African Journal of Botany*, v. 76, n. 1, p. 119-124, 2010.
- WAGNER, H.; BLADT, S. *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography*. 2 ed. Berlim: Springer, 2001.

#### 6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FACEPE (APQ-0493-4.03/14), ao CNPq (308386/2015-9) e a ANVISA/MS (TC03/2010), pelo o apoio na forma de financiamento e de bolsas.



ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL – PNQM 17

## DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES NO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *Eugenia uniflora* Linn POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

R. T. M. RAMOS<sup>1</sup>, I. C. F. BEZERRA<sup>1,2</sup>, M. R. A. FERREIRA<sup>1,2</sup>, L. A. L. SOARES<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFPE.

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Centro de Ciências Biológicas, UFPE  
E-mail para contato: rhyanne.moraes11@gmail.com

**RESUMO** – *Eugenia uniflora* Linn (Myrtaceae), conhecida como pitanga ou pitangueira, é uma espécie de importância medicinal e alimentícia que possui aplicação na fitoterapia devido à presença de diversos fitoconstituintes, dentre eles os flavonoides. Assim, a espécie tem se tornado alvo de diversos estudos para o controle de qualidade, detecção e quantificação desses compostos. O objetivo do trabalho foi otimizar a metodologia analítica para quantificação dos flavonoides por CLAE-DAD. As análises avaliaram: tamanho de coluna, composição de fase móvel, agente acidificante, fluxo de fase móvel e método gradiente. A metodologia apresentou boa eficiência de separação e detecção dos flavonoides presentes na matriz, possibilitando sua quantificação por padronização interna, obtendo os teores de 0,595% e 0,016% expressos em vitexina e hiperosídeo, respectivamente.

**Palavras Chave:** CLAE-DAD. Flavonoides. Pitangueira. Quantificação.

**ABSTRACT** - *Eugenia uniflora* Linn (Myrtaceae), known as pitanga or pitangueira, is a species of medicinal and food importance with an application in phytotherapy due to the presence of several phytochemicals, including flavonoids. Thus, the species has become the subject of different studies for quality control, detection and quantification of these compounds. The aim of the work was optimize the analytical methodology for quantification of flavonoids by HPLC-PDA. The analysis evaluated: column size, mobile phase composition, acidifying agent, mobile phase flow and gradient method. The methodology showed good efficiency of separation and detection of flavonoids present in the matrix, allowing its quantification by internal standardization, obtaining the content of 0.595% and 0.016% expressed in vitexin and hyperoside, respectively.

**Keywords:** HPLC-PDA. Flavonoids. Pitangueira. Quantification.



## 1. INTRODUÇÃO

*Eugenia uniflora* Linn (Myrtaceae), popularmente conhecida no Brasil como pitanga ou pitangueira, é uma espécie bastante difundida na medicina tradicional por apresentar propriedades farmacológicas comumente atribuídas à presença de compostos fenólicos (Garmus *et al.*, 2014). Dentre estes compostos, os flavonoides recebem destaque, por atuarem no combate aos radicais livres e como quelantes de metais (Firmo *et al.*, 2015). A espécie tem sido alvo de diferentes estudos, os quais reportaram diversas propriedades, como: antioxidante (Garmus *et al.*, 2014), antipirética, anti-noceptiva (Amorim *et al.*, 2009), antifúngica (Ferreira *et al.*, 2013), antidepressiva (Victoria *et al.*, 2013). Considerando as propriedades da espécie atribuídas principalmente aos flavonoides, para sua utilização é necessário realizar estudos de controle de qualidade para quantificação desses compostos que apresentem alta resolução, sensibilidade e detectabilidade. Para tanto, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a detector de arranjo de diodos (DAD) permite o registro de dados de absorvância do ultravioleta ao visível, fornecendo o espectro de varredura, possibilitando a identificação e análise dos fitoconstituintes presentes na matriz (Prathap *et al.*, 2013).

Diante do exposto, o propósito desse trabalho foi o desenvolvimento e otimização de método para análise de flavonoides por CLAE-DAD no extrato bruto das folhas de *Eugenia uniflora*, para aplicação no controle de qualidade da espécie vegetal com confiabilidade e segurança.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção de Extrato Bruto e Soluções Amostra e Padrão

O material vegetal coletado foi seco em estufa (Luca 82, Lucadema<sup>®</sup>) por 7 dias a 40 °C e posteriormente triturado em moinho de facas (Tipo Willye TE-680, Tecnal<sup>®</sup>). O extrato bruto (EB) foi obtido por turbólise (Liquidificador Industrial, Metvisa<sup>®</sup>), durante 20 minutos (4 ciclos de 30 segundos em intervalos de 4 minutos), na proporção 10% (p/v) droga:solvente, utilizando como líquido extrator acetona:água 7:3 (v/v). O extrato obtido foi filtrado, concentrado (RV10 Basic, IKA<sup>®</sup>), congelado e liofilizado (L101, Liotop<sup>®</sup>). Foram preparadas soluções estoque para a amostra (concentração de 2 mg/mL do EB). A partir desta solução estoque foram realizadas diluições apropriadas, e as soluções foram filtradas para vials, através de membrana de PVDF (0,45 µm).

### 2.2 Desenvolvimento e Avaliação das Condições Cromatográficas

Para avaliação das melhores condições, as análises foram conduzidas em cromatógrafo líquido equipado (Dionex, ThermoScientific<sup>®</sup>) com detector de arranjo de fotodiodos (DAD), degaseificador e sistema de injeção automática. As condições cromatográficas foram otimizadas por meio de modificações em alguns parâmetros: tamanho de coluna (15 ou 25 cm, composição de fase móvel (água, metanol, acetonitrila), agente acidificante (ácido fosfórico, ácido acético ou ácido trifluoroacético), fluxo (0,5-1,2 mL/min). O comprimento de onda para detecção foi determinado após varredura de 190 a 400 nm.

### 2.3 Avaliação de substância padrão

Para a quantificação, foi necessário a avaliação de substâncias para utilização como padrão interno. Para tal, foram realizadas análises do extrato e do material fortificado com quatro diferentes substâncias padrão: Quercetina (96%, Sigma<sup>®</sup>), Rutina (96%, Sigma<sup>®</sup>), Vitexina (98%, USP<sup>®</sup>) e Hiperosídeo (92%, Sigma<sup>®</sup>).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Condições Cromatográficas

O método foi estabelecido após a separação eficiente dos flavonoides presentes na matriz vegetal, considerando picos resolvidos, simétricos e ausentes de *fronting* ou *tailing*. As condições otimizadas estão apresentadas no quadro 1. Nestas análises, foi possível identificar através de espectros de varredura típicos a presença de três flavonoides presentes na matriz, nomeados 1, 2 e 3 de acordo com detecção (Figura 1). Porém o flavonoide 1 apresentou concentrações muito baixas, dificultando sua detecção. Os comprimentos de onda de detecção foram definidos através os máximos de absorção para as duas bandas características de flavonoides, sendo estabelecidos em 270 nm e 350 nm.

Quadro 1 - Condições cromatográficas utilizadas nas análises por CLAE.

<b>Fase estacionária</b>	250 mm x 4,6 mm (C <sub>18</sub> ; 5 µm), pré-coluna (C <sub>18</sub> , 3,9 µm)
<b>Fase móvel</b>	H <sub>2</sub> O (A) e MeOH (B) 0,05% de ácido trifluoroacético
<b>Fluxo</b>	0,8 mL/min
<b>Modo</b>	Gradiente (0-10 min de 10-25% de Fase B; 10-15 min de 25-40% de FB; 15-25 min de 40-70% de FB; 25-30 min 75% de FB; 30-31 min de 75-10% de FB)
<b>Volume de injeção</b>	20 µL
<b>Temperatura</b>	21 ± 2 °C
<b>Comprimento de onda</b>	270 e 350 nm

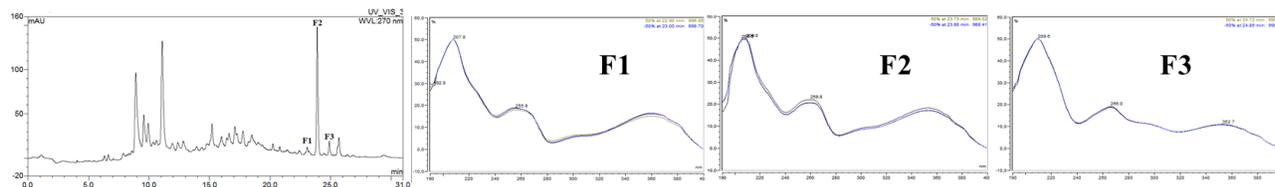


Figura 1 – Cromatograma obtido para o extrato bruto das folhas de *E. uniflora*. Detecção 270 nm, e espectros de varredura para flavonoides 1, 2 e 3.

As análises quantitativas de flavonoides foram conduzidas por padronização interna. Este tipo de abordagem é realizada quando os compostos não são totalmente esclarecidos ou não há disponibilidade das substâncias de referência. Nesse caso, o padrão interno necessita de características semelhantes aos analitos, como o tempo de retenção ( $t_R$ ) e espectro de varredura (Collins *et al.*, 2010). A escolha dos padrões internos de flavonoides foi realizada com quercetina, rutina, vitexina e hiperosídeo. Em razão dos  $t_R$  muito diferentes dos componentes da amostra, os padrões rutina e quercetina foram descartados. Por outro lado, os padrões de vitexina e hiperosídeo apresentaram  $t_R$  de

22,6 e 24,1 min, respectivamente; próximos dos  $t_R$  das substâncias de interesse presentes nas amostras (23,3 min para o flavonoide 2 e 24,4 min para o flavonoide 3). Após a eleição dos padrões internos, foi realizada quantificação das substâncias, sendo obtidos os teores 0,595 g% (1,04) e 0,016 g% (0,79), respectivamente em relação aos flavonoides 2 e 3.

#### 4. CONCLUSÃO

A metodologia desenvolvida por CLAE-DAD, para o extrato bruto das folhas de *Eugenia uniflora*, apresentou boa eficiência de separação e detecção dos flavonoides presentes na matriz. Além disso a padronização interna, após a eleição das substâncias de referência, permitiu a determinação de teores médios de 0,595% do flavonoide 2 e 0,016% de flavonoides 3, expressos em vitexina e hiperosídeo, respectivamente. Porém, a metodologia ainda necessita de validação para assegurar a precisão e reprodutibilidade das respostas analíticas viabilizando a sua aplicação ao controle de qualidade de folhas de *Eugenia uniflora*.

#### 5. REFERÊNCIAS

- AMORIM, A. C. L.; LIMA, C. K. F.; HOVELL, A. M. C.; MIRANDA, A. L. P.; REZENDE, C. M. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga). *Phytomedicine*, v.16, p. 923–928, 2009.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. *Fundamentos de cromatografia*. Campinas: Editora da Unicamp, 2005.
- FERREIRA, M. R. A.; SANTIAGO, R. R.; LANGASSNER, S. M. Z.; MELLO, J. C. P.; SVIDZINSK, T. I. E.; SOARES, L. A. L. Antifungal activity of medicinal plants from Northeastern Brazil. *J Med Plants Res*, v. 7, p. 3008-3013, 2013.
- FIRMO, W. D. C. A.; MIRANDA, M. V.; COUTINHO, G. S. L.; BARBOZA, J. R.; ALVES, L. P. L.; OLEA, R. S. G. Determinação de compostos fenólicos e avaliação da atividade antioxidante de *Lafoensia pacari* (LYTHRACEAE). *Rev. Eletronica Farm.*, v. 12, p. 1-10, 2015.
- GARMUS, T. T.; PAVIANI, L. C.; QUEIROGA, C. L.; MAGALHÃES, P. M.; CABRAL, F. A. Extraction of phenolic compounds from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO<sub>2</sub>, ethanol and water as solvents. *J Supercrit Fluids*, 86, 4-14, 2014.
- PRATHAP, B.; AKALANKA, D.; ARTHANARISWARAN, P. A Review - Importance of RP-HPLC in Analytical Method Development. *IJNTPS*, v. 3, p. 15-23, 2013.
- VICTORIA, F. N.; DE SIQUEIRA BRAHM, A.; SAVEGNAGO, L.; LENARDÃO, E. J. Involvement of serotonergic and adrenergic systems on the antidepressant-like effect of *E. uniflora* L. leaves essential oil and further analysis of its antioxidant activity. *Neurosci Lett*, v. 544, p. 105-109, 2013.

#### 6. AGRADECIMENTOS

Os integrantes agradecem a FACEPE (IBPG-0864-4.04/13; APQ-0493-4.03/14; BIC-1530-4.03/16) e ao CNPq (308386/2015-9).

ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL – PNQM 18

## OTIMIZAÇÃO DE METODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES NAS FOLHAS DE *Alpinia zerumbet*

W. A. VITURINO<sup>1</sup>, R. T. M. RAMOS<sup>1</sup>, I. C. F. BEZERRA<sup>1,2</sup>, M. R. A. FERREIRA<sup>1,2</sup>, L. A. L. SOARES<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFPE.

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, UFPE

E-mail para contato: wli27@yahoo.com.br

**RESUMO** - *Alpinia zerumbet* (Zingiberaceae), conhecida por colônia, é bastante utilizada devido suas propriedades medicinais, as quais podem estar relacionadas a presença de compostos fenólicos. Considerando este aspecto e a necessidade de metodologias simples para quantificação desses compostos, o propósito do trabalho foi otimizar o método para quantificação de flavonoides nas folhas de *A. zerumbet*. As soluções extrativas foram obtidas por refluxo empregando etanol como solvente. Para a otimização foram avaliados os parâmetros: proporção droga:solvente (0,25 - 1,50 g), proporção de solvente (etanol 20 - 100%, v/v), cinética reacional (0 - 60min) e concentração de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>, 2,5 - 7,5%, p/v). Os espectros de varredura apresentaram absorvância máxima em 410 nm. Na influência da proporção droga:solvente melhores condições foram observadas para 0,75 g e maior eficiência extrativa foi observada com EtOH 80% (v/v). O tempo de leitura apresentou menor variação após 30 minutos da adição de AlCl<sub>3</sub> (5,0%). De acordo com os resultados obtidos, foi possível evidenciar a performance das respostas e o desempenho satisfatório do método quanto as exigências em vigor.

**Palavras-chave:** Espectrofotometria; Flavonoides; Otimização.

**ABSTRACT** - *Zerumbet Alpinia* (Zingiberaceae), known as colony, is widely used because of its medicinal properties, which may be related to the presence of phenolic compounds. Considering this and due to need of simple methods for quantifying these compounds, the purpose of the study was to optimize the method for quantification of flavonoids in leaves of *A. zerumbet*. The extraction solutions were obtained by refluxing using ethanol as solvent. For the optimization parameters were evaluated: ratio drug: solvent (0.25 - 1.50 g), ratio of solvent (ethanol 20-100% v/v), reaction kinetic (0 - 60 min) and the concentration of chloride aluminum (AlCl<sub>3</sub> 2,5 - 7,5% w/v). scan spectra showed maximum absorbance at 410 nm. On the influence of the ratio drug: solvent best conditions were observed at 0.75 g and higher extractive effectiveness was observed with 80% EtOH (v/v). The reading time showed less variation after 30 minutes the addition of AlCl<sub>3</sub> (5.0%). According to the results, it was possible to demonstrate the performance of responses and the satisfactory performance of the method as the requirements in force.

**Keywords:** Spectrophotometry; Flavonoids; Optimization.

## 1. INTRODUÇÃO

*Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm., planta originária da Ásia, pertence à família Zingiberaceae (Maas; Maas, 2015). Além de ornamental é muito utilizada na medicina tradicional e possui efeitos farmacológicos já relatados.

Dentre as atividades farmacológicas comprovadas para a espécie, destacam-se os efeitos hipotensores e diurético obtidos através do chá das folhas, que foram confirmados pelos estudos de Mendonça (1991) e Laranja (1991, 1992). Outras propriedades medicinais, tais como antihistéricas, estomáticas e vermífugas relacionadas às folhas, flores e rizoma foram descritas por Almeida (1993).

Quanto a sua composição química, alguns flavonoides, tais como cardarmomina e alpinetina, já foram identificados em rizomas e sementes da espécie (Krishna, 1973; Itokawa, 1981). Além disso, rutina, isoquercitrina, catequina, epicatequina, campferol, kaempferol-3-*O*-glucoronídeo e campferol-3-*O*-rutinosídeo foram isolados por Mplantinos (1998) em extratos das folhas de *A. zerumbet*.

Apesar do relato desses compostos, é de suma relevância o estudo a cerca de metodologias que quantifiquem os flavonoides, devido ao enriquecimento de atividades biológicas atribuídas a essa classe de metabólitos secundários. Para a espécie, já foi descrita metodologia de quantificação dos flavonoides por cromatografia líquida de alta eficiência (Cardoso *et al.*, 2013), entretanto, o emprego da espectrofotometria UV-Vis para análise de matrizes complexas tem sido bem difundido na literatura e está presente em códigos oficiais devido a simplicidade de execução da técnica e o custo operacional (Fernandes *et al.*, 2012; Matos *et al.*, 2016).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

A droga vegetal foi coletada e identificada no Herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA-PE). Em seguida foi seca em estufa de ar circulante por 3 dias a 40 °C e triturada em moinho de facas. O material foi empregado para a avaliação de método analítico para doseamento de flavonoides.

Para o doseamento de flavonoides totais por Diluição Direta (DD) foi obtida solução extrativa (SE), utilizando 1,0 g de droga e extração sob refluxo com solução hidroalcoólica (40%; v/v), baseando-se no método desenvolvido por Petry e colaboradores (2001), avaliado por Fernandes e colaboradores (2012) e preconizados por compêndios oficiais (Brasil, 2010). Alíquotas da SE foram transferidas para balão volumétrico de 25 mL, adicionados 2 mL de solução etanólica de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>; 5,0%, p/v), e o volume aferido com mesmo solvente.

As condições experimentais do procedimento avaliadas foram: proporção droga:solvente (0,25 – 1,50 g); concentração de solvente, etanol 20-100% (v/v);  $\lambda_{\max}$ ; concentração de cloreto de alumínio (2,5 - 7,5%, p/v); e, cinética reacional (0-60 minutos).

O teor de flavonoides totais foi expresso em gramas de rutina por 1 g de droga seca. Todas as análises foram realizadas em triplicata, e os resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A varredura espectrofotométrica da amostra pelo método de diluição direta, evidenciou o comprimento de onda com absorvância máxima observado no espectro de absorção, após a reação de complexação com solução de AlCl<sub>3</sub>, em 410 nm.

Na avaliação da proporção droga:solvente, melhor condição obtida para o método foi

observada utilizando 0,75 g de droga, com teor de flavonoides totais igual a  $1,12\% \pm 0,0240$  (2,12).

Quanto à avaliação do solvente extrator (Figura 1) utilizando diferentes concentrações de solução hidroalcoólica (20, 40, 60, 80 e 100%, v/v), foi escolhida a de 80% (v/v), que apresentou teor de flavonoides totais igual a  $0,99\% \pm 0,0139$  (1,40), calculados como rotina.

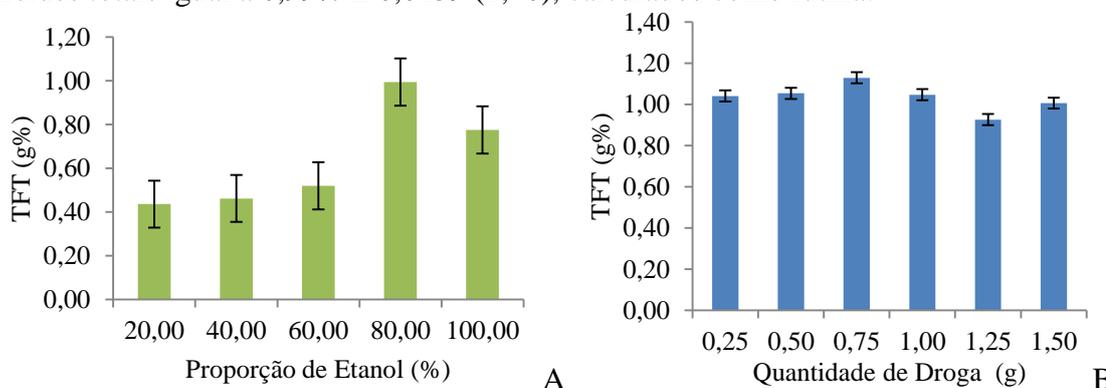


Figura 1 – Teor de flavonoides totais (%g) frente a diferentes proporções de etanol (A) e diferentes quantidades de droga (B).

Quanto ao parâmetro tempo de leitura, verificou-se que a absorvância máxima das amostras permaneceu com menor variação depois de transcorridos 30 minutos da adição de  $\text{AlCl}_3$  utilizando a concentração a 5,0 %.

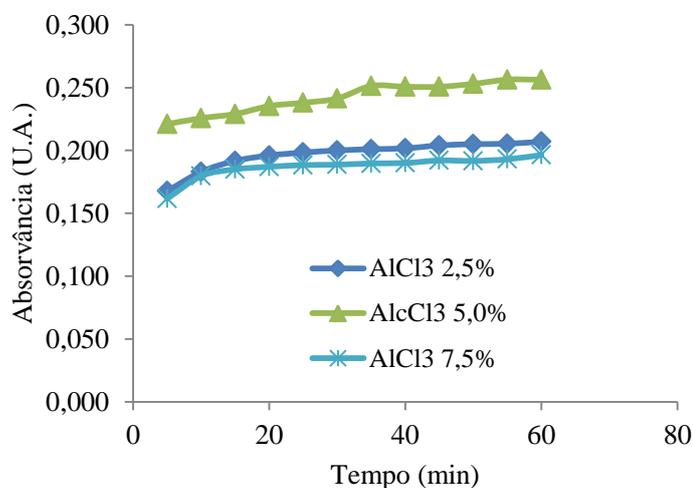


Figura 2 – Cinética de reação de *A. zerumbet* em diferentes concentrações de  $\text{AlCl}_3$ .

## 4. CONCLUSÃO

A análise da quantidade de droga, proporção de etanol, cinética reacional e concentração de  $\text{AlCl}_3$  para quantificação de flavonoides totais nas folhas de *Alpinia zerumbet*, mostrou que quantidade de droga igual a 0,75 g, etanol 80%,  $\text{AlCl}_3$  a 5,0% e tempo reacional de 30 minutos apresentaram as melhores respostas analíticas e foram determinantes para a evolução do trabalho, podendo ser utilizado na rotina laboratorial e controle de qualidade das folhas da espécie.

## 5. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, E.R. Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos. São Paulo: Hemus Editora, 1993. 341p.
- BRASIL. Farmacopeia Brasileira. 5ed. Vol. 2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010.
- CARDOSO, I.; TAPPIN, M.; NAKAMURA, M.; PEREIRA, H; BEHRENS, M. Development of an HPLC method for quality control of *Alpinia zerumbet*. *Planta Med*, v. 79, 2013.
- FERNANDES, A. J. D.; FERREIRA, M. R. A.; RANDAU, K. P.; SOUZA, T. P.; SOARES, L. A. L. Total Flavonoids Content in the Raw Material and Aqueous Extractives from *Bauhinia monandra* Kurz (Caesalpiaceae). *The Scientific World Journal*, v. 2012, 2012.
- ITOKAWA, H.; MORITA, M.; MIHASHI, S. Phenolic compounds from the rhizome of *Alpinia speciosa*. *Phytochemistry*, v. 20, n. 11, p. 2503-2506, 1981.
- KRISHNA, B. M.; CHAGANTY, R. B. Cardarmomin and alpinetin from the seeds of *Alpinia speciosa*. *Phytochemistry*, v. 12, p. 238, 1973.
- LARANJA, S. M. R.; BERGAMASCHI, C. M.; SCHOR, N. Evaluation of acute administration of natural products with potential diuretic effects, in humans. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.86, p.237-240, 1991.
- LARANJA, S. M.R.; BERGAMASCHI, C.M.; SCHOR, N. Avaliação de três plantas com potencial diurético. *Rev Bras Med*, v. 38, n. 1, p.13-16, 1992.
- MAAS, P.; MAAS, H. 2015. Zingiberaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110703>>.
- MATOS, L. L.; FERNANDES, J. M.; FERREIRA, M. R. A.; LANGASSNER, S. M. Z.; SOARES, L. A. L. Evaluation of analytical method by spectrophotometry for quantification of total flavonoids from leaves of *Kalanchoe brasiliensis* Camb. (Crassulaceae). *Boletim Informativo Geum*, v. 7, n. 2, p. 7-15, 2016.
- MENDONÇA, V. L. M. Pharmacological and toxicological evaluation of *Alpinia speciosa*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 86, p.93-97, 1991.
- MPALANTINOS, M. A. Biologically active flavonoids and kavapyrones from the aqueous extract of *Alpinia zerumbet*. *Phytother Res*, v. 12, n. 6, p. 442-4, 1998.
- PETRY, R.D.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; SILVA, W.B. Flavonoid content assay: influence of the reagent concentration and reaction time on the spectrophotometric behavior of the aluminium chloride – flavonoid complex. *Die Pharmazie*, v. 56, n. 6, p. 465-470, 2001.

## 6. AGRADECIMENTOS

Os integrantes agradecem a ANVISA, FACEPE (APQ-0493-4.03/14) e ao CNPq (308386/2015-9).



ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL – PNQM 19

## ANÁLISE HISTOQUÍMICA DA LÂMINA FOLIAR DE *Azadirachta indica* A. Juss.

F. R. SILVA<sup>1</sup>, R. D. SÁ<sup>1,2</sup> e K. P. RANDAU<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Farmacognosia.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica.

E-mail para contato: felipe.ribeiro360@gmail.com

**RESUMO** – *Azadirachta indica* A. Juss., conhecida popularmente no Brasil como Nim, é uma espécie da família Meliaceae de grande importância econômica. É uma planta muito utilizada por apresentar atividade inseticida, além de seu emprego medicinal. Apresenta diversos metabólitos secundários, destacando-se os terpenos. O objetivo do trabalho foi histolocalizar os metabólitos presentes na lâmina foliar de *A. indica*. Seções transversais de lâminas foliares frescas foram submetidas a diferentes reagentes. Foram identificados compostos fenólicos, taninos, triterpenos e esteroides, alcaloides, compostos lipofílicos, lignina, amido e foi demonstrado que os cristais são de oxalato de cálcio. O estudo ampliou o conhecimento dos compostos químicos da espécie e auxilia na sua padronização farmacobotânica.

**Palavras-chave:** Farmacobotânica. Nim. Padronização.

**ABSTRACT** – *Azadirachta indica* A. Juss., popularly known in Brazil as “Nim”, is a species of the family Meliaceae of great economic importance. It is a plant widely used for presenting insecticidal activity, in addition to its medicinal use. It presents several secondary metabolites, highlighting the terpenes. The study aimed the histolocalization of the metabolites in the leaf blade of *A. indica*. Cross-sections of fresh leaf blades were subjected to different reagents. They were identified phenolic compounds, tannins, triterpenes and steroids, alkaloids, lipophilic compounds, lignin, starch and it was demonstrated that the crystals are of calcium oxalate. The study has expanded the knowledge of the chemical compounds of the species and assists in their pharmacobotanical standardization.

**Keywords:** Nim. Pharmacobotany. Standardization.

## 1. INTRODUÇÃO

*Azadirachta indica* A. Juss., internacionalmente conhecida como Neem, é uma árvore de até 20 m de altura, originária da Índia, onde é considerada sagrada. É uma planta de clima tropical e no Brasil passou a ser chamada de Nim (Matos, 2007).

A espécie é considerada economicamente importante e tem sido utilizada por séculos para arborização, como material para construção, combustível, lubrificante, adubo e praguicida, apresentando ação contra mais de 430 espécies de pragas (Martinez, 2002).

É utilizada também como medicinal para o tratamento de gastrite e úlcera gástrica, reumatismo articular, gota, diabetes e malária (Mossini; Kimmelmeier, 2005; Matos, 2007). Nos últimos anos, foi descoberto um grande número de metabólitos secundários na planta com atividade biológica, dentre elas anticâncer, antidiabética, antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, além de efeitos neuroprotetor, hepatoprotetor e imunomodulador (Alzohairy, 2016).

Os metabólitos produzidos pelas plantas medicinais geralmente são encontrados nas secreções de estruturas especializadas, que constituem os sítios de produção e acúmulo destas substâncias. A técnica de histoquímica apresenta valor na localização microquímica dos compostos farmacologicamente ativos e contribui na identificação dos vegetais. Além disso, o reconhecimento da histolocalização nas plantas facilita a investigação fitoquímica, fornecendo subsídio ao manejo e comercialização dos seus produtos (Costa; Proença da Cunha, 2000).

Assim, o objetivo do trabalho foi realizar a caracterização histoquímica da lâmina foliar de *A. indica* através de microscopia óptica de luz.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL VEGETAL

O material vegetal foi coletado na Cidade Universitária em Recife, Pernambuco, Brasil e uma excisata foi depositada no Herbário Dárdano de Andrade Lima, no Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), sob número de tombamento 89652.

### 2.2 HISTOQUÍMICA

Testes histoquímicos foram realizados em secções transversais de lâminas foliares frescas, obtidas à mão livre, usando lâminas de aço e medula do pecíolo de embaúba (*Cecropia* sp.) como material de suporte. Os seguintes reagentes foram utilizados para indicar a presença das substâncias: dicromato de potássio (10%) para compostos fenólicos (Johansen, 1940); vanilina clorídrica para taninos (Mace; Howell, 1974); Sudan III para compostos lipofílicos (Sass, 1951); tricloreto de antimônio para triterpenos e esteroides (Mace *et al.*, 1974); Dragendorff para alcaloides (Brasil, 2010); Lugol para amido (Johansen, 1940); floroglucinol para lignina (Johansen, 1940) e ácido clorídrico (10%) para estabelecer a natureza dos cristais (Jensen, 1962). Controles foram realizados

em paralelo aos testes histoquímicos e lâminas semipermanentes foram preparadas contendo as secções transversais (Johansen, 1940; Sass, 1951). A análise das lâminas histológicas foram conduzidas em imagens em software (*Toup View Image*), obtidas por uma câmera digital acoplada a um microscópio óptico de luz (*Alltion*).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a utilização do dicromato de potássio (10%), os compostos fenólicos foram encontrados no parênquima da nervura central, no mesófilo e nas células epidérmicas. Nesses mesmos locais também foi evidenciada a presença de taninos com a vanilina clorídrica, o que indica que esses metabólitos são a maior parte dos compostos fenólicos presentes na lâmina foliar de *A. indica*.

O Sudan III demonstrou a presença de compostos lipofílicos na cutícula e em algumas células do parênquima esponjoso. Triterpenos e esteroides foram visualizados no parênquima e colênquima da nervura central e nas células epidérmicas. No parênquima da nervura central também foram visualizados alcaloides. Grãos de amido foram observados com o uso do Lugol nas células parenquimáticas próximas ao feixe vascular central. A lignina presente no xilema foi evidenciada com o uso do floroglucinol. O ácido clorídrico (10%) confirmou que os cristais são de oxalato de cálcio, após a dissolução dos mesmos.

Estudos fitoquímicos caracterizaram a presença de alcaloides, compostos fenólicos, taninos, triterpenos e esteroides nas folhas de *A. indica* (Biu et al., 2009; Raphael, 2012; Pandey et al., 2014; Cristo et al., 2016).

Dentre as substâncias já identificadas encontra-se azadiractina, nimbolídeo,  $\beta$ -sitosterol, lupeol, rutina, catequina, quercetina, quercetrina, ácido elágico, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido clorogênico, luteolina, canferol e cumarina (Matos, 2007; Pandey et al., 2014; Cristo et al., 2016; Wang et al., 2016). Algumas destas substâncias estão relacionadas a atividades biológicas, como o nimbolídeo, que possui atividade anticâncer (Wang et al., 2016), e a azadiractina, que apresenta atividade inseticida (Matos, 2007).

Com relação aos compostos lipofílicos corados com o Sudan III, presentes em células do parênquima esponjoso, Jafari et al. (2013) afirmam que esses compostos são óleos essenciais ou resinas. Os autores ainda mostraram que a identificação dessas células de conteúdo lipofílico serve para diferenciar *A. indica* de *Melia azedarach* L., outra espécie da família Meliaceae, uma vez que nesta última espécie não se observa a presença dessas células.

De acordo com Metcalfe e Chalk (1950), a natureza e o formato dos cristais em Meliaceae são fatores úteis para a diagnose das espécies da família. El-Hawary et al. (2013) e Jafari et al. (2013) também demonstraram que os cristais presentes na lâmina foliar de *A. indica* são de oxalato de cálcio.

### 4. CONCLUSÃO

O trabalho forneceu informações sobre os componentes químicos da lâmina foliar de *A. indica*,



mostrando sua histolocalização e contribuindo com a padronização farmacobotânica da espécie.

## 5. REFERÊNCIAS

- ALZOHAIRY, M. A. Therapeutics role of *Azadirachta indica* (Neem) and their active constituents in diseases prevention and treatment. *J. Evid. Based Complementary Altern. Med.*, v. 2016, 2016.
- BIU, A. A.; YUSUFU, S. D.; RABO, J. S. Phytochemical screening of *Azadirachta indica* (Neem) (Meliaceae) in Maiduguri, Nigeria. *Biosci. Res. Commun.*, v. 21, p. 281-283, 2009.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopeia Brasileira*. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010.
- JOHANSEN, D. A. *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc., 1940.
- MARTINEZ, S. S. O *Nim - Azadirachta indica* natureza, usos múltiplos, produção. Londrina: IAPAR, 2002.
- MATOS, F. J. A. *Plantas medicinais – guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil*. 3. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2007.
- METCALFE, C. R.; CHALK, L. *Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses*. Oxford: Clarendon Press, 1950.
- MOSSINI, S. A. G.; KEMMELMEIER, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): múltiplos usos. *Acta Farm. Bonaerense*, v. 24, p. 139-148, 2005.
- PANDEY, G.; VERMA, K. K.; SINGH, M. Evaluation of phytochemical, antibacterial and free radical scavenging properties of *Azadirachta indica* (neem) leaves. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, v. 6, p. 444-447, 2014.
- RAPHAEL, E. Phytochemical constituents of some leaves extract of *Aloe vera* and *Azadirachta indica* plant species. *Glo. Adv. Res. J. Environ. Sci. Toxicol.*, v. 1, p. 14-17, 2012.

## 6. AGRADECIMENTOS

Universidade Federal de Pernambuco.



ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL – PNQM 20

## EFEITO CITOTÓXICO E ANTITUMORAL DO EXTRATO METANÓLICO DE *Annona vepretorum* Mart. (ANNONACEAE)

M. G. e SILVA<sup>1</sup>, E. M. de LAVOR<sup>1</sup>, C. do Ó. PESSOA<sup>3</sup>, M. C. dos S. LUCIANO<sup>3</sup>, M. F. S. SILVA<sup>3</sup>,  
R. L. MENDES<sup>2</sup>, J. R. G. da S. ALMEIDA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Vale do São Francisco, Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Medicinais

<sup>2</sup> Universidade Federal do Vale do São Francisco, Colegiado de Farmácia

<sup>3</sup> Universidade Federal do Ceará, Laboratório Nacional de Oncologia Experimental  
E-mail para contato: marianagama91@hotmail.com

**RESUMO** – *O estudo teve como objetivo avaliar a atividade citotóxica e antitumoral do extrato metanólico das folhas de A. vepretorum (Av-MeOH). Os testes de citotoxicidade foram realizados frente as linhagens celulares HCT-116, SF-295, HL-60, L929 e sarcoma-180, por meio dos ensaios do MTT e MTS. No teste in vivo foi induzido o tumor sólido do sarcoma-180 nos camundongos e após 7 dias de tratamento com o extrato os tumores foram pesados para o cálculo da porcentagem de crescimento tumoral. Os resultados do ensaio in vitro indicam que o Av-MeOH apresenta um elevado potencial citotóxico frente a três linhagens tumorais avaliadas. No teste in vivo, o extrato foi capaz de inibir o crescimento tumoral em 27,97%, 2,8% e 31,41% nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg, respectivamente. Conclui-se que o Av-MeOH apresentou elevado potencial citotóxico in vitro e atividade antitumoral in vivo no modelo do sarcoma-180.*

*Palavras chave: Produtos naturais, Câncer, Sarcoma-180*

**ABSTRACT** - *The aim of this study was to evaluate the cytotoxic and antitumor activity of the methanolic extract of A. vepretorum (Av-MeOH) leaves. Cytotoxicity tests were performed against the cell lines HCT-116, SF-295, HL-60, L929 and sarcoma-180, by MTT and MTS assays. In the in vivo test the solid tumor of sarcoma-180 was induced in the mice and after 7 days of treatment with the extract the tumors were weighed for the calculation of the percentage of tumor growth. In vitro assay results indicate that Av-MeOH has a high cytotoxic potential against three tumor lines evaluated. In the in vivo test, the extract was able to inhibit tumor growth in 27.97%, 2.8% and 31.41% at doses of 25, 50 and 100 mg/kg, respectively. It is concluded that Av-MeOH has a high in vitro cytotoxic potential and in vivo antitumor activity in the sarcoma-180 model.*

*Keywords: Natural products, Cancer, Sarcoma-180*

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer pode ser entendido como um conjunto de mais de cem doenças que possuem em comum o crescimento autônomo de células com capacidade de invasão e metástase (Hanahan; Weinberg, 2000). O tratamento do câncer baseia-se na ressecção cirúrgica do tumor, quimioterapia e radioterapia (Costa-Lotufo *et al.*, 2010). Entretanto, a maioria dos agentes antineoplásicos apresentam efeitos tóxicos, o que limita a sua utilização (Khazir *et al.*, 2014). Nesse sentido, os produtos naturais possuem grande importância, tendo em vista que cerca de 60% dos fármacos utilizados na prática clínica como agentes antitumorais foram obtidos a partir de fontes naturais (Cragg; Newman, 2005). Especial atenção vem sendo voltada para o estudo de espécies vegetais com uso tradicional na região Nordeste do país, cujo bioma Caatinga é seu principal ecossistema. A espécie *Annona vepretorum* Mart., pertencente à família Annonaceae e ao gênero *Annona*, pode ser encontrada no bioma Caatinga e estudos têm demonstrado a presença de diversos constituintes químicos com potencial farmacológico nessa planta (Almeida *et al.*, 2014). Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade citotóxica e antitumoral do extrato metanólico das folhas de *A. vepretorum*.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Coleta do material vegetal e obtenção do extrato

As folhas de *A. vepretorum* foram coletadas em Petrolina-PE, Brasil. O material vegetal foi seco em estufa com circulação de ar (40 °C) durante 72 horas, pulverizado em moinho de facas e submetido a maceração exaustiva com hexano e em seguida com metanol. As soluções extrativas foram filtradas e concentradas em rotaevaporador (40 °C). O extrato metanólico das folhas de *A. vepretorum* (Av-MeOH) foi utilizado para os testes farmacológicos.

### 2.2 Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade do Av-MeOH foi avaliada frente às células tumorais humanas HCT-116 (colorretal) SF-295 (glioblastoma) e HL-60 (leucemia) e na linhagem não tumoral L929 (fibroblasto murino) por meio do ensaio de redução do sal tetrazólio brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT). As células foram plaqueadas em placa de 96 poços e incubadas com Av-MeOH (50 µg/mL) durante 72 horas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Após esse tempo, as placas foram centrifugadas e o sobrenadante removido. Em seguida, adicionou-se 150 µL de MTT e as placas foram incubadas por 3 horas. Após a incubação as placas foram centrifugadas, os cristais de formazan solubilizados em DMSO e a absorbância determinada a 595 nm em espectrofotômetro. Para a avaliação da citotoxicidade no sarcoma-180 foi utilizando o ensaio de redução do sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-fenil carboximetil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio (MTS). Células do sarcoma-180 mantidas *in vivo* foram coletadas, plaqueadas em placa de 96 poços e incubadas em estufa a 37 °C durante 4 horas. Após esse tempo, adicionou-se o Av-MeOH (50 µg/mL). Após 24 horas de tratamento, 20 µL de MTS foi adicionado nos poços e 3 horas depois a absorbância foi lida a 492 nm em espectrofotômetro. Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão da média (SD).

### 2.3 Atividade antitumoral *in vivo*

A suspensão celular do sarcoma-180 foi aspirada da cavidade peritoneal de camundongo portador de tumor ascítico e  $5 \times 10^6$  células/100  $\mu\text{L}$  foram inoculadas por via subcutânea na região dorsal dos camundongos swiss. Sete dias após a indução tumoral iniciou-se o tratamento com o Av-MeOH (25, 50 e 100 mg/kg) por via oral (gavagem) e com metotrexato (MTX) (1,5 mg/kg, via intraperitoneal). O grupo controle negativo recebeu apenas o veículo (solução fisiológica + Tween 80 1%) por via oral. Após sete dias de tratamento, os animais foram eutanasiados e os tumores foram retirados e pesados para cálculo da porcentagem de crescimento tumoral. A análise estatística foi realizada no GraphPad Prism 6, utilizando-se o teste t de Student e apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m). Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ . Todos os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UNIVASF) sob o número 0018/140415.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do ensaio de citotoxicidade demonstraram que o Av-MeOH apresenta um elevado potencial citotóxico frente às linhagens tumorais HCT-116 e HL-60 e sarcoma-180, e atividade moderada frente as células SF-295, conforme apresentado na Tabela 1. Pode-se perceber também que Av-MeOH apresentou percentual de 20,58% de inibição de crescimento celular não tumoral, mostrando seletividade.

Tabela 1 – Inibição da proliferação celular (%) após o tratamento com o Av-MeOH

Extrato	Inibição da proliferação celular (%)				
	HCT-116	SF-295	HL-60	Sarcoma-180	L929
Av-MeOH	98,16 $\pm$ 0,92	63,98 $\pm$ 3,40	82,23 $\pm$ 4,84	82,34 $\pm$ 1,36	20,58 $\pm$ 1,35

Na atividade antitumoral *in vivo* do Av-MeOH, observou-se que o extrato foi capaz de diminuir o crescimento tumoral em relação ao controle negativo. Os percentuais de inibição do crescimento tumoral foram de 27,97 %, 2,8 % e 31,41 % nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg, respectivamente. No controle positivo houve inibição estatisticamente significativa do crescimento tumoral (50,19 %) quando comparado ao controle negativo e ao grupo tratado com a dose de 50 mg/kg do Av-MeOH. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com as doses de 25 e 100 mg/kg e o grupo tratado com MTX, como pode ser observado na Figura 1.

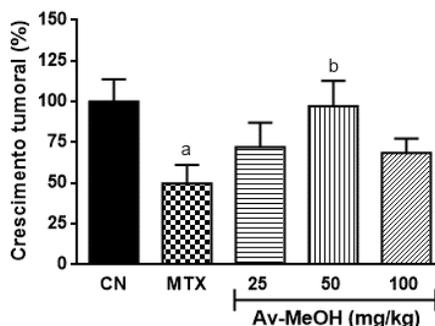


Figura 1 - Percentual de crescimento tumoral do grupo controle negativo (CN), controle positivo (MTX) e grupos tratados com Av-MeOH (25, 50 e 100 mg/kg). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=6). <sup>a</sup>p<0,05 comparado com o CN e <sup>b</sup>p<0,05 comparado com o MTX

#### 4. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o Av-MeOH apresentou elevado potencial citotóxico diante de três das linhagens tumorais avaliadas *in vitro* e atividade antitumoral *in vivo* no modelo experimental de tumor sólido do sarcoma-180, principalmente na dose de 100 mg/kg de extrato.

#### 5. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J. R. G. S.; ARAÚJO, C. S.; PESSOA, C. O.; COSTA, M. P.; PACHECO, A. G. M. Atividade antioxidante, citotóxica e antimicrobiana de *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). *Rev. Bras. Frut.*, v. 36, p. 258-264, 2014.
- COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S.V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. *Rev. Virt. Quím.*, v. 2, n.1, p. 47-58, 2010.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as source of anticancer agents. *J. Ethnopharmacol.*, v. 100, p. 72-79, 2005
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, v. 100, p. 57-70, 2000.
- KHAZIR, J.; RILEY, D. L.; PILCHER, L. A.; DE-MAAYER, P.; MIR, B. A. Anticancer Agents from Diverse Natural Sources. *Nat. Prod. Comm.*, v. 9, n. 11, p. 1655-1669, 2014.

#### 6. AGRADECIMENTOS

CNPq, CAPES e UNIVASF.



ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL – PNQM 21

## USO, DIVERSIDADE E POSSÍVEIS EFEITOS DE EXTRATOS VEGETAIS COMERCIALIZADOS EM UMA FEIRA LIVRE NA CIDADE DE SERRA TALHADA – PE: UM ESTUDO DESCRITIVO

J. S. SIQUEIRA<sup>1</sup>, L. R. D. FERREIRA<sup>1</sup>, J.L.Q. SILVA-FILHO<sup>1,2</sup>, D. C. A. BATISTA<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Integração do Sertão,

<sup>2</sup> Laboratório de Imunopatologia Kaizo Asami-LIKA/UFPE

<sup>3</sup> Centro Universitário Maurício de Nassau

E-mail para contato: [jessica.ssiqueira@hotmail.com](mailto:jessica.ssiqueira@hotmail.com)

**RESUMO:** *O objetivo do trabalho foi realizar levantamento das plantas medicinais, bem como o uso terapêutico desses extratos que compõem as garrafadas comercializadas em uma feira livre na cidade de Serra Talhada-PE. A coleta de dados foi realizada por meio de uma entrevista, com o a finalidade de conhecer as indicações dessas plantas medicinais frente determinadas patologias, confrontando os dados colhidos com as possíveis atividades farmacológicas, interações e toxicidade encontrada na literatura científica especializada. Os raizeiros citaram 32 plantas, utilizadas pela população como medicinais. As mesmas são utilizadas principalmente para: afecções do aparelho urinário e respiratório, ansiedade, cefaleia, cicatrização, diabetes, dores estomacais, hemorroidas, inflamações, doenças do fígado e câncer. Na maioria das vezes, as indicações foram coincidentes com os registros da literatura, contudo, *Cnidocolus quercifolius*; *Baccharis trimera*; *Luffa operculata*; *Mentha sp.* e *Stryphnodendron adstringens* apresentaram atividades: depressora do sistema respiratório; abortiva; citotóxica e teratogênica. Diante disso, sabe-se que o conhecimento insuficiente sobre as plantas comercializadas, a falta de controle de qualidade do material vegetal e o uso de misturas de plantas sem considerar as suas interações, são fatores que podem representar riscos para os consumidores dessas preparações.*

**Palavras-chave:** *Plantas medicinais, Garrafadas, Toxicidade*

**ABSTRACT** - *The objective of this study was to carry out a mapping of medicinal plants, analysing them like a therapeutic use of these extracts that make up the potions sold in a street market in the city of Serra Talhada-PE. The data collection was performed by interviews with the purpose of knowing the signs of these medicinal plants face certain conditions. Soon, we compared the data collected with the possible pharmacological activities, interactions and toxicity found in specialized scientific literature. The herb doctors cited 32 plants used by the population as medicinal. They*



*are used mainly for: diseases of the urinary and respiratory system, anxiety, headache, healing, diabetes, stomach pains, hemorrhoids, inflammation, liver disease and cancer. Most of the time, the signs coincided with literature records, however, Cnidocolus quercifolius; Baccharis trimera; Luffa operculata; Mentha sp. and Stryphnodendron adstringens presented activities: depressor respiratory system; abortifacient; cytotoxic and teratogenic; Before that, it is known that insufficient knowledge of the marketed plants, lack of quality control of plant material and the use of plant mixtures without considering their interactions, are factors that can pose risks to consumers of these preparations.*

*Keywords: Medicinal herbs, Garrafadas, Toxicity*

## 1. INTRODUÇÃO

Estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) relatam que 80% da população dos países em desenvolvimento fazem uso de algum tipo de medicina tradicional para cuidados básicos da saúde. Dentre as várias formas de medicina tradicional, destaca-se o uso de plantas medicinais. Neste contexto, os raizeiros configuram destaque. Pois são responsáveis pela produção de “garrafadas”. Pesquisas realizadas com plantas medicinais envolvem investigações farmacológicas de extratos, constituintes químicos isolados e necessitam da medicina tradicional e popular. A integração dessas áreas na pesquisa conduz a um caminho promissor para descoberta de novos fármacos (Maciel *et al*, 2002). Contudo, é importante ressaltar fatores que podem representar riscos para os consumidores dessas preparações populares: conhecimento insuficiente sobre as plantas comercializadas; falta de controle de qualidade do material vegetal e o uso de misturas de plantas sem considerar as suas interações. Assim o objetivo deste trabalho foi realizar um levantamento das plantas medicinais, bem como o uso terapêutico desses extratos que compõem as garrafadas comercializadas em uma feira livre na cidade de Serra Talhada-PE.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo descritivo de caráter exploratório do tipo transversal. A coleta de dados foi realizada por meio de uma entrevista com três feirantes, com o a finalidade de conhecer as possíveis indicações dessas plantas medicinais frente a determinadas patologias. Posteriormente, foi realizado um rastreamento na literatura científica especializada, confrontando os dados colhidos referentes às possíveis atividades farmacológicas, toxicidade e interações desses princípios ativos.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os raizeiros citaram 32 plantas conhecidas pelos nomes vulgares e utilizadas pela população como medicinais: alecrim de serrote, ameixa, amora miura, anis estrelado, aroeira, babosa, balsamo, barbatimão, batata de purga, cabacinha, caroço de imburana, carqueja, espinheira santa, eucalipto, favela, folha de abacate, gengibre, girassol, guaxumba, hortelã, imbiriba, jatobá, mostarda, mulungu,

none, noz moscada, pepaçonha, pega pinto, quina, quixabeira, romã, unha de gato e urtiga. Segundo relatos dos herbolários essas plantas são utilizadas principalmente para tratamento de afecções do aparelho urinário e respiratório, ansiedade, cefaleia, cicatrização, diabetes, dores estomacais, hemorroidas, inflamações e doenças hepáticas. Contudo, 6 espécies se destacaram por apresentar atividade diferente daquelas indicadas pelos raizeiros com relação a literatura científica especializada, além de possíveis interações e efeitos indesejados. Os resultados podem ser encontrados na Tabela 1.

O uso das preparações reforça a preocupação dos efeitos indesejados dos extratos. Nesta perspectiva é importante ressaltar os fatores que possam propiciar riscos aos consumidores como: (1), conhecimento insuficiente sobre as plantas. Por exemplo: a favela, *Cnidocolus phyllacanthus*, é uma planta cianogênica que causa intoxicação após a ingestão da planta fresca. Os sinais clínicos de intoxicação observados em animais são taquicardia, taquipnéia, dispnéia, opitóstono, decúbito externo abdominal seguido de decúbito lateral (Oliveira, *et al* 2008). Segundo Araujo, *et al* (2016), a carqueja, *Baccharis trimera*, assim como a cabacinha, *Luffa operculata*, apresentam ação abortiva devido a suas propriedades uterotônicas e hemorrágicas. A hortelã, *Mentha*, apresenta atividade teratogênica e citotóxica (Costa *et al*, 2013). No estudo de Vilar *et al* (2010), observou-se que o barbatimão, *Stryphnodendron adstringens*, apresentou atividade citotóxica em todos os sistemas testados, provocando na maioria dos casos dificuldade para respirar e falar. (2), falta de controle de qualidade do material vegetal. Foi observado que alguns vegetais apresentavam sinais de degradação ou encontravam-se contaminados por fungos e mesmo assim eram comercializados. Sabe-se que a ingestão desses materiais contaminados pode ocasionar intoxicações agudas ou crônicas. (3), o uso de misturas de plantas sem considerar as suas interações. O mulungu, *Erythrina verna*, apresenta comprovados efeitos sedativos, podendo causar entorpecimento e bradicardia (Gomes *et al*, 2008). Esse efeito pode ser potencializado se usado concomitantemente a medicamentos hipotensores. Outro ponto característico dessas preparações foi à utilização de várias plantas em uma mesma solução. Eldin e Dunford (2001), afirmam que a forma de utilização é importante, não somente para garantia de presença do princípio ativo, mas também para a certificação de baixa toxicidade.

**Tabela 1.** Lista das espécies medicinais encontradas nas feiras livres dos municípios de Serra Talhada – PE, com respectivos táxons, nome vulgar, uso medicinal, indicação popular e parte utilizada.

NOME POPULAR	NOME CIENTÍFICO	INDICAÇÃO POPULAR	INDICAÇÃO CIENTÍFICA	PARTE INDICADA	REFERÊNCIAS
Barbatimão	<i>Stryphnodendron adstringens</i>	Antiinflamatório, antisséptico	Antimicrobiano	Casca, raízes e folhas	Queiroz et al., 2002; Cur 2006
Cabacinha	<i>Luffa operculata</i>	Sinusite, uretrites, aborti	Antimicrobiana, antineoplásicos.	Fruto	Brock, Duarte, Nakashii 2003.
Carqueja	<i>Krameria tomentosa</i>	Esteatose hepática	Eupéptica, diurética, hepatoprotetora	Casca	Lorenzi; Mattos, 2008.
Favela	<i>Cnidocolus quercifolius</i>	Intestino e fígado	Infecções (atividade citotóxica)	Casca e entre casca	França et al., 2008.
Mulungu	<i>Erythrina verna</i>	Nervos, insônia, depress	Efeito sedativo	Folha	Gomes et al, 2008
Hortelã	<i>Mentha</i>	Cefaleia, sinusite.	Vermífugo (Ascaris) e expectorante	Folhas	Alonso, 2008.



## 4. CONCLUSÃO

Diante do exposto, percebe-se que os riscos relacionados ao uso de plantas medicinais configuram uma realidade rotineira. Deste modo, são necessários maiores estudos a fim de explorar os potenciais terapêuticos, verificar a toxicidade e possíveis riscos relacionados à utilização das plantas medicinais pela população, notadamente a utilização de “garrafadas”. Verifica-se também a necessidade da implantação de políticas de fitofarmacovigilância eficientes, a fim de tornar seu consumo mais racional e, deste modo, minimizar os riscos à população usuária.

## 5. REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, C.R.F *et al.* Use of Medicinal Plants with Teratogenic and Abortive Effects by Pregnant Women in a City in Northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia/RBGO Gynecology and Obstetrics*, v. 38, p. 127-131, 2016.
- BROCK, A.C.K.; DUARTE, M. R.; NAKASHIMA, Tomoe. Estudo morfo-anatômico e abordagem fitoquímica de frutos e sementes de *Luffa operculata* (L.) Cogn., Cucurbitaceae. *Visão Acadêmica*, v. 4, 2003.
- COSTA, K.C.S *et al.* Medicinal plants with teratogenic potential: current considerations. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 48, p. 427-433, 2012.
- FRANÇA, I.S.X *et al.* Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. *Revista brasileira de enfermagem*, v. 61, p. 201-208, 2008.
- GOMES, E.C *et al.* Plantas da caatinga de uso terapêutico: levantamento etnobotânico. *Engenharia Ambiental: Pesquisa e Tecnologia*, v. 5, 2008.
- MACIEL, M.A.M *et al.* Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química nova*, v. 25, p. 429-438, 2002.
- OLIVEIRA, D.M. *et al.* Intoxicação por *Cnidocolus phyllacanthus* (Euphorbiaceae) em caprinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 28, p. 36-42, 2008.

## 6. AGRADECIMENTOS

Aos raizeiros da feira livre da cidade de Serra Talhada-PE que contribuíram sobre maneira com os resultados deste estudo.



ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL – PNQM 23

## OTIMIZAÇÃO DE CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E EXTRATIVAS PARA DOSEAMENTO DE CUMARINA EM *Justicia pectoralis* Jacq POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

I.C.F. BEZERRA<sup>1,2</sup>, M.R.A. FERREIRA<sup>1,2</sup>, L.A.L. SOARES<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco

<sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco

E-mail para contato: isabelle.ferraz@outlook.com

**RESUMO** - *Justicia pectoralis* Jacq. (Achantaceae), conhecida popularmente como chambá, é uma espécie nativa brasileira com aplicação na medicina popular principalmente no tratamento de doenças respiratórias, como asma e bronquite. Estas atividades têm sido correlacionadas com a presença de cumarina, cuja concentração é elevada na espécie. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar condições extrativas e cromatográficas para quantificação de cumarina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD). O método cromatográfico desenvolvido apresentou simplicidade e possibilitou a detecção de cumarina após 17,7 minutos, em 270 nm. As melhores condições extrativas foram solução etanólica a 40% e 0,5g de droga, onde nestas condições foram obtidas as melhores respostas analíticas.  
**Palavras Chave:** Chambá. CLAE-DAD. Cumarinas. Quantificação.

**ABSTRACT** - *Justicia pectoralis* Jacq. (Achantaceae), popularly known as Chambá, is a Brazilian native specie with application in folk medicine, especially in the treatment of respiratory diseases, such as asthma and bronchitis. These activities have been associated with the presence of coumarins, which shows high concentration in the species. In this context, the objective of this study was to evaluate the chromatographic and extractive conditions for HPLC-DAD determination of coumarin. The chromatographic method developed presented simplicity and enables the detection of coumarin after 17.7 minutes, at 270 nm. The best extractive conditions were ethanol solution to 40% and 0.5 g of the drug, which in these conditions the best analytical results were obtained.  
**Keywords:** Chambá. Coumarin. HPLC-DAD. Quantification

## 1. INTRODUÇÃO

*Justicia pectoralis* Jacq (Achantaceae), popularmente conhecida como chambá, é uma espécie bastante utilizada na medicina popular por apresentar atividades farmacológicas atribuídas aos seus constituintes químicos. Dentre os constituintes relatados para a espécie estão os flavonoides, terpenos, esteroides e cumarinas (Fonseca *et al.*, 2010). Entretanto, as cumarinas são os constituintes de maior importância na espécie, em razão da elevada concentração e da relação com as atividades no trato respiratório atribuídas ao chambá. Por isto, o Ministério da Saúde (2009) incluiu a espécie na relação de plantas medicinais de interesse ao SUS, com o objetivo de fomentar estudos que possibilitem a aplicação segura da espécie na atenção básica. *J. pectoralis* tem sido alvo de diferentes estudos, os quais reportaram diversas atividades: antioxidante e anticonvulsivante (Santos *et al.*, 2014), ansiolítica (Venâncio *et al.*, 2011), estrogênica e inibidor de COX-2 (para tratamento de dismenorreias e menopausa) (Locklear *et al.*, 2010), mas a atividade broncodilatadora ainda é a de maior relevância (Leal *et al.*, 2000)

Embora o doseamento de cumarinas pode ser realizado por metodologias clássicas tal como titulação, a complexidade operacional e baixa performance analítica são obstáculos a sua aplicação. Assim, atualmente, a quantificação de cumarinas é realizada majoritariamente por técnicas cromatográficas como CLAE ou CG (Fonseca *et al.*, 2010). Considerando a versatilidade de CLAE, a técnica tem sido mais promissora para a quantificação de cumarinas, pois permite a análise e quantificação simultânea de outros componentes presentes na matriz e que não são necessária voláteis (Prathap *et al.*, 2013).

Diante do exposto, o propósito desse trabalho foi avaliar e otimizar as condições experimentais para a determinação de cumarina por CLAE-DAD nas folhas de *Justicia pectoralis* Jacq.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Avaliação das condições de preparação da amostra

O material vegetal coletado em Recife foi submetido a secagem em estufa por 7 dias a 40 °C e posteriormente triturado em moinho de facas. As amostras foram preparadas por refluxo (85 °C) durante 30 minutos, e avaliando diferentes proporções de EtOH (40, 60 ou 80%; v/v) e diferentes quantidades de droga (0,50, 0,75 e 1,00 g). Após resfriamento, cada solução foi filtrada para balão volumétrico de 100 mL e o volume ajustado com a solução hidroalcoólica (SA).

### 2.2 Preparação das soluções de análise (amostra e padrão)

A solução amostra para análise foi preparada por diluições da solução SA para balão de 25 mL, e o volume ajustado com água ultrapura. A solução estoque do padrão foi obtida a partir da dissolução de 25 mg de cumarina em balão volumétrico de 50 mL com EtOH 40% (v/v). Alíquotas da solução estoque foram transferidas para balão volumétrico de 10 mL e o volume ajustado com água ultrapura. As soluções obtidas foram filtradas individualmente diretamente para os vials, utilizando membranas de PVDF (0,45 µm), e em seguida analisadas por CLAE.

### 2.3 Condições Cromatográficas

As análises foram conduzidas em cromatógrafo líquido equipado com detector de arranjo de fotodiodos (DAD), degaseificador e sistema de injeção automática. As condições cromatográficas foram otimizadas por meio de modificações em alguns parâmetros: tamanho de coluna, composição

de fase móvel (água, metanol, acetonitrila), agente acidificante (ácido fosfórico, ácido acético ou ácido trifluoroacético) e fluxo (0,5-1,2 mL/min). O comprimento de onda para detecção foi determinado após varredura na faixa de 190 a 400 nm.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Avaliação das condições cromatográficas e extrativas

A metodologia foi considerada otimizada após a obtenção de picos completamente separados (simetria e resolução). As condições estabelecidas para a análise foram: coluna C<sub>18</sub> (250 mm); pré-coluna (C18); água purificada (Fase A) e metanol (Fase B) acidificados com THF (0,05%); e, fluxo de fase móvel de 0,8 mL/minuto. O método foi conduzido de acordo com a seguinte gradiente: 0–4 min, 20–25% B; 4–8 min, 25–40% B; 8–23 min, 40–75% B; 23–26 min, 75% B; 26–27 min, 75–20% B. Assim, o pico correspondente a cumarina foi separado e detectado com tempo de retenção médio de 17,7 minutos; cuja identificação foi confirmada pela comparação dos tempos de retenção e espectros de varredura do pico do padrão, além da observação de aumento de áreas de pico após fortificação da amostra com o padrão de cumarina. As condições eleitas permitem a separação e quantificação da cumarina de forma simples e rápida, empregando fase móvel de baixo custo (metanol e água), quando comparados com as metodologias descritas na literatura (Fonseca, 2009).

Considerando a preparação da amostra, o aumento da proporção de EtOH levou a redução significativa no rendimento de cumarina ( $\alpha = 0,05$ ). De modo que maior teor extração do marcador foi alcançada como EtOH 40%, cerca de 1,44 g% de cumarina (Figura 1A).

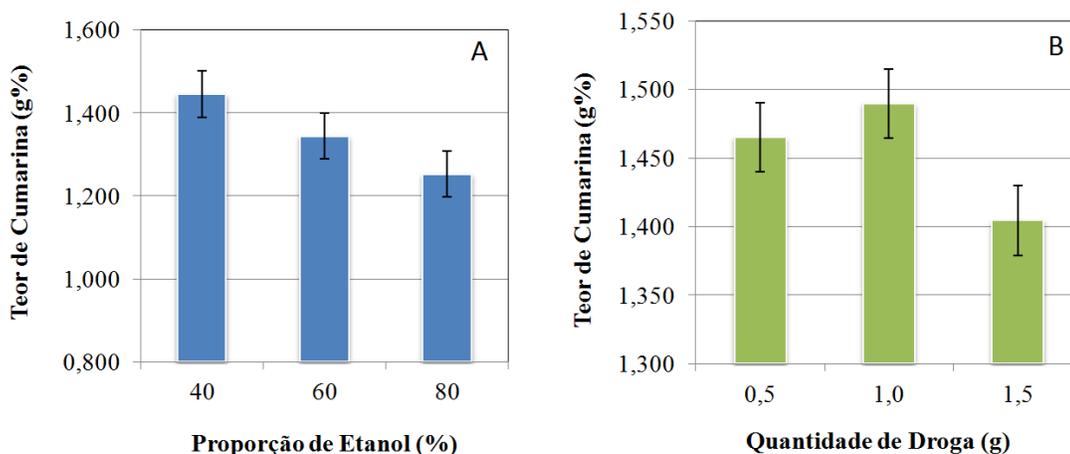


Figura 1 – Influências da proporção de etanol (A) e da quantidade de droga (B) sobre o teor de cumarina por CLAE-DAD (%; m/m).



Em relação à quantidade de droga, o método apresentou mesma performance para as amostra com massa de até 1,0g (Figura 1B). Redução significativa no rendimento de cumarina só foi observada quando uma amostra de 1,5g de droga foi testada. Comportamento decorrente de provável saturação do meio extrativo.

## 4. CONCLUSÃO

A metodologia desenvolvida por CLAE-DAD para quantificação de cumarina nas folhas de *Justicia pectoralis*, apresentou maior simplicidade de execução e menor custo operacional quando comparada com outras metodologias presentes na literatura. A avaliação das condições de preparação de amostras evidenciou que as melhores condições foram alcançadas com EtOH 40% (v/v) e 0,5g de droga. Para garantir a confiabilidade da metodologia analítica ainda, o procedimento ainda será devidamente validado o que assegurará sua aplicação ao CQ de folhas de *J. pectoralis*.

## 5. REFERÊNCIAS

- BRASIL, MS - Ministério da Saúde. *Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS*. Brasília, 2009.
- FONSECA, F N.; SILVA, A H; LEAL, L K. *Justicia pectoralis* Jacq., Acanthaceae: preparation and characterization of the plant drug including chromatographic analysis by HPLC-PDA. *Rev Bras Farmacogn* , v. 20, n. 6, p. 871-877, 2010.
- LEAL, L.K.A.M.; FERREIRA, A.A.G.; BEZERRA, G.A.; MATOS, F.J.A.; VIANA, G.S.B. anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. *J Ethnopharmacol*. v.7, p. 151–159, 2000.
- LOCKLEAR, T. D.; HUANG, Y.; FRASOR, J.; DOYLE, B. J.; PEREZ, A.; GOMEZ-LAURITO, J.; MAHADY, G. B. Estrogenic and progestagenic effects of extracts of *Justicia pectoralis* Jacq., an herbal medicine from Costa Rica used for the treatment of menopause and PMS. *Maturitas*, v. 66, n. 3, p. 315-322, 2010.
- SANTOS, M. A.; VENÂNCIO, E. T.; SILVA, A. H.; LEAL, L. K. A. M.; FONTELES, M. M. F.; VASCONCELOS, S. M. M. Evaluation of anticonvulsant and antioxidant effects of standardized extract of *Justicia pectoralis* (chambá) in the electroshock model in mice. *Epilepsy & Behavior*, v. 38, p. 209-210, 2014.
- VENÂNCIO, E. T.; ROCHA, N. F. M.; RIOS, E. R. V.; FEITOSA, M. L.; LINHARES, M. I.; MELO, F. H. C.; FONTELES, M. M. F. Anxiolytic- like effects of standardized extract of *Justicia pectoralis* (SEJP) in mice: Involvement of GABA/benzodiazepine in receptor. *Phytother Res*, v. 25(3), p.444-450, 2011.

## 6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FACEPE (IBPG-0864-4.04/13; APQ-0493-4.03/14), ao CNPq (308386/2015-9) e a ANVISA/MS (TC03/2010), pelo o apoio na forma de financiamento e de bolsas.

# SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO DERIVADO HIDANTOINICO MG-1/LPSF ATRAVÉS DA TÉCNICA DE GC-MS

T. L. SILVA<sup>1</sup>, S. S. BARBOZA<sup>1</sup>, I. R. PITTA<sup>1</sup>, M. R. GALDINO-PITTA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino, Universidade Federal de Pernambuco.

E-mail para contato: limatacylla@gmail.com

*RESUMO – Os fármacos utilizados atualmente no tratamento do câncer apresentam uma alta toxicidade e possuem fortes efeitos colaterais para os pacientes, desta forma, muitas substâncias estão sendo sintetizadas a partir de derivações de anéis heterocíclicos, dentre eles, os derivados hidantoínicos que possuem diversas atividades biológicas, sendo uma destas, a atividade anti-câncer. Com isso, o presente trabalho possui o objetivo de sintetizar o derivado hidantoínico (MG-1/LPSF) e caracterizá-lo através da técnica analítica de Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS), desvendando seu perfil de fragmentação e também a pureza do composto obtido.*

*Palavras-chave: Derivados hidantoínicos, anti-câncer, GC-MS*

*ABSTRACT – The drugs currently used in cancer treatment show a high toxicity and have strong side effects to patients, thus, many substances are synthesized from heterocyclic rings leads, among them, hydantoin derivatives having various biological activities, and one, the anti-cancer activity. Thus, this work has the objective to synthesize the hydantoin derivative (MG-1/LPSF) and characterize it through the analytical technique of Gas Chromatography Coupled with Mass Spectrometry (GC-MS), unmasking its fragmentation profile as also the purity of the compound obtained.*

*Keyword: hydantoin derivatives, anti-cancer, GC-MS*

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer é um termo genérico usado para mais de cem doenças cujo personagem em comum é o crescimento descontrolado e a disseminação de células (SANTOS et al., 2016). O câncer está entre a principal causa de doença e morte no mundo, com cerca de 14 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes relacionadas a esta doença, só em 2012 (WHO, 2016). O

tratamento para tal doença continua sendo um desafio. Vários esforços têm sido feitos para sua prevenção e controle, como pesquisas envolvendo a manipulação do sistema imunológico, terapia genética e avanço no descobrimento e desenvolvimento de novos fármacos.

Muitas substâncias sintéticas são obtidas a partir de derivações de anéis heterocíclicos, dentre eles, destaca-se os derivados hidantoínicos, devido à potencialidade da hidantoína como protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos. Os seus derivados atraíram muito interesse na descoberta de drogas devido à sua vasta diversidade de atividades biológicas e aplicações terapêuticas. (BASAPPA et al., 2009). Hidantoínas ou imidazolidina-2,4-diona são compostos de interesse considerável tanto em termos químico, como biológico. Diversos compostos desta classe têm mostrado uma atividade farmacêutica útil que conduziu em alguns casos, para aplicações clínicas. (MARINOVA et al., 2016).

Os derivados hidantoínicos destacam-se por apresentarem ação biológica diversificada, como por exemplo antimicrobiana, anticonvulsivante, antiparasitária, fungicida, herbicida, anti-inflamatória, anti-HIV, atividades hipolipidêmicas, anti-arrítmicos e anti-hipertensivos, além de serem uma importante classe de potenciais compostos anticancerígenos. (SHAH et al., 2013; SPENGLER et al., 2010; PITTA et al., 2008). Sabendo disto, é necessário aprimorar os conhecimentos acerca da atividade anticâncer desses derivados, sintetizando e posteriormente avaliando o efeito induzido em células cancerígenas por esses compostos.

Na tentativa de se desenvolver medicamentos anticancerígenos mais potentes e menos agressivos aos pacientes, o Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT SG) vem investigando novos fármacos derivados da imidazolidina-2,4-diona (LPSF/NN) para o tratamento do câncer (PITTA et al., 2004). Com isso, o objetivo do presente trabalho é sintetizar uma molécula protótipo inédita derivada da imidazolidina (MG-1/LPSF), no qual, a partir desta, podem ser obtidos diferentes produtos de promissoras atividades e caracterizá-lo através da técnica analítica de Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS), esclarecendo seu perfil de fragmentação bem como a pureza do composto sintetizado.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

O MG-1/LPSF foi sintetizado através de uma reação de *N*-alquilação utilizando como reagentes a hidantoína e o cloreto de benzila substituído. Para sua caracterização, foi utilizada a técnica de Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massa. As amostras foram solubilizadas em acetonitrila (ACN) na proporção de 0,2 mg/mL, e passadas para um vaio estéril através de filtro de 0,2µm. As amostras em solução foram aplicadas em coluna Restek rtx-5 de dimensões 30m x 0,25mm x 0,25µm, de um Cromatógrafo Gasoso associado a Espectrômetro de Massas modelo QP-2010 (Shimadzu), com o gás hélio servindo de fase móvel. A temperatura de aplicação da solução com amostra foi de 310°C, e a progressão da temperatura durante a passagem do material é apresentada a seguir:

0,01 min - 1 min: Temperatura Final (TF): 40°C, sem variação; 1 min - 7 min: TF: 160°C, variação de 20°C/min; 7 min - 23 min: TF: 320°C, variação de 10°C/min; 23 min - 30 min: TF: 320°C, sem variação; 30 min - Fim da corrida.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a metodologia empregada na síntese do MG-1 a molécula foi obtida em 24h de reação, possuindo um alto grau de pureza e um rendimento de 30%. Com a utilização da técnica de Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de massas foi possível observar que a amostra obteve um tempo de retenção de 16.515 min e apresentou 100% de pureza (Fig. 1).

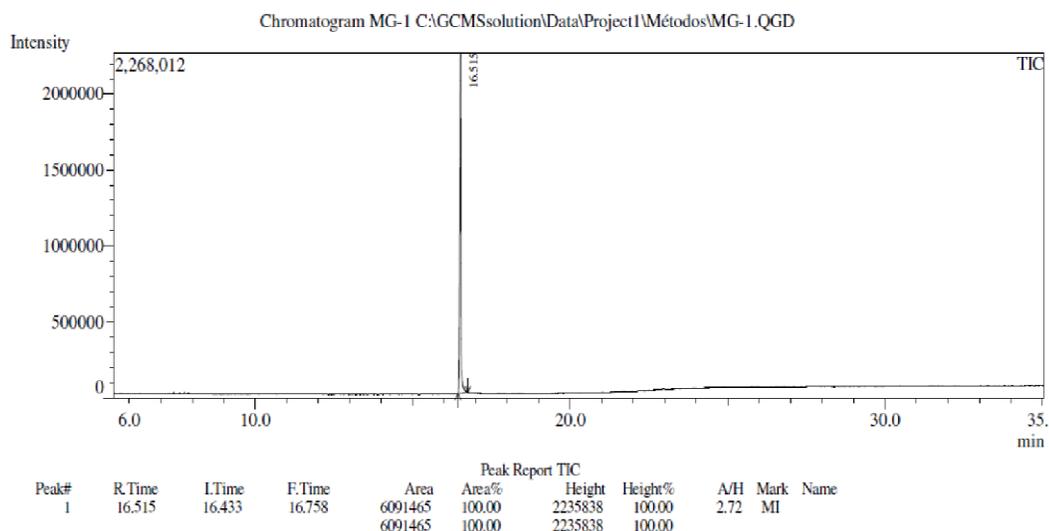


Figura 1 – Cromatografia Gasosa do composto, identificando a pureza e o tempo de retenção

De acordo com a figura 2, além de observarmos o pico que representa o íon molecular (M) no valor de 220 m/z, podemos observar picos mais intensos que caracterizam a molécula, sendo estes, o pico base de 134 m/z e o pico de 121 m/z. Ainda observam-se alguns picos referentes à fragmentação do anel de benzeno da molécula, estes são os seguintes m/z: 51 (C<sub>4</sub>H<sub>3</sub>), 65 (C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>), 77 (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>) e 91 (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-CH<sub>2</sub>).

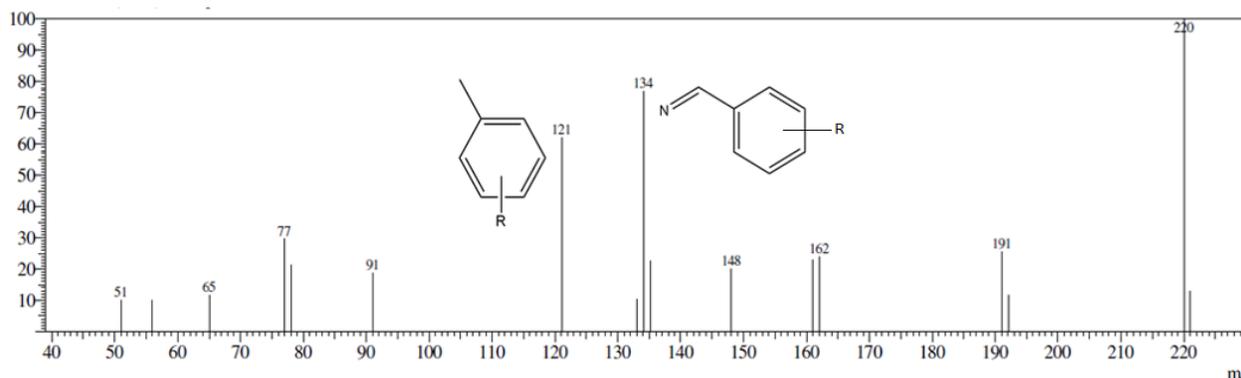


Figura 2 – Perfil de fragmentação do MG-1/LPSF

## 4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, podemos verificar que a metodologia aplicada para análise do MG-1 por CG-MS foi considerada eficiente. Através desta técnica foi possível verificar o alto grau de pureza do composto e comprovar sua estrutura química através do seu padrão de fragmentação. Podemos considerar que a metodologia de síntese foi satisfatória para a obtenção do composto hidantoínico, pois, apesar do rendimento ser relativamente baixo, os custos para a produção do MG-1 são muitos baixos e isso compensa bastante a utilização desta metodologia de síntese. Entretanto, é importante que haja posteriormente ajuste de parâmetros na reação para obtenção de maior rendimento.

## 5. REFERÊNCIAS

- Afzal Shah 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.
- BASAPPA et al., Anti-tumor and anti-angiogenic activity of novel hydantoin derivatives: Inhibition of VEGF secretion in liver metastatic osteosarcoma cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* v. 17, p. 4928–4934, 2009.
- Dos Santos, D. L. et al., A Quantum Chemical and Chemometrical Study of Styrylbenzylsulfones and their Analogues with Citotoxic Activity against Prostate Cancer Cells. *Rev. Virtual Quim.*, 2016, 8 (2), no prelo. Data de publicação na Web: 9 de abril de 2016.
- Petja Marinova et al., Study on the Synthesis, Characterization and Bioactivities of 3-Methyl-9'-fluorenespiro-5-hydantoin. *Acta Chim. Slov.* v. 63, p. 26–32, 2016.
- PITTA, I.R. et al., Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Molecules with Antitumor Activity and Chemical Synthesis. WO/2004/024058, dep. 09/09/2003, pub. 25/03/2004.
- PITTA, I.R. et al. Estrutura, reatividade e propriedades biológicas de hidantoínas. *Quim. Nova*, Vol. 31, No. 3, p. 614-622, 2008.
- SPENGLER et al., Biological Activity of Hydantoin Derivatives on P-Glycoprotein (ABCB1) of Mouse Lymphoma Cells. *ANTICANCER RESEARCH* v. 30, p. 4867-4872, 2010.
- WHO, Essential medicines give lifeline to people living with câncer. Disponível em: <<http://www.who.int/features/2016/essential-medicines-cancer/en/>>. Acesso em: 23/10/2016.

## 6. AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Pernambuco, ao Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco.

ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL – PNQM 27

## CARACTERIZAÇÃO FARMACOGNÓSTICA E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE FINGERPRINT POR CLAE-DAD DAS CASCAS DE *Mimosa tenuiflora* (Fabaceae)

I. A. AMARIZ<sup>1</sup>, J. P. SILVA<sup>1</sup>, N. A. C. SOUZA<sup>1</sup>, J. M. T. De ALENCAR-FILHO<sup>1</sup>, P. A. SAMPAIO<sup>1</sup>, E. C. V. PEREIRA<sup>1</sup>, H. A. P. TEIXEIRA<sup>1</sup>, P. J. ROLIM-NETO<sup>2</sup>, L. A. ROLIM<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Central de Análise de Fármacos, Medicamentos e Alimentos - CAFMA, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina/ PE, Brasil

<sup>2</sup> Laboratório de Tecnologia de Medicamentos – LTM, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

E-mail para contato: belaamariz@hotmail.com

**RESUMO** – *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir., conhecida popularmente como jurema-preta, é utilizada na medicina popular para vários fins terapêuticos, como anti-inflamatório, analgésico, assim alteração de consciência e percepção em rituais indígenas. O objetivo do trabalho foi realizar a caracterização farmacognóstica das cascas da *Mimosa tenuiflora* e comparar o perfil cromatográfico obtido com registros na literatura. A caracterização farmacognóstica das cascas pulverizadas, foi realizada de acordo com a Farmacopeia Brasileira. Para a obtenção do fingerprint utilizou-se a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a arranjo de diodos (CLAE-DAD). Os resultados obtidos da caracterização farmacognóstica foram de 328,40  $\mu\text{m}$  para o tamanho médio das partículas. A perda por dessecação foi de  $4,82 \pm 0,07\%$ . As cinzas totais obtiveram um total de  $1,52 \pm 0,01\%$ . As cinzas insolúveis em ácido compreenderam o resultado de  $1,53 \pm 0,01\%$ . O teor de substâncias extraíveis em álcool foi de  $35,41 \pm 0,01\%$ . O índice de espuma foi negativo, indicando a ausência de saponinas. O perfil cromatográfico mostrou que a substância encontrada de acordo com o pico majoritário é característico do dimetilriptamina (DMT), corroborando com a literatura. Este trabalho demonstra resultados inéditos quanto a caracterização farmacognóstica desta espécie assim como, corroboram com os limites estabelecidos pela farmacopeia, permitindo um padrão de qualidade da matéria prima.  
**Palavras chave:** CLAE-DAD, Jurema preta, Perfil cromatográfico.

**ABSTRACT** – *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir., popularly known as Jurema, is used in folk medicine for various therapeutic purposes, As anti-inflammatory, analgesic, thus alteration of consciousness and perception in indigenous rituals. The aim of the study

was the pharmacognostic characterization shells of *Mimosa tenuiflora* and comparison of the chromatographic profile obtained from records in the literature. The

pharmacognostic characterization sprayed shells was performed in accordance with the Brazilian Pharmacopoeia. To obtain the fingerprint it was used the High Performance Liquid Chromatography technique coupled with diode array (HPLC-DAD). The results of the pharmacognostic characterization were 328.40  $\mu\text{M}$  for average particle size. The loss on drying was  $4.82 \pm 0.07\%$ . The total ash obtained was  $1.52 \pm 0.01\%$ . The acid-insoluble ash understood the result of  $1.53 \pm 0.01\%$ . The content of extractives in alcohol was  $35.41 \pm 0.01\%$ . The foam index is negative, which indicates the absence of saponin. The chromatographic profile revealed that the substance found according to the major peak is characteristic of dimethyltryptamine (DMT), corroborating the literature. This paper shows new results as pharmacognostic characterization of this species as well as corroborate the limits set by the pharmacopoeia, allowing a standard of quality of the raw material.

Keywords: Chromatographic profile, HPLC-DAD, *Jurema preta*

## 1. INTRODUÇÃO

*Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir., (FABACEAE), possui ampla distribuição no nordeste do Brasil, sendo esta conhecida popularmente como jurema-preta. Na medicina popular é usada como anti-inflamatório, analgésico, antitussígeno, contra bronquite e alguns tipos de úlceras. As cascas e raízes são utilizadas na preparação de bebidas para rituais de cultos indígenas, devido à alta concentração de N,N,dimetiltryptamina (DMT), este por sua vez é capaz de promover alterações de consciência e percepção (Dourado, *et al.* 2013; Silva, *et al.* 2013; Souza, *et al.* 2008). O desenvolvimento de um perfil cromatográfico característico de uma amostra, chamado de fingerprint é capaz de caracterizar marcadores ou compostos desconhecidos presentes num extrato vegetal. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as características farmacognósticas das cascas de *Mimosa tenuiflora* e determinação do perfil cromatográfico do decocto, visto que na literatura não existem estudos relacionados.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

As cascas da droga vegetal foram coletadas no município de Petrolina- PE. O material vegetal foi submetido aos ensaios de determinação da granulometria dos pós, perda por dessecação, cinzas totais, cinzas insolúveis em ácido, índice de espuma, substâncias extraíveis por álcool (extrato alcoólico), (método c: extração a frio), de acordo com procedimentos descritos na 5ª Edição da Farmacopeia Brasileira (2010).

O perfil cromatográfico do decocto de *M. tenuiflora* foi obtido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a arranjo de diodos (CLAE-DAD), utilizando como parâmetros cromatográficos: fase móvel composta de solvente A – 0,1% de Ácido Trifluoracético diluído em água ultrapurificada e solvente B 100% acetonitrila, com fluxo de 0,6 mL/min., começando o



gradiente com 85% de A e 15% de B, aos 30 min. Esse gradiente atingiu 75% de A e 25% de B. A fase estacionária foi uma coluna Agilent® (250x4,6 mm, 5µm C18) mantida a 30 °C. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados obtidos expressos em média ± desvio padrão.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

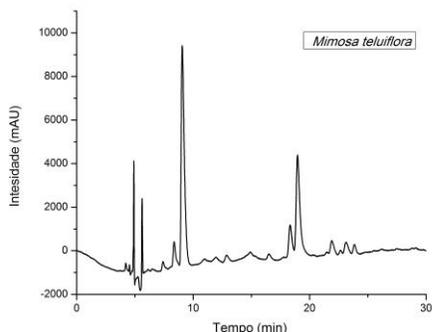
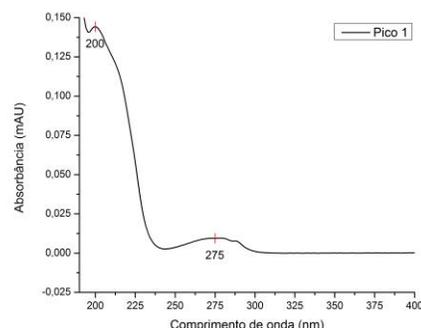
Para determinar a granulometria dos pós, utilizou os tamises de malhas: 500, 425, 250, 180 e 150 µm. A malha que obteve a maior quantidade de pó retido foi a de 250 µm, sendo confirmado por esta ter a maior retenção entre os tamises. A partir do gráfico o tamanho médio das partículas determinado foi de 328,40 µm.

O pó da droga vegetal apresentou  $4,82 \pm 0,07\%$  na perda por dessecação. Este teste é importante para manter a conservação e armazenamento da amostra, uma vez que o alto teor de umidade é o principal fator para a reação de hidrólise e o crescimento e proliferação de microorganismos, favorecendo a degradação dos seus constituintes. O baixo teor de umidade indica que o processo de secagem em estufa com ar circulante foi eficaz para a estabilidade e conservação da amostra.

Na determinação de cinzas totais a amostra obteve um total de  $1,52 \pm 0,01\%$ . A determinação do teor de cinzas verifica o teor de impurezas inorgânicas não voláteis que podem estar presentes como contaminantes. As cinzas insolúveis em ácido compreenderam o resultado de  $1,53 \pm 0,01\%$ . A determinação de cinzas insolúveis em ácido refere-se à quantificação de sílica e constituintes silicosos na droga vegetal (Couto *et al.*, 2009). Em relação aos resultados de cinzas sulfatadas, os valores obtidos para esse teste foi de  $1,82 \pm 0,01\%$ . Nos vegetais, as inclusões minerais cristalinas contribuem para o aumento das cinzas, influenciando principalmente os valores de cinzas sulfatadas (Mohamad *et al.*, 2013).

O resultado obtido a partir da determinação do teor de substâncias extraíveis em etanol foi de  $35,41 \pm 0,01\%$ . A granulometria do pó tem influência diretamente no teor de substâncias extraíveis por álcool, quanto menor as partículas da droga vegetal, maior a superfície de contato do pó com o solvente, logo mais eficiente se torna o processo de extração. O índice de espuma obtido foi menor que 100, sendo o resultado negativo para a presença de saponinas na droga vegetal de *M. tenuiflora*. Todos os valores obtidos nos respectivos ensaios estão de acordo com o preconizado na Farmacopeia Brasileira (2010).

A partir do desenvolvimento do método e fingerprint das cascas de *M. tenuiflora*, obteve-se o perfil cromatográfico (figura 1). Pode-se observar que o pico majoritário apresenta tempo de retenção de 9,75 min. A partir do espectro de UV-visível (figura 2) do DMT cuja absorção máxima ocorre em 220 e 275 nm, suspeita-se que corresponda a este composto, uma vez que houve semelhança com o cromatograma apresentado por Gaujac (2013).

Figura 1 - Perfil cromatográfico do decocto de *M.tenuiflora*Figura 2. Espectro de UV do pico majoritário presente na *M.tenuiflora*

## 4. CONCLUSÃO

Os resultados da caracterização farmacognóstica de *M. tenuiflora*, demonstram que a droga vegetal apresenta qualidade aceitável, podendo esta ser utilizada como matéria prima farmacêutica na obtenção de derivados com fins terapêuticos. O fingerprint avaliado é utilizado como um parâmetro importante para o processo de identificação da planta, o que permite corroborar com estudos prévios sobre a composição química da amostra estudada. Este fato é um incentivo para o desenvolvimento de novos medicamentos fitoterápicos.

## 5. REFERÊNCIAS

- BRASIL. Farmacopeia Brasileira. 5ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. 546 p.
- COUTO, R.O.; VALGAS, A.V.; BARA, M.T.F.; PAULA, J.R. Caracterização físico-química do pó das folhas de *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae). *Revista Eletrônica Farmácia*. v. 6, n. 3, p. 59-69, 2009.
- DOURADO, D.A.O.; CONCEIÇÃO A.S.; SILVA J.S. O gênero *Mimosa* L. (Leguminosae: Mimosoideae) na APA Serra Branca/Raso da Catarina, Bahia, Brasil. *Biota Neotrop*. v.13, n.4, 2013.
- GAUJAC, A. Estudos sobre o psicoativo *N,N*-dimetiltryptamina (DMT) em *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir e em bebidas consumidas em contexto religioso. Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Salvador, 2013.
- MOHAMAD, T.A.S.T.; NAZ H.; JALAL R.S.; HUSSIN K.; RAHMAN M.R.A.; ADAM A.; WEBER J.F.F. Chemical and pharmacognostical characterization of two Malaysian plants both known as Ajisamat. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v.23, p.724 -730, 2013.
- SILVA V.A.; GONÇALVES G.F.; PEREIRA M.S.V.; GOMES I.F.; FREITAS A.F.R.; DINIZ A.F.F.M.; PESSÔA H.L.F. Assessment of mutagenic, antimutagenic and genotoxicity effects of *Mimosa tenuiflora*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. v. 23, n. 2, p.329-334, 2013.
- SOUZA R.S.O.; ALBUQUERQUE U.P.; MONTEIRO J.M.; AMORIM E.L.C. Jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* [Willd] Poir): a review of its traditional use, phytochemistry and pharmacology. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.51, p. 937-947, 2008.

## 6. AGRADECIMENTOS

CAPES, UNIVASF, CAFMA, LTM.

ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL – PNQM 28

## SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE UM NOVO DERIVADO TIAZOLIDÍNICO LPSF/GQ-407 ATRAVÉS DA TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG-MS)

M.C.V.A. OLIVEIRA<sup>1</sup>, E.A.V.F. RAMALHO<sup>1</sup>, J. F. BRANCO JÚNIOR, I.R. PITTA<sup>1</sup>, M.R. GALDINO-PITTA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco.

E-mail para contato: mariacecilia.vao@gmail.com

**RESUMO** – *Os derivados tiazolidínicos apresentam importância significativa em diversas atividades, entre elas a anti-inflamatória. Estudos anteriores demonstram sua eficácia no processo da inflamação tornando os derivados uma alternativa no tratamento. Nesse sentido, o presente trabalho tem como objetivo apresentar a síntese e caracterização de um novo derivado tiazolidínico codificado LPSF/GQ-407 através da técnica de análises de Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-MS). A síntese foi dividida em 4 etapas, onde obtivemos os intermediários e o composto deste estudo através de uma reação de adição de Michael. O composto foi submetido a CG-MS onde foi possível identificar sua pureza e seus principais fragmentos.*

**Palavras-chaves:** Tiazolidina; CG-MS; anti-inflamatório.

**ABSTRACT** - *The thiazolidine derivatives have significant importance in various activities, including anti-inflammatory. Previous studies demonstrate its effectiveness in the inflammation process, making the derivatives an alternative treatment. Thus, this study aims to present the synthesis and characterization of a novel thiazolidine encoded LPSF / GQ-407 by gas chromatography analysis technique coupled with Mass Spectrometer (GC-MS). The synthesis was divided into four steps, where we obtained the intermediates and the compound of this study via a Michael addition reaction. The compound was subjected to GC-MS where it was possible to identify its purity and its main fragments.*

**Keywords:** Thiazolidine; GC-MS; Anti-inflammatory

## 1. INTRODUÇÃO

Os derivados da tiazolidina-2,4-diona vêm sendo descritos como uma excelente classe de moléculas devido aos resultados promissores em diversas atividades biológicas. Há relatos de atividade hipoglicêmica, inibidora da aldose-redutase, anti-câncer, anti-microbiana bem como anti-inflamatória. Os mecanismos de ação dos derivados tiazolídínicos são dos mais diversos. Eles são agonistas dos Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma (PPAR), e se ligam também a enzima aldose redutase e fosfatidilinositol 3-quinase C (PI3Kc), o que explica em parte suas variadas atividades (Jain *et al.*, 2013).

No processo de inflamação, resposta do organismo quando exposto a micro-organismos invasores, partículas endógenas ou lesões teciduais, a principal via de ação é a interação desses derivados tiazolidínicos com os receptores nucleares PPAR- $\gamma$ . A resposta dessa interação é a inibição da inflamação, uma vez que esses receptores nucleares de hormônios desempenham papel importante nos eventos da inflamação (Barros, 2011). Há diversos estudos que mostram resultados significantes quanto a sua atividade anti-inflamatória. Recentemente, trabalhos com o composto LPSF/GQ-02 demonstraram haver a diminuição da inflamação em células do fígado de camundongos e em ratos com aterosclerose (Silva *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2015). Há os LPSF/GQ-125 e LPSF/GQ-192, que apresentaram resultados promissores não só na atividade anti-inflamatória, mas também como antireumáticos e antinociceptivos (Malta *et al.*, 2014). Neste contexto, é visível que os derivados Tiazolidínicos constituem uma alternativa terapêutica para o tratamento da inflamação.

O presente trabalho apresenta como objetivo específico a síntese e elucidação estrutural de um novo derivado tiazolidínico candidato a fármaco anti-inflamatório, que foi realizada através de Cromatografia Gasosa acoplada a um Espectrômetro de Massas (GC-MS). Trata-se de um método analítico o qual combina características de cromatografia gasosa e espectrometria de massas na identificação de diferentes substâncias. O cromatógrafo é dotado de uma coluna (fase estacionária) e um gás de arraste (fase móvel) onde a diferença das propriedades químicas entre as diferentes moléculas na mistura e sua afinidade relativa à fase estacionária irá promover a separação dos analitos à medida que a amostra passa pela coluna. Desta forma, as moléculas são retidas dentro da coluna e então eluídas, o que irá gerar diferentes tempos de retenção, permitindo, que o espectrômetro capture e ionize, quebrando-a em diversos fragmentos menores, os quais são detectados e separados pela razão massa/carga ( $m/z$ ). Podemos assim avaliar a pureza e o perfil de fragmentação da molécula em estudo confirmando sua estrutura química.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

A síntese das moléculas finais LSPF/GQ-407 foi dividida em 4 etapas. Inicialmente foi sintetizada a TZD através de uma reação de ciclização. Na segunda etapa, a TZD, por substituição nucleofílica, reagiu com um cloreto de arila substituído obtendo assim o primeiro intermediário, codificado GQ-393. O segundo intermediário, um éster de cope codificado LPSF/IP-57, foi obtidos através da condensação de Knoevenagel. Por fim, a reação de adição de Michael entre o LPSF/GQ-393 e o LPSF/IP-57 previamente obtidos resultou na obtenção

da molécula do estudo.

Para análise e caracterização estrutural foi utilizada a técnica de (CG-MS). A amostra foi solubilizada em acetonitrila (ACN) e depois passada para o frasco por filtro de 2 $\mu$ m. A amostra foi aplicada em uma coluna Restek rtx-5 30m x 0.25  $\mu$ m, no aparelho de modelo QP-2010 (Shimadzu), com o gás hélio como fase móvel. A temperatura utilizada para aplicação da solução com a amostra foi de 320°C. A sucessão da temperatura durante a passagem do material foi: i) 0,01 min - 1 min: Temperatura Final (TF): 40°C, sem variação; ii) 1 min - 7 min: TF: 180°C, variação de 20°C/min; iii) 7 min - 22 min: TF: 320°C, variação de 10°C/min; iv) 20 min - 40 min: TF: 320°C, sem variação. A corrida teve duração de 30 min.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A síntese do LSPF/GQ-407 teve um rendimento de 87% e Ponto de Fusão (PF) de 157.4-8°C. Com a utilização da técnica de CG-MS foi possível identificar que o tempo de retenção (Tr) do LSPF/GQ-407 foi em torno de 20.5 minutos com 100% de pureza conforme mostra a Figura 1.

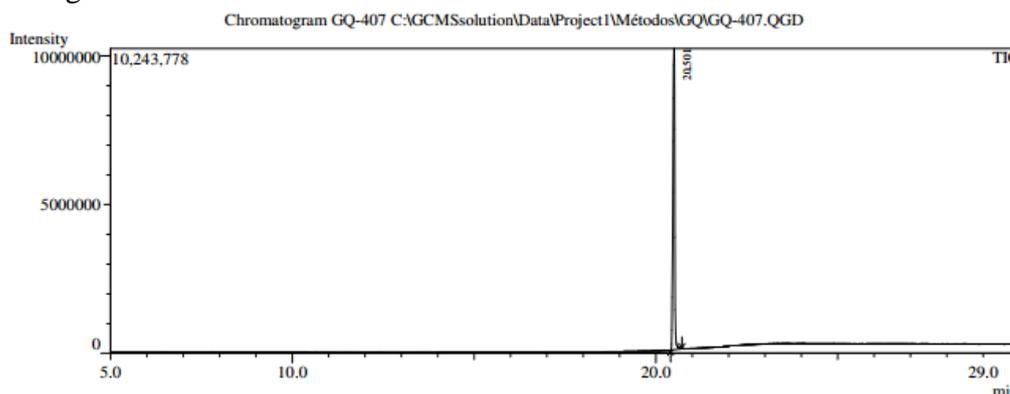


Figura 1 – Cromatograma (CG) do LSPF/GQ-407. Pureza = 100% e Tr =20.5 min.

Na figura 2, além do pico referente ao massa molecular ( $M$ ) no valor de 393 m/z, podemos ver outros picos que caracterizam a molécula LSPF/GQ-407 como, por exemplo, o pico base de 121 m/z representando o íon tropílio. Outro pico que também podemos citar é m/z 202 que caracteriza o grupamento C<sub>9</sub>H<sub>5</sub>R<sub>2</sub>S.

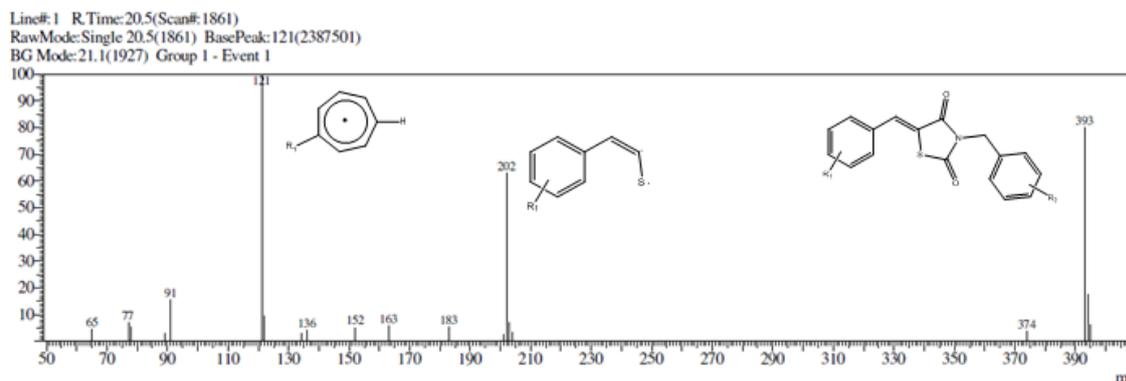


Figura 2 – Espectro EI-MS do GQ-407.

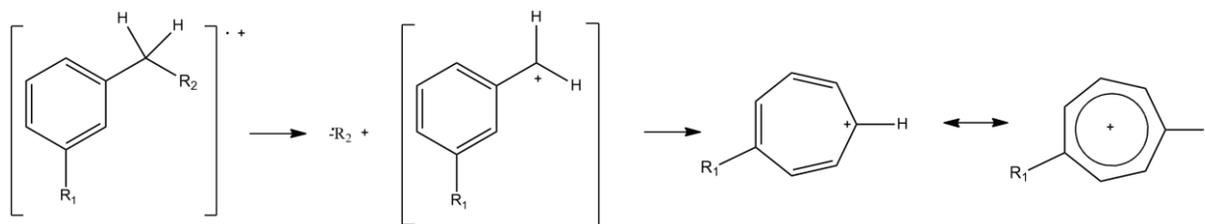


Figura 3 – Formação do íon tropílio substituído.

## 4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos do presente trabalho foi visto que a metodologia empregada para síntese do LPSF/GQ-407 obteve sucesso, pois além de ser rápida e de baixo custo, gerou um produto de alto grau de pureza e de bom rendimento. Foi possível identificar a molécula através dos fragmentos observados no espectro da técnica de CG-MS.

## 5. REFERÊNCIAS

- BARROS, C.D. Síntese de novos derivados da tiazolidina-2,4-diona e avaliação como potenciais agentes terapêuticos. 2011. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011. Disponível em: <[http://repositorio.ufpe.br/bitstream/handle/123456789/1682/arquivo4075\\_1.pdf?sequence=1&allowed=y](http://repositorio.ufpe.br/bitstream/handle/123456789/1682/arquivo4075_1.pdf?sequence=1&allowed=y)>. Acesso em: 27 out. 2016.
- JAIN, V.S.; VORA, D.K.; RAMAA, C.S. Thiazolidine-2,4-diones: Progress towards multifarious applications. *Bioorg. Med. Chem.*, v 21, p.1599–1620, 2013.
- SILVA, A.K.S.; TORRES, D.O.C.; GOMES, F.O.S.; SILVA, B.S.; RIBEIRO, E.L; OLIVEIRA, A.C.; SANTOS, L.A.M.; LIMA, M.C.A.; PITTA, I. R.; PEIXOTO, A.C. LPSF/GQ-02 Inhibits the Development of Hepatic Steatosis and Inflammation in a Mouse Model of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *PLOS ONE* | DOI:10.1371/journal.pone.0123787, 2015.
- SILVA, A.K.S; GOMES, F.O.S.; SILVA, B.S.; RIBEIRO, E.L; OLIVEIRA, A.C.; ARAUJO, S.M.R.; LIMA, I.T.; OLIVEIRA, A.G.V.; RUDNICKID, M.; ABDALLAD, D. S.P; LIMA, M.C.A.; PITTA, I. R.; PEIXOTO, A.C. Chronic LPSF/GQ-02 treatment attenuates inflammation and atherosclerosis development in LDLr<sup>-/-</sup> mice. *Eur J Pharmacol.*, v. 791, p. 622–631, 2016.
- MALTA, D.J.N.; ARAUJO, L.C.C.; CARRAZONI, A.S.G.; MOTA, F.V.B.; SILVA, S.C.; CARMINO, M.A.S.; LIMA, M.C.A.; PITTA, I.R.; SILVA, T.G. Anti-inflammatory, Antiarthritic and Antinociceptive Activities of 3,5-Disubstituted Thiazolidine Derivatives. *Br J Pharm Res*, v. 4(8), p. 992-1003, 2014
- PAVIA, D. L.; KRIZ, G. S.; LAMPMAN, G. M.; VYVYAN, J. R. *Introdução À Espectroscopia*. São Paulo: Cengage Learning, 2015.

## 6. AGRADECIMENTOS

Ao Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT-SG), a Universidade Federal de Pernambuco, bem como a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT-if).



ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL – PNQM 30

## ATIVIDADE ANTIBACTERIANA, ANTIBIOFILME E CITOTÓXICA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE *Passiflora cincinnata* MAST. (Passifloraceae)

E. M. de LAVOR<sup>1</sup>, L. F. S. OLIVEIRA<sup>1</sup>, M. G. SILVA<sup>1</sup>, A.W.C. FERNANDES<sup>1</sup>, N. B. FREIRE<sup>1</sup>, F. K. dos SANTOS<sup>1</sup>, M.T. M. F. ARAÚJO<sup>2</sup>, T.C. L. ARAUJO<sup>2</sup>, M. M. da COSTA<sup>1</sup> e J. R. G. S. ALMEIDA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Vale do São Francisco, Pós graduação em Recursos Naturais do Semiárido.

<sup>2</sup> Universidade Federal do Vale do São Francisco, Colegiado de Farmácia.

E-mail para contato: layannefeitosa@gmail.com

**RESUMO** – O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antibacteriana, antibiofilme e citotóxica de *Passiflora cincinnata* Mast. Um extrato etanólico bruto (EEB) foi obtido das partes aéreas da planta. Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram calculadas por meio da técnica de microdiluição. A formação de biofilmes foi quantificada e, após tratamento, a capacidade de inibição desta formação foi avaliada por espectrofotometria. A citotoxicidade foi avaliada por meio do teste de MTS. Apesar de não apresentar CBM e CIM relevantes, o EEB inibiu a formação de biofilme em cepas de *Staphylococcus aureus* e apresentou diminuição da viabilidade celular (81,88%) em células de sarcoma 180.

**Palavras-chave:** Produtos Naturais, Câncer, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, sarcoma.

**ABSTRACT** - The aim of this study was to evaluate the antibacterial, antibiofilm and cytotoxic activities of *Passiflora cincinnata* Mast. A crude ethanol extract (EEB) was obtained from the aerial parts of the plant. Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and Minimum Inhibitory Concentration (MIC) were calculated by the microdilution technique. The biofilm formation was quantified and, after treatment, the ability to inhibit this formation was evaluated by spectrophotometry. The cytotoxicity was evaluated by MTS test. Although not present relevant CBM and CIM, EEB inhibited biofilm formation in *Staphylococcus aureus* and showed decreased cell viability (81.88%) in sarcoma 180 cells.

**Keywords:** Natural Products, Cancer, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, sarcoma.



## 1. INTRODUÇÃO

Espécies de *Passiflora*, conhecidas popularmente como maracujá, têm sido amplamente cultivadas no Brasil, especialmente no bioma Caatinga, devido à produção de frutos comestíveis, resistência à seca e pelo seu uso na medicina tradicional (Nascimento *et al.*, 2013; Cutri *et al.*, 2013). A espécie *Passiflora cincinnata*, popularmente conhecida como maracujá-do-mato, é utilizada na medicina popular por suas propriedades anti-inflamatória, antitussígena, calmante e relaxante. O estudo quimiotaxônomico de espécies do gênero *Passiflora* demonstram a presença de metabólitos secundários, como por exemplo os alcaloides indólicos e compostos fenólicos, como os flavonoides vitexina e isovitexina, os quais apresentam diversas atividades farmacológicas na literatura (Wosch *et al.*, 2016). Dessa forma, objetivou-se avaliar a capacidade antibacteriana, antibiofilme e citotóxica do Extrato Etanólico Bruto das partes aéreas de *Passiflora cincinnata* Mast. (Passifloraceae).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Partes aéreas (folhas e talos) de *Passiflora cincinnata* foram coletadas no município de Uauá-BA. O material vegetal foi dessecado em estufa a 45°C durante 72h. Após secagem, o material vegetal foi pulverizado, e macerado com etanol 95% com renovação de solvente a cada 72h. A solução extrativa foi concentrada em rotaevaporador, obtendo-se o Extrato Etanólico Bruto (EEB), o qual foi diluído em solução de DMSO 1% para utilização nos ensaios abaixo. A solução de DMSO 1% foi usada como controle.

A atividade antibacteriana do EEB foi realizada pelos testes da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Inibitória Mínima (CIM), por meio da técnica de microdiluição, empregando-se a metodologia descrita pelo CLSI (2014) seguindo as descrições do protocolo M07-A9. Para realização dos tratamentos, foi preparada uma solução hidroalcoólica de 25000 µg/ml do EEB. Para avaliação da atividade antibiofilme foi realizado o protocolo de Nostro *at al.* (2007). Utilizou-se uma solução do EEB de concentração correspondente a metade da CBM. Como controle negativo foi utilizada o meio TSBg, sendo também utilizado como controle do processo a fim de se avaliar uma provável contaminação. Os resultados foram expressos conforme escala proposta por Merino *et al.* (2009).

Para avaliação da atividade citotóxica foi utilizado o ensaio de redução do MTS, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio, conforme descrito por Soman *et al.* (2009), com ligeiras modificações, em células do sarcoma 180 (1x10<sup>5</sup> células/poço). Para triagem foi utilizado o EEB na dose de 50 µg/mL e para determinação da CI50 foram utilizadas as doses de 3,125 a 400 µg/mL. Nas placas de 96 poços, após 24 horas de tratamento com o extrato, adicionou-se 20 µL de MTS (5 mg/mL), as placas foram submetidas à agitação, e incubadas por 2 horas a 37° C, após esse período, a absorbância foi determinada a 492 nm.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos testes da atividade antibacteriana *in vitro* pelo método de microdiluição em caldo indicam que o EEB não apresentou resultados relevantes, uma vez que os valores da CIM e CBM foram elevados (tabela 1). Esses resultados corroboram com Siebra *et al.* (2016).

**Tabela 1** - Valores da CBM e da CIM do EEB em cepas bacterianas.

Cepa Bacteriana	Concentração Bactericida Mínima (CBM)	Concentração Inibitória Mínima (CIM)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	12500µg/ml	3.125µg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	12500µg/ml	6.250µg/ml

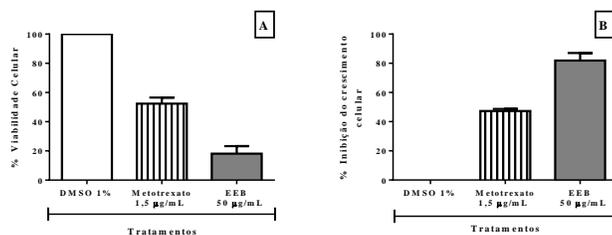
As cepas de *S. aureus* apresentam forte produção de biofilme, já as de *E. coli* apresentam fraca produção, conforme apresentado por Merino *et al.* (2009) e comprovados nesse estudo. Após tratamento com o EEB, observou-se uma potencial atividade antibiofilme, visto que após a incubação por 24 horas o extrato conseguiu negatizar a produção do biofilme para cepas de *S. aureus*, e apresentou atividade moderada em cepas de *E.coli*, conforme apresentados na tabela 2.

**Tabela 2** – Interferência do tratamento com EEB na formação do biofilme das cepas bacterianas.

Cepa Bacteriana	Média da DO (620 nm)	Classificação quanto à produção do Biofilme*
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,379	Moderado
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,376	Negativo

DO – Densidade ótica; \*DO do controle negativo para *E. coli* é 0,153 e para *S. aureus* é 0,474

A análise preliminar da atividade citotóxica (figura 1) indicou inibição do crescimento celular das células tratadas com o EEB na dose de 50 µg/mL (81,88%), quando comparadas ao controle negativo. A viabilidade das células incubadas com o quimioterápico metotrexato (1,5 µg/mL) foi de 47,33%, inibindo em 47,77% o crescimento celular quando incubadas com esse tratamento.



**Figura 1** – (A) Porcentagem de viabilidade celular (B) porcentagem de inibição do crescimento celular.

Por apresentar uma potencial atividade citotóxica foi determinado a CI50 do EEB (figura 2), a qual apresentou valor de 18,44  $\mu\text{g/mL}$ , indicando potencial atividade citotóxica frente a linhagem celular estudada.

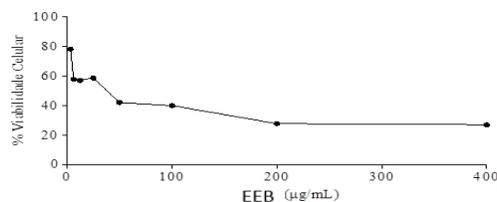


Figura 2–Viabilidade celular após tratamento com diferentes doses do EEB para determinação da CI50.

#### 4. CONCLUSÃO

O EEB de *P. cincinnata* não apresentou atividade antibacteriana significativa, no entanto apresentou potencial atividade antibiofilme. Além disso, o extrato apresenta uma potencial atividade citotóxica na linhagem celular sarcoma 180.

#### 5. REFERÊNCIAS

- CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition. CLSI document M07-A9*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014.
- CUTRI, L. *et al.* Evolutionary, genetic, environmental and hormonal-induced plasticity in the fate of organs arising from axillary meristems in *Passiflora* spp. *Mech Dev*, v. 130, p. 61–69, 2013.
- MERINO N. *et al.* Protein A-Mediated Multicellular Behavior in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, v. 191, p. 832-843, 2009.
- NASCIMENTO, E. M. G. C. *et al.* Benefícios e perigos do aproveitamento da casca de maracujá (*Passiflora edulis*) como ingrediente na produção de alimentos. *Rev Inst Adolfo Lutz*, v. 72, n. 3, p. 1-9, 2013.
- NOSTRO, A. *et al.* Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Med Microbiol*, v. 56, p. 519–523, 2007.
- SOMAN, G. *et al.* MTS dye based colorimetric CTLL-2 cell proliferation assay for product release and stability monitoring of Interleukin-15: Assay ualification, standardization and statistical analysis. *J Immunol Methods*. v. 348, p. 83–94, 2009.
- SIEBRA, A. L. A. *et al.* Potentiation of antibiotic activity by *Passiflora cincinnata* Mast. front of strains *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Saudi J of Biol Sci*, In Press, Corrected Proof, Available online 14 January 2016.
- WOSCH, L. *et al.* Comparative study of *Passiflora* taxa leaves: II. A chromatographic profile. *Rev Bras Farmacogn*, In Press, Corrected Proof, Available online 14 July 2016.



ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL – PNQM 31

## OBTENÇÃO DE EXTRATOS SECOS POR ASPERSÃO DOS FRUTOS DE *Libidibia ferrea* Martius – JUCÁ

P. A. SOUZA<sup>1</sup>, W. A. V. SILVA<sup>1</sup>, M. R. A. FERREIRA<sup>1,2</sup>, L. A. L. SOARES<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFPE

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Centro de Ciências Biológicas, UFPE

E-mail para contato: as.patricia@hotmail.com

**RESUMO** – *Libidibia ferrea* é uma espécie nativa do Brasil, conhecida popularmente como Jucá ou Pau ferro. Estudos relacionados à sua composição química relataram a presença de polifenóis, como os taninos hidrolisáveis. Dessa forma, em razão da escassez de estudos tecnológicos relacionados à espécie, o objetivo do estudo foi avaliar o desempenho da secagem por aspersão de extratos dos frutos de *L. ferrea*. A solução extrativa foi obtida por turboextração na proporção droga:solvente de 15% (p/v) e usando etanol 40% (v/v) com solvente. Após filtração, o extrato foi seco em spray dryer contendo 10 % de adjuvante (dióxido de silício coloidal – DSC ou celulose microcristalina - CMM) em relação ao seu resíduo seco. Os lotes de extratos secos por aspersão (ESA) foram caracterizados pelo rendimento ponderal (% p/p), umidade residual e pelos teores de marcadores (polifenóis totais por UV-Vis e ácidos gálico e elágico por CLAE). A operação apresentou rendimentos de 23,52% e 46,78% para DSC e CMM. Todos os ESAs apresentaram baixa umidade residual (<5%), conforme requerido pelos códigos farmacopeicas. Por fim, o ESA preparado com DSC apresentou maior rendimento em marcadores.

**Palavras chave:** *Libidibia ferrea*, secagem por aspersão, adjuvantes de secagem.

**ABSTRACT** - *Libidibia ferrea* is a native species from Brazil, popularly known as Juca or Pau ferro. Studies related to its chemical composition reported the presence of polyphenols, such as hydrolysable tannins. Thus, due to lack of technological studies related to the species the purpose of the study was to evaluate the performance of spray drying of extracts from fruits of *L. ferrea*. The extractive solution was obtained by turboextraction with the proportion drug:solvent of 15% and using ethanol 40% (v/v) like solvent. After filtration, the extract was dried in spray dryer with 10% of adjuvant (colloidal silicon dioxide – CSD or microcrystalline cellulose - MMC) in relation to dry residue. The batches of drying extracts by aspersion (PSA) were characterized by yield of process (% w/w), moisture content and content of markers (total polyphenol by UV-Vis and gallic and ellagic acids by HPLC). The operation showed yields of 23.52% and

46.78% for CSD e MMC. All the PSAs showed low residual moisture (<5%), in accordance with the pharmacopoeial codes. Finally, the PSA prepared with CSD has higher yield markers.

Keywords: *Libidibia ferrea*, spray drying, drying adjuvants

## 1. INTRODUÇÃO

*Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz var. *ferrea* (Fabaceae) é conhecida popularmente como Jucá ou Pau ferro. A espécie é nativa do Brasil e possui distribuição principalmente na região Nordeste. Na medicina popular, as cascas e os frutos do Jucá têm aplicação no tratamento de diarreias, diabetes, anemia, entre outras enfermidades. Estudos relacionados à sua constituição química relataram a presença de diversos polifenóis, como: taninos hidrolisáveis e flavonoides (Ferreira; Soares, 2015; Ferreira *et al.*, 2016).

Assim, a constituição química e as atividades relatadas para *L. ferrea* demonstram a relevância da espécie para a terapêutica, porém ainda são escassos os estudos tecnológicos relacionados à espécie. Considerando o desenvolvimento de fitoterápicos, o emprego de extratos secos como intermediários tecnológicos é muito explorado. Pois, estes produtos apresentam maior estabilidade (química, físico-química e microbiológica), facilidade de manipulação e fracionamento, além de maior concentração de compostos (Oliveira; Petrovick, 2010; Sticher *et al.*, 2015).

Entre os processos de secagem, destaca-se a técnica de secagem por aspersão (*Spray drying*). A secagem por aspersão ocorre após o contato do fluido aspergido com uma corrente de ar quente, o que possibilita a sua utilização mesmo em materiais termosensíveis, apesar do aquecimento (Oliveira; Petrovick, 2010; Gallo *et al.*, 2015). A otimização dos parâmetros de secagem como temperatura, fluxo de alimentação, concentração e tipo de adjuvantes tecnológicos, assim como teores de resíduos seco do extrato fluido a ser seco; estão entre os fatores indispensáveis para a obtenção de extratos secos com melhores propriedades tecnológicas e com maior rendimento da operação (Oliveira; Petrovick, 2010).

No processo de secagem são utilizados agentes adjuvantes que além de facilitarem a secagem, melhoram as características do produto final. Alguns exemplos desses agentes são citados por Couto *et al.* (2013) e Gallo *et al.* (2015), por exemplo: dióxido de silício coloidal, goma arábica, lactose e celulose microcristalina.

Tendo em vista a importância de *L. ferrea* e as vantagens que oferece a secagem por aspersão, este trabalho tem como propósito avaliar o desempenho da secagem de extratos dos frutos do Jucá.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

O material vegetal (frutos) foi submetido a extração por turbólise (ciclos de 30 seg e intervalos de 4 min) em liquidificador industrial, na proporção 15% (p/v) utilizando etanol a 40% (v/v) como líquido extrator. O resíduo seco foi determinado por gravimetria em balança de infravermelho (Marte<sup>®</sup>).

O extrato obtido foi adicionado de dióxido de silício coloidal (Aerosil<sup>®</sup> 200) ou de celulose microcristalina (Pharmacel<sup>®</sup> 102) na proporção de 10% em relação ao resíduo seco. As dispersões foram agitadas por 30 min antes e mantida sob agitação durante todo o processo de secagem. A secagem foi realizada em *Spray dryer* MSD 1.0 (Labmaq) utilizando como condições preliminares de secagem: temperatura de entrada do ar: 160 °C; temperatura de saída: 123 °C; fluxo de alimentação: 1 L/h; vazão do ar: 1,65 m<sup>3</sup>/min.

Os extratos secos por aspersão de *L. ferrea* (ESALf) foram recolhidos em frasco de vidro, pesados e armazenados. O rendimento ponderal foi determinado em relação ao total de sólidos esperado e teor de marcadores determinado por UV-Vis (polifenóis totais) e por CLAE (ácidos gálico e elágico) conforme preconizado pela literatura (FB5, 2010; Ferreira *et al.* 2016). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os dados foram avaliados com auxílio do programa computacional Excel® (Microsoft).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Alguns estudos relatam que a natureza do material a ser seco apresenta efeito importante sobre a qualidade do produto obtido, e tais efeitos se devem as condições de secagem utilizadas e o teor de sólidos na amostra (Oliveira; Petrovick, 2010; Couto *et al.*, 2013). Neste estudo, o resíduo seco obtido para a solução extrativa foi de  $7,15\% \pm 0,3404$  (4,76%).

Considerando o rendimento ponderal do processo de secagem, os ESALf apresentaram rendimentos de 23,52% e de 46,78% (p/p) para os extratos preparados com DSC e CMM, respectivamente. A recuperação de sólidos após a secagem indica a adequabilidade do sistema em função da perda de material por aderência ao equipamento ou dificuldade de separação da corrente de ar. Por outro lado, nas condições estudadas, os dados são apenas preliminares em razão do volume de extrato fluido submetido à secagem. Porém, as condições operacionais levaram a obtenção de produtos com umidades residuais aceitáveis e que variaram entre  $4,40\% \pm 0,55$  e  $4,62\% \pm 0,19$  (p/p). Nestas condições, os sistemas atendem as exigências preconizadas com baixa atividade de água e assegurando maiores estabilidades físico-química e microbiológica (Couto *et al.*, 2013).

Os teores de marcadores por UV-Vis (polifenóis totais) e por CLAE (ácidos gálico e elágico) estão apresentados na tabela 1. Tanto os dados obtidos por UV-Vis quanto por CLAE indicaram que o rendimento em compostos químicos foi mais pronunciado no ESALf preparado com DSC. Os dados podem ser decorrentes de maior efeito de proteção do DSC ou por interação dos polifenóis com CMM. De qualquer modo, este comportamento ainda será investigado.

Tabela 1 – Teores de marcadores nos extratos secos de *L. ferrea* utilizando diferentes adjuvantes de secagem (Aerosil® 200 ou Pharmacel® 102)

Adjuvantes	Ácido gálico	Ácido elágico	Polifenóis Totais
Aerosil® 200	1,61g% (0,25%)	1,37g% (0,48%)	14,28%
Pharmacel® 102	1,00g% (0,39%)	0,85g% (0,71%)	12,71%

Os dados foram expressos como média e desvio padrão relativo.

A figura 1 ilustra o perfil cromatográfico dos ESALf obtidos por CLAE para separação e quantificação dos marcadores conforme com método proposto por Ferreira *et al.* (2016). O picos 1 e 2, com tempos de retenção médios iguais a 7,5 e 24,6 minutos, correspondem respectivamente ao ácido gálico e ácido elágico.

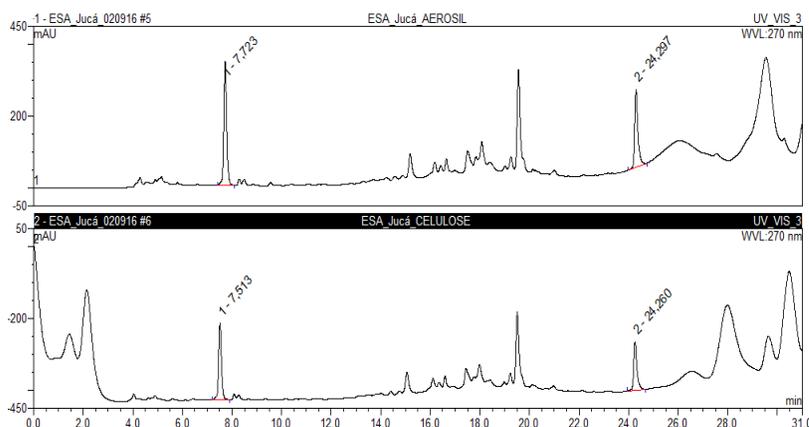


Figura 1 – Perfis cromatográficos dos Extratos Secos por Aspersão obtidos por CLAE.

## 4. CONCLUSÃO

Os dados preliminares revelaram as influências do emprego de adjuvantes de secagem sobre características do extrato seco dos frutos de *L. ferrea*, como o rendimento ponderal e o teor de marcadores. Considerando o teor de marcadores, ainda serão necessários estudos complementares para confirmar os fatores determinantes da diferença nas respostas. Por fim, os produtos obtidos apresentaram umidade residual abaixo de 5 %, indicando estabilidade do produto final.

## 5. REFERÊNCIAS

- COUTO, R. O.; MARTINS, F. S.; CHAUL, L. T.; CONCEIÇÃO, E. E.; FREITAS, L. A. P. et al. Spray drying of *Eugenia dysenterica* extract: effects of in-process parameters on product quality. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 23, n. 1, p. 115-123, 2013.
- FERREIRA, M. R. A.; SOARES, L. A. L. *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L P Queiroz: A review of the biological activities and phytochemical composition. *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 9, n. 5, p. 140-50, 2015.
- FERREIRA, M. R. A.; FERNANDES, M. T. M.; VITURINO, W. A.; BEZERRA, I. C. F.; DE SOUZA, T.P.; PIMENTEL, M. F.; SOARES, L. A. L. Chromatographic and spectrophotometric analysis of phenolic compounds from fruits of *Libidibia ferrea* Martius. *Pharmacognosy Magazine*, v. 12, p. 285-291, 2016.
- GALLO, L.; RAMÍREZ-RIGO, M. V.; PIÑA, J.; BUCALÁ, V. A comparative study of spray-dried medicinal plant aqueous extracts. Drying performance and product quality. *Chemical Engineering Research and Design*, v. 104, p. 681-694, 2015.
- OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, n. 4, p. 641-650, 2010.
- STICHER, O.; HEILMANN, J.; STICHER, ZÜNDORF, I. *Pharmakognosie Phytopharmazie*. 10. Auf. Heidelberg: Springer, 2015. 1451p.



ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL – PNQM 32

## CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE NOVOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO DO FÁRMACO $\beta$ -LAPACHONA UTILIZANDO POLÍMERO HIPER-RAMIFICADO

J. C. S. SOARES<sup>1</sup>, I. B. V. ALVES<sup>2</sup>, S. ALVES. Jr<sup>2</sup>, C. A. C. AMORIM<sup>3</sup>, e M. C. A. LIMA<sup>3</sup>, R. M. F. SILVA<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Faculdade Maurício de Nassau, Departamento de Farmácia

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Departamento de Química Fundamental

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Antibióticos

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia

E-mail para contato: cesar.amorim@gmail.com

*RESUMO – A  $\beta$ -lapachona é uma naftoquinona (3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-naftol[1,2-b]pirano-5,6-diona) de peso molecular 243,3 g.mol<sup>-1</sup> presente na *Tabebuia avellanedae* Lor, árvore conhecida como ipê roxo ou pau d'arco roxo. Este bioativo apresenta múltiplos efeitos farmacológicos, contudo apresenta baixa solubilidade em água. O objetivo deste trabalho foi caracterizar físico-quimicamente o complexo formado entre o dendrímero bis-MPA e a  $\beta$ -lapachona. O complexo com o dendrímero foi preparado a partir de uma relação massa/massa variando o tempo de adsorção em dias. Após o período de agitação, o complexo  $\beta$ -lapachona /dendrímero foi evaporado e seco a temperatura ambiente para posterior caracterização. Os complexos obtidos foram caracterizados por técnicas espectroscópicas. Os resultados das caracterizações mostram que o complexo demonstrou variações nos sinais da  $\beta$ -lapachona quando complexado. Desta forma, propôs-se a caracterização físico-química como um indicio de melhoria na solubilidade da  $\beta$ -lapachona através da formação de complexos entre a  $\beta$ -lapachona e o dendrímero bis-MPA suas contribuições para estudos de uma possível formulação farmacêutica futura.*

*Palavras-chave: bis-MPA, dendrímero, solubilidade.*

*ABSTRACT – The  $\beta$ -lapachone is a naphthoquinone (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol [1,2-b] pyran-5,6-dione) molecular weight of 243.3 g mol<sup>-1</sup> this in *Tabebuia avellanedae* Lor, tree known as purple ipe or pau d'purple bow. This bioactive has multiple pharmacological effects, but has low solubility in water. The aim of this study was to characterize chemically-physical complex formed between the bis-MPA dendrimer*



and  $\beta$ -lapachone. The complex with the dendrimer was prepared from a mass / mass ratio by varying the time for adsorption days. After the stirring period, the  $\beta$ -lapachone complex / dendrimer was evaporated and dried at room temperature for further characterization. The obtained compounds were characterized by spectroscopic techniques. The results of the characterizations show that the complex showed signs of changes in  $\beta$ -lapachone when complexed. Therefore, it was proposed to physico-chemical characterization as an indication of improvement in the solubility of  $\beta$ -lapachone by the formation of complexes between  $\beta$ -lapachone and bis-MPA dendrimer contributions for possible future studies of a pharmaceutical formulation.

*Keywords:* bis-MPA, dendrimer, solubility.

## 1. INTRODUÇÃO

A  $\beta$ -lapachona, quimicamente conhecida por (3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-naftol[1,2-b]pirano-5,6-diona) é uma substância simples do grupo das naftoquinona, é um produto extraído da *Tabebuia avellanae* Lor, árvore tropical conhecida como ipê roxo ou pau d'arco roxo. Esta naftoquinona é uma substância natural que pode ser facilmente obtida por uma semi-síntese a partir do lapachol. Este fármaco tem grande importância na química Medicinal por apresentar várias atividades biológicas tais como atividades antiparasitárias, anti-inflamatória e também anti-câncer, o seu principal alvo terapêutico (AIRES *et al.*, 2014). Apesar dessa potencialidade um dos grandes problemas observados é a sua baixa solubilidade em água (0.038 mg/mL ou 0.16 mM) e a sua distribuição não específica nos tecidos (NASONGKLA *et al.*, 2003).

Existem diversas formas de aumentar a solubilidade de um fármaco. Dentre elas, a complexação da  $\beta$ -lapachona à polímeros ganha destaque. Os dendrímeros mostram-se como estruturas promissoras no desenvolvimento e no sistema de distribuição de fármacos, visando a diminuição da dose administrada e uma maior eficácia terapêutica. (GUPTA *et al* 2007).

Sendo assim, diante das evidências da potencialidade farmacológica da  $\beta$ -lapachona, este trabalho vem oferecer novas alternativas de complexação com o dendrímero bis-MPA (DEN), a fim de promover o incremento de solubilidade da  $\beta$ -lapachona.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os reagentes e solventes utilizados foram a  $\beta$ -lapachona (cedido pelo Laboratório de Tecnologia de Medicamentos – LTM), o polímero bis-MPA poliéster-64-hidroxi hiper ramificada - geração 4 (Sigma-Aldrich CAS 326794-48-3), Etanol (CAS 64-17-5), Dimetil sulfoxido deuterado (Sigma-Aldrich CAS 2206-27-1).

Para o complexo a ser formado com o dendrímero foram dissolvidos 300 mg da  $\beta$ -lapachona (BLAP) em 15mL de etanol em um balão de fundo redondo. Com a BLAP completamente solúvel, foram adicionados 100mg do dendrímero, e o sistema ficou sob agitação a temperatura ambiente ao abrigo de luz. Adotaram-se três sistemas, baseados em testes preliminares de agitação de acordo com os períodos de agitação; um dia (BLDD1), três dias (BLDD3) e sete dias (BLDD7) a fim de encontrar a melhor condição para a formação do complexo. Após os períodos, o sobrenadante foi coletado e evaporado em evaporador rotativo com temperatura abaixo de 40°C (HORCAJADA *et al.*, 2006). Os

materiais foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho (FTIR/IV) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ )

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de FTIR e RMN dos complexos originados foram analisados. Diferenças relevantes não foram observadas entre os períodos utilizados, então o complexo de um dia foi selecionado para analisar seus dados de IV. Para o sistema BLDD1, foi possível constatar o aumento da intensidade e largura da banda para as vibrações correspondentes a ligação O-H dos grupos hidroxilas ( $3500 - 3100 \text{ cm}^{-1}$ ). Comparando com o *bis*-MPA foi possível detectar essa banda com baixa intensidade e largura devido as ligações de hidrogênio, inter e intramolecular. Esta informação indica que “algo” está impedindo que as interações ocorram como antes. É possível que a  $\beta$ -lapachona esteja ocupando os espaços existentes no interior da cavidade do dendrímero (ZAGARA e ZIGON, 2011).

Os resultados de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 1) apresentam mudanças no formato dos picos e a posição destes. A incorporação da molécula hóspede nesta macromolécula se baseia em interações não covalentes, por exemplo, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, interações  $\pi$ - $\pi$  entre a molécula hóspede e o núcleo não polar do polímero (KURNIASIH et al., 2015). Os sinais referentes aos complexos BLDD 1,3 e 7 tiveram uma variação de 0,02 – 0,03 ppm quando comparados aos sinais da BLAP, o que pode ser considerado como indícios claros de interação do tipo hóspede-hospedeiro.

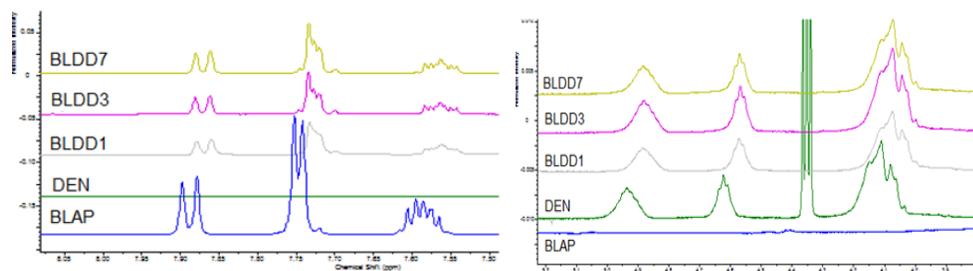


Figura 1 – Ampliação dos sinais da  $\beta$ -lapachona livre e complexada.

A alteração dos sinais do dendrímero também foram notadas como mostra a Figura 1. Os sinais alargados agora aparecem deslocados cerca de 0,03 – 0,05 ppm para campo baixo com relação ao dendrímero não carregado de  $\beta$ -lapachona.

Baseado nas informações descritas pelas análises de RMN  $^1\text{H}$  é possível sugerir algumas interações existente nos complexos BLDD. Estas inferências foram realizadas com base na variação dos deslocamentos químicos da  $\beta$ -lapachona e do DEN. A Figura 2 demonstra algumas das hipóteses de interações entre o dendrímero e a  $\beta$ -lapachona originando o complexo de interesse.

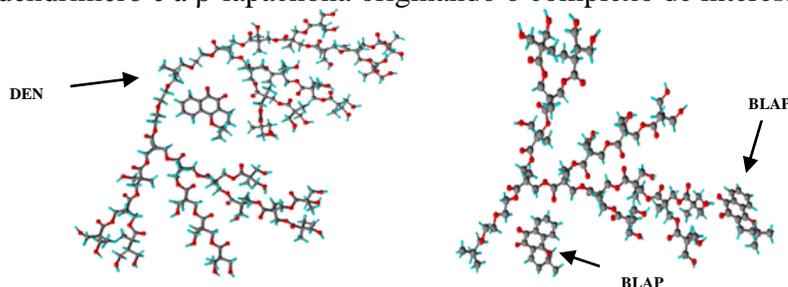




Figura 2 - Possíveis mecanismos de interações para os complexos formados BLDD's.

#### 4. CONCLUSÃO

Os resultados do FTIR associado ao RMN  $^1\text{H}$  sugeriram que os complexos BLDD's tiveram seu sítio de interação relacionado a parte interna do dendrímero onde há regiões hidrofóbicas gerada pelas interações intramoleculares. Após a complexação, estas regiões hidrofóbicas passam a ser ocupadas por moléculas da  $\beta$ -lapachona. Esse tipo de interação pode indicar que as moléculas da  $\beta$ -lapachona encontram-se mais separadas umas das outras, dificultando a formação de uma estrutura sólida com elevada cristalinidade. O que sinaliza uma melhoria da solubilidade deste fármaco.

#### 5. REFERÊNCIAS

- AIRES, A. L., XIMENES, E. C. P. A., SILVA, R. A. R., BARBOSA, V. X., GÓES, A. J. S., PEIXOTO C. A., SOUZA, V. M. O., ALBUQUERQUE, M. C. P. A. Ultrastructural analysis of  $\beta$ -lapachone-induced surface membrane damage in male adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms. *Experimental Parasitology* v.142, p. 83–90, 2014.
- KURNIASIH, I. N., KEILITZ, J., HAAG, R. Dendritic nanocarriers based on hyperbranched polymers; *Chem. Soc. Rev.*, v.44, p.4145—4164, 2015.
- NASONGKLA, A.F. WIEDMANN, A. BRUENING, M. BEMAN, D. RAY, W.G. BORNMANN, D.A. BOOTHMAN, J. GAO, Enhancement of solubility and bioavailability of blapachone using cyclodextrin inclusion complexes, *Pharm. Res.* v.20 p.1626–1633, 2003.
- HORCAJADA, C. SERRE, M. VALLET-REGÍ, M. SEBBAN, F. TAULELLE, G. FÉREY. *Angewandte chemie international.* v. 45, 5974-5978, 2006.
- ZAGARA, E., ZIGON, M., Aliphatic hyperbranched polyesters based on 2,2-bis(methylol)propionic acid—Determination of structure, solution and bulk properties, *Progress in Polymer Science* v.36, p.53–88, 2011.



ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL – PNQM 33

## SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICÂNCER DE ARIL-TIAZOLINONAS

M. V. G. DE OLIVEIRA<sup>1</sup>, L. R. P. DE SIQUEIRA<sup>1,2</sup>, L. P. L. FERREIRA<sup>1,2</sup>, M. O. BARBOSA<sup>1</sup>, G. B. O. FILHO<sup>1</sup>, T. M. DOS SANTOS<sup>2</sup>, F. A. DOS SANTOS<sup>2</sup>, M. G. R. PITTA<sup>2</sup>, M. J. B. M. RÊGO<sup>2</sup> e A. C. L. LEITE<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Planejamento em Química Medicinal - LpQM

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas - LINAT

E-mail para contato: marvicgreoli@gmail.com

*RESUMO – O câncer é uma doença caracterizada por alterações nos mecanismos de controle de divisão e diferenciação celular, e atualmente, é um problema de saúde pública. A maioria dos fármacos disponíveis atualmente para o tratamento apresenta alta toxicidade e, por vezes, são ineficazes, sobretudo pelo crescente surgimento de células tumorais resistentes a múltiplas drogas. Diante disso, o desenvolvimento de protótipos a fármacos anticâncer é necessário e constitui uma linha de pesquisa relevante. O núcleo tiossemicarbazona e seus bioisómeros cíclicos, como as tiazolinonas, são tidas como promissoras e tem apresentado resultados bastante expressivos. O objetivo deste trabalho foi a síntese de três compostos, sendo uma tiossemicarbazona e duas aril-tiazolinonas, planejadas no intuito de se identificar compostos que sejam potentes frente a linhagens tumorais. Além disso, estabelecer a relação estrutura-atividade com a inserção de grupos com diferentes volumes na posição C5 do anel tiazolinona. O composto tiossemicarbazona (**1a**), tido como intermediário e os compostos aril-tiazolinonas (**2a** e **2b**) foram obtidos com rendimentos que variaram de 75% a 90% e todos eles foram caracterizados quimicamente por Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (<sup>1</sup>H-RMN) e Carbono (<sup>13</sup>C-RMN) e Infravermelho (IV). Quanto à atividade biológica, os compostos foram avaliados frente à linhagem MOLT-4 (Leucemia linfoblástica aguda) na concentração de 10 µM, através do ensaio de redução do MTT. Dentre os compostos ciclizados, o **2b** foi responsável pela maior redução da viabilidade com o valor 87,5% de células viáveis e têm como característica estrutural um fenil no C5 do anel tiazolinona.*

*Palavras-chave: Câncer, tiossemicarbazona, bioisómeros, tumorais.*

*ABSTRACT - Cancer is a disease characterized by alterations in the mechanisms of division control mechanisms and cell differentiation, and currently is a public health*



*problem. The majority of currently available drugs for the treatment has high toxicity and, they are sometimes ineffective, especially with the increasing of tumor cells resistant to multiple drugs. Thus, the development of prototypes anticancer drugs is necessary and is an important research area. The thiosemicarbazone group and its cyclical bioisosters, as thiazolinones, are considered promising and has shown very impressive results. This work objective was the synthesis of three compounds, one thiosemicarbazone and two aryl-thiazolinones, planned in order to identify compounds that are potent against tumor cell lines. Besides that, to establish the structure-activity relationship with the inclusion of groups with different volumes at the C5 position of the thiazolinone ring. The thiosemicarbazone compound (1a), considered as an intermediate, and aryl thiazolinones compounds (2a and 2b) were obtained with yields from 75% to 90% and they were chemically characterized by Nuclear Magnetic Resonance Proton ( $^1\text{H-NMR}$ ) and carbon ( $^{13}\text{C-NMR}$ ) and Infrared (IR). Regarding the biological activity, three compounds were evaluated against the MOLT-4 (acute lymphoblastic leukemia) lineage in a concentration of 10  $\mu\text{M}$ , using the MTT reduction assay. It was found that, among the cyclized compounds, the 2b was responsible by the major reduction of cellular viability with the value 87,5% viable cells has like structural feature one phenyl at C5 of thiazolinone ring.*

*Keywords: Cancer, thiosemicarbazone, bioisosters, tumours.*

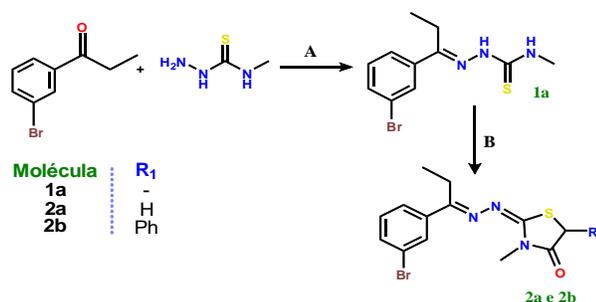
## 1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é um problema de saúde pública, especialmente entre os países em desenvolvimento, onde é esperado que, o impacto do câncer na população corresponda a 80% dos mais de 20 milhões de casos novos estimados para 2025. O câncer é caracterizado por um desvio nos mecanismos de controle que regem a divisão e a diferenciação celular. As células que sofreram transformação neoplásica dividem-se descontroladamente gerando desequilíbrio em diversas vias bioquímicas e imunológicas (KATZUNG, 1994). Muitos dos quimioterápicos disponíveis para o tratamento apresentam problemas quanto à especificidade, potencialidade, além de efeitos indesejados. Dessa forma, a busca por novos fármacos para introdução na terapêutica é de grande importância (INCA, 2014).

As tiossemicarbazonas e seus bioisómeros cíclicos constituem uma importante classe de compostos cujas propriedades têm sido estudadas na Química Medicinal, sendo a atividade antitumoral bastante explorada (BERALDO, 2004). As tiazolinonas possuem relatos de serem potentes inibidores de diversas vias de progressão tumoral e da regulação de proteínas envolvidas no ciclo celular (RICHARDSON, 2002; YU, 2009; QIU, 2012). Diante do exposto, este trabalho apresenta a síntese de três compostos, sendo duas aril-tiazolinonas, e uma tiossemicarbazona. A sua atividade anticâncer foi avaliada frente à linhagem MOLT-4, onde a viabilidade celular foi analisada.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

A rota de síntese está descrita abaixo:



**A)** Tiossemicarbazida em solvente prótico, ultrassom, meio ácido, ~3 horas; **B)** Ácidos e ésteres halogenados em solvente prótico, refluxo, meio básico, ~20 horas.

### MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS E ENSAIO DO PONTECIAL CITOTÓXICO

A linhagem neoplásica humana utilizada neste trabalho foi adquirida via BCRJ (Rio de Janeiro Cell Bank) e acondicionada no Banco de células Tumorais do LINAT (UFPE). A linhagem foi cultivada em garrafa de cultura de células em meio RPMI 1640 (Gibco). As células foram plaqueadas em placa de 96 poços e cada poço recebeu a quantidade de  $1,10^4$  de células. Após 24h, foram colocados todos os compostos na concentração única de  $10\mu\text{M}$ , e as placas foram incubadas por 72h. Posteriormente, foi adicionada solução de MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazoliazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolina). A densidade óptica foi medidas no comprimento de onda de 570nm. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (EL808 - Biotek®). O controle positivo foi o DMSO 0,01%.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O planejamento das aril-tiazolinonas teve como base o composto **1a** e a estratégia utilizada foi o bioisosterismo. Os bioisósteros cíclicos tiveram a inserção de substituintes com diferentes volumes na posição C5 do anel tiazolinona. Os rendimentos variaram de 75% a 91% (**1a** – rendimento = 81%, **2a** – rendimento = 75%, **2b** – rendimento = 90%), e, todos foram caracterizados através de IV, RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$ .

A citotoxicidade dos compostos foi avaliada através do ensaio de redução do MTT, onde é quantificado viabilidade e proliferação celular. Os testes foram executados em célula tumoral em suspensão (MOLT-4), em concentração única de  $10\mu\text{M}$  (**Tabela 1**). Constatou-se que a inserção da fenila na posição C5 do anel tiazolinona foi benéfica para a atividade (**2b**), quando comparada ao seu composto semelhante com a presença de apenas um hidrogênio em C5 (**2a**). A presença de um grupo volumoso em C5 parece ter sido importante na redução da viabilidade celular. Comparando-se os compostos ciclizados à tiossemicarbazona de origem, foi possível constatar que a ciclização não foi



benéfica quanto à redução da viabilidade celular, uma vez que os compostos ciclizados apresentaram valores de viabilidade celular superiores a 76,7%. Assim, a tiosemicarbazona (**1a**) foi o composto, entre os três, que mais reduziu a viabilidade celular, seguido da tiazolinona (**2a**).

Composto	MOLT-4 (Viabilidade %)
<b>1a</b>	76,7
<b>2a</b>	98,8
<b>2b</b>	87,5

Tabela 1: Avaliação *in vitro* dos compostos frente à linhagem tumoral MOLT-4.

## 4. CONCLUSÃO

A síntese dos 3 compostos propostos foi realizada, através de metodologias sintéticas descritas na literatura. As condições reacionais adotadas proporcionaram rendimentos que variaram aproximadamente de 75% a 90%. As estruturas foram confirmadas por métodos espectroscópicos e, todos os compostos foram avaliados na concentração única de 10 $\mu$ M, frente às linhagens MOLT-4. Os resultados demonstraram que a ciclização não proporcionou uma redução significativa da viabilidade celular, porém, foi possível verificar que a inserção de um grupamento volumoso em C5 foi benéfico (**2b**), em relação ao composto com apenas um hidrogênio em C5 (**2a**).

## 5. REFERÊNCIAS

- BERALDO, Heloisa. Semicarbazones and thiosemicarbazones: their wide pharmacological profile and clinical applications. *Química Nova*, vol.27 no.3 São Paulo May/June 2004.
- INCA – Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2014, Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/index.asp?ID=2>. Acesso: 10/2014.
- KATZUNG, B. B.; *Farmacologia Básica e Clínica*, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1994.
- QIU, K. M., et al. Design, synthesis and biological evaluation of pyrazolyl-thiazolinone as potential EGFR and HER-2 kinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2012.
- RICHARDSON, D. R. Iron chelators as therapeutic agents for the treatment of cancer. *Critical Reviews in Oncology Hematology*, 2002. 42 (3): p. 267-281.
- YU, Y., et al. Thiosemicarbazones from the Old to New: Iron Chelators that ribonucleotide reductase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2009. 52 (17): p. 5271-5294.

## 6. AGRADECIMENTOS

A CAPES, ao CNPq, FACEPE e PPGIT.



ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL – PNQM 34

## SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL PELA TÉCNICA DE CG-EM DE UM NOVO AGONISTA $\alpha$ -2 ADRENORECEPTOR (PT-31).

S.S., BARBOZA<sup>1</sup>, PITTA, I. R.<sup>1</sup>, GALDINO-PITTA M. R.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF), Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT SG), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) .

E-mail para contato: [sabrinastbarboza@gmail.com](mailto:sabrinastbarboza@gmail.com)

**RESUMO** – *A busca por novos medicamentos com efeitos analgésicos sobre o SNC tem se mostrado clinicamente relevante, a principal droga utilizada é a morfina, um derivado opióide. No entanto, o uso da morfina apresenta pode causar vários efeitos colaterais indesejados na terapia de dores crônicas, como dependência, depressão entre outros. Como alternativa para o tratamento de dores crônicas o LPSF desenvolveu o 3-(2-cloro-6-fluor-benzil)-imidazolidina-2,4-diona (PT-31), composto que apresenta um perfil analgésico de ação sinérgica com a morfina. Desse modo, o presente estudo teve como objetivo a síntese do composto PT-31 a partir de uma reação de n-alkilação e realizar a caracterização estrutural utilizando a técnica de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM) com a finalidade de avaliar o grau de pureza e o seu padrão de fragmentação. O PT-31 se mostrou puro e o perfil de fragmentação como esperado, o que confirmou que o emprego da técnica de CG-EM é eficaz para análise estrutural e determinação de grau pureza e compostos de baixo peso molecular.*

*Palavras-chaves: Analgésicos; Imidazolidina; CG-EM.*

**ABSTRACT**- *The search for new drugs with analgesic effects on the CNS has been shown to be clinically relevant, the main drug used is morphine a opioid derivative. However the use of morphine can cause several side effects in chronic pain therapy, such as dependency, depression among others. As an alternative for the treatment of chronic pain the LPSF developed the 3-(chloro- 6-fluoro-benzyl)-imidazolidine-2,4-diona (PT-31) compound which has an synergistic analgesic action with morphine. Thus, this study aimed to carry out the synthesis of the PT-31 from an n-alkylation reaction and perform structural characterization using the Gas Chromatography technique coupled to Mass Spectrometry (GC-MS) with the purpose of assessing the degree of purity and fragmentation pattern. The PT-31 proved to be pure and*

*fragmentation profile as expected, confirming that the use of GC-MS technique is effective for structural analysis and purity degree determination of low molecular weight compounds.*

*Keywords: Analgesics; Imidazolidine; GC-MS.*

## 1. INTRODUÇÃO

A dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual, pode ser definida como aguda com breve duração ou crônica que persiste por mais de 6 meses (Hooten et al., 2013; Goodwin et al., 2014). O tratamento da dor crônica nem sempre obtém sucesso mesmo com uma grande variedade de fármacos (Costa et al., 2012). O uso de derivados opióides como a morfina são os fármacos de escolha, mas estão associados a efeitos adversos como a dependência, depressão, alucinações entre outros (Neto, 2016). Como alternativa ao uso de derivados opióides o uso de agonistas  $\alpha$ -2 como exemplo a Clonidina, derivada de imidazol, lipossolúvel, potente ação antinociceptiva com efeitos analgésicos atribuídos à sua ação nas regiões periférica, espinal e supraspinal, com consequente ativação de receptores alfa-2 pós-sinápticos de vias noradrenérgicas descendentes, ativação de neurônios colinérgicos e liberação de óxido nítrico (Kraychete et al., 2016).

O 3-(2-Cloro-6-fluoro-benzil)-imidazolidina-2,4-diona (PT-31) é quimicamente ligado ao 3-benzil-imidazolidina, com perfil analgésico dose-dependente e ação sinérgica com a morfina. Este efeito foi revertido por ioimbina, antagonista não seletivo de  $\alpha$ 2A e por BRL 44408 um antagonista de receptor adrenérgico seletivo- $\alpha$ 2A. A combinação de morfina e PT-31 produz uma maior atividade do que a morfina isolada e a análise revelou uma interação sinérgica entre estes compostos. Resultados de ancoragem confirmam a elevada afinidade do ligante PT-31 no  $\alpha$ 2A-adrenoceptores (Sudo, 2010; WO 2008134840 A2). Neste contexto o presente estudo tem como finalidade a síntese e caracterização estrutural através de CG-EM do composto PT-31.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

O PT-31 foi sintetizado através de uma reação de *n*-alquilação a partir da hidantoína, utilizando Hidróxido de Sódio como base e em seguida adicionando o Cloreto de 2-cloro-6-fluorbenzil, utilizando como solventes da reação metanol e tetrahidrofurano na mesma proporção. A reação foi mantida a 55° C, sob agitação a 450 rpm por 24 horas, sendo acompanhada por CCD (Sudo, 2010). Para sua caracterização, foi utilizada a técnica de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas. A amostra foi solubilizada em acetonitrila na proporção de 0,1 mg/mL, e passadas para vaio através de filtro. Foram aplicadas em coluna Restek rtx-5 de dimensões 30m x 0.25mm x 0.25 $\mu$ m, de um Cromatógrafo Gasoso associado a Espectrômetro de Massas modelo QP-2010 (Shimadzu), utilizando como gás de arraste o Hélio. A temperatura de aplicação da solução com amostra foi de 310°C com progressão da temperatura, o termino na corrida ocorreu em 30 minutos.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da metodologia empregada para a síntese do PT-31 a reação foi finalizada após 24 horas. Os cristais do PT-31 gerados apresentaram coloração esbranquiçada com aspecto arenoso, com

rendimento de 20%, peso molecular de 242,63 g/mol e Log P de 1,56. Após pesagem e cálculo do rendimento, cerca de 1 mg foi levado para análise por CG-EM, o qual apresentou tempo de retenção em 14,64 minutos e 100% de pureza de acordo com o cromatograma (Figura 1).

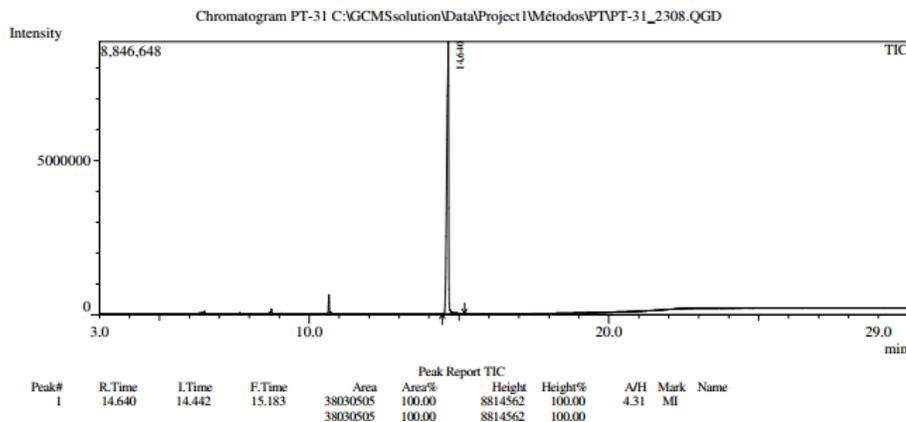


Figura 1- Cromatograma do PT-31 obtido através da Cromatografia Gasosa

De acordo com o espectro de massas (Figura 2), não foi possível identificar o íon molecular ( $M^+$ ) do PT-31 (242,63m/z), uma vez que após a ionização da molécula houve a rápida formação de um fragmento mais estável (207m/z) através da perda de um átomo de Cloro, conferindo-lhe 100% de intensidade. Este fenômeno ocorreu, pois, elétrons não ligantes são os primeiros a serem afetados pelo método de Impacto de Elétrons (IE). Além disso, por ele estar ligado a um anel aromático, a quebra da sua ligação pode ser estabilizada pela ressonância do anel. Os outros fragmentos considerados de importância, ou seja, com intensidade acima de 15%, foram identificados como o íon tropílio contendo um átomo de cloro e um de flúor (143m/z) e um fragmento de 179m/z, com intensidades de 20,02% e 19,02%, respectivamente, como mostra a Figura 2. O mecanismo de obtenção do íon tropílio substituído ocorreu através da quebra da ligação alquila e consequente deslocalização aromática identificado pelo pico de 143 m/z, como mostra a Figura 3.

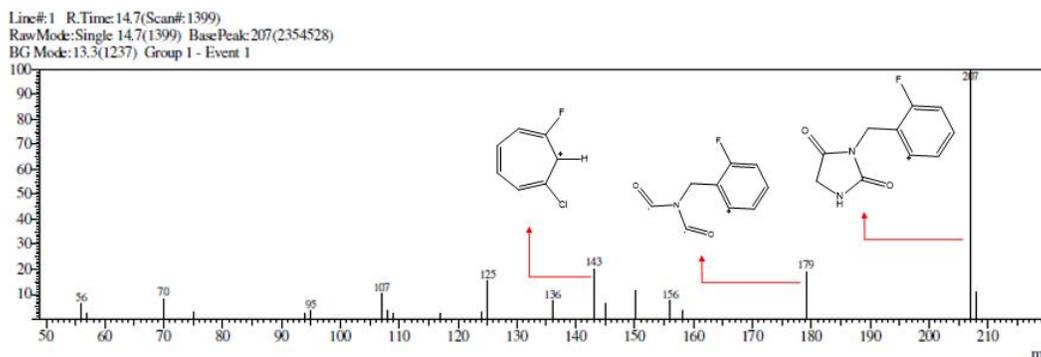


Figura 2 – Espectro de Massas do PT-31 demonstrando seus principais fragmentos.

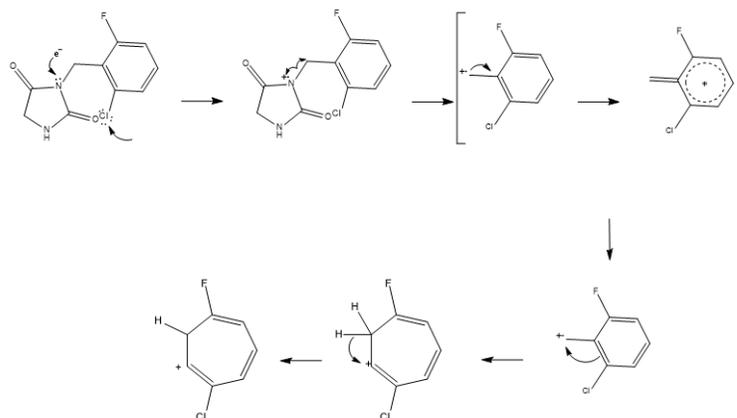


Figura 3 – Provável mecanismo de formação do íon tropílio, pico 143(m/z).

## 4. CONCLUSÃO

A metodologia de síntese aqui empregada foi considerada eficiente devido ao grau de pureza satisfatório demonstrado pela análise da técnica de CG-EM. Também foi possível confirmar sua estrutura química através do seu perfil de fragmentação obtido pelo Espectrômetro de Massa o que enfatiza que a técnica de CG-EM é bastante eficaz na análise de moléculas de baixo peso molecular .

## 5. REFERÊNCIAS

- NETO, I. G. Morphine Manifesto. *Acta Médica Portuguesa*, v. 29, n. 3, p. 161-163, 2016.
- HOOTEN, W., TIMMING, R., BELGRADE, M., GAUL, J., GOERTZ, M., HAAKE B, *et al.* Assessment and Management of Chronic Pain. *Institute for Clinical Systems Improvement*, p. 106, 2013.
- GOODWIN P, BRUERA E, STOCKLER M. Pain in patients with cancer. *J Clin Oncol.*;32(16):1637–9, 2014.
- COSTA, A.I.S., CHAVES, M.D. Dor em pacientes oncológicos sob tratamento quimioterápico. *Rev Dor*;13(1):45–9, 2012.
- KRAYCHETE, D. C., PALLADINI, M. C., CASTRO, A. P. C. R. Topic drug therapy for neuropathic pain. *Revista Dor*, 17, 95-97,2016.
- ROCHA PITTA IVAN DA, CARMO ALVES DE LIMA MARIA DO, DA SILVA TERESINHA GONÇALVES, SUDO GISELE ZAPATA, GALDINO SUELY LINS, SUDO ROBERTO TAKASHI. "Compound with anethetics activity, methods for its production and pharmaceutical compositions comprising the same".WO 2008134840 A2. Data de depósito: 5 maio 2008.
- SUDO, R.T., CALASANS-MAIA, J.A., GALDINO, S.L., LIMA, M.C.A., ZAPATA-SUDO, G., HERNANDES, M.Z., PITTA, I.R. Interaction of Morphine With a New  $\alpha 2$ -Adrenoceptor Agonist in Mice. *The Journal of Pain*, Vol 11, No 1 (January),: pp 71-78, 2010.

## 6. AGRADECIMENTOS

À Facepe, Nupit-SG e LPSF.



ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL – PNQM 36

## ABORDAGENS METODOLÓGICAS DA SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO POR CG-EM DATIAZOLIDINA-2,4-DIONA

QUENTAL ALVES, R.<sup>1</sup>, ALMEIDA, M. L.<sup>1</sup>, TEIXEIRA, D. R. C.<sup>1</sup>, PITTA, I. R.<sup>1</sup>, GALDINO-PITTA M. R.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco.

E-mail para contato: [romuloufpe1@gmail.com](mailto:romuloufpe1@gmail.com)

*RESUMO-* As tiazolidina-2,4-dionas (TZDs) formam uma classe de moléculas derivadas da Tiazolidina, que apresentam importantes bioatividades, como hipoglicemiantes e antineoplásicas, e têm sido intensamente estudadas por seu envolvimento na regulação de diferentes processos biológicos. A tiazolidina-2,4-diona pode ser obtida a partir de uma reação de ciclização utilizando ácido monocloraacético e a tiouréia, em meio aquoso. Existem também outras maneiras de se obter a TZD reportadas na literatura, como, reação do ácido monocloraacético e um tiocarbamato, e o tratamento do produto da reação entre cloroacetato de etila e tiocianato de potássio com ácido clorídrico diluído. O objetivo deste trabalho é elaborar um levantamento de dados das diferentes metodologias utilizadas para síntese da TZD e, através deste, verificar quais os parâmetros utilizados nas reações que mais interferem nos rendimentos.

*Palavras-chaves:* Tiazolidina-2,4-diona; Química Medicinal; Building Bloks

*ABSTRACT -* The thiazolidine-2,4-diones (TZDs) are a class of molecules of thiazolidine derivatives which have important bioactivities as hypoglycemic and antineoplastic, and have been intensely studied for its involvement in the regulation of different biological processes. Thiazolidine-2,4-dione can be obtained from a cyclization reaction using monochloroacetic acid and thiourea in an aqueous medium. There are also other ways of obtaining the TZD reported in the literature, such as monochloroacetic acid and thiocarbamate reaction, and the product treatment between ethyl chloroacetate and potassium thiocyanate with dilute hydrochloric acid. The aim of this work is to develop a data survey of the different methodologies used for TZD synthesis and, through this, verify which parameters used in the reactions more interfere in yield.

*Keywords:* Thiazolidine-2,4-dione; Medicinal Chemistry; Building Bloks

### 1. INTRODUÇÃO



As tiazolidina-2,4-dionas (TZDs) são derivadas da tiazolidina que faz parte de um grupo importante de compostos heterocíclicos (J. G. LIMA, 1998). Além disso elas são importantes Building Bloks, isto é, apresentam reatividades que permite a obtenção de variados produtos finais. A molécula de tiazolidina-2,4-diona é constituída por um anel pentagonal, contendo um átomo de enxofre e um de nitrogênio nas posições 1 e 3, respectivamente, e duas carbonilas na posição 2 e 4 (GALDINO-PITTA *et al.*, 2013).

Existem diferentes formas de obtenção da tiazolidina e derivados reportados na literatura. A 1,3-tiazolidina-2,4-diona pode ser sintetizada diretamente do ácido 2-cloroacético com a tiouréia por uma reação de ciclização, usando como solvente ácido clorídrico (HCL) ou água (Meng *et al.*, 2016), ou pela reação do ácido monocloroacético com tiocarbamatos. Este último foi obtido pela reação de amoníaco e oxissulfeto de carbono em presença de uma base. A tiazolidina-2,4-diona pode ser preparada também com tratamento do produto da reação entre os reagentes, cloroacetato de etila e o tiocianato de potássio, utilizando ácido clorídrico diluído (LIMA, J. G. 1998 apud BRONW, F. C., 1961).

O Laboratório Planejamento e Síntese de Fármacos do Núcleo de Pesquisa em inovação Terapêutica Suely Galdino (LPSF/NUPIT-SG) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) desenvolve pesquisas que abordam o planejamento e síntese de novos compostos derivados da tiazolidina-2,4-diona com grandes potenciais bioativos. A equipe do LPSF obtém o produto TZD a partir da reação entre a tiouréia e o ácido monocloroacético diluídos em uma solução aquosa e mantidos sob agitação aquecidos até estabilizar na temperatura ideal da reação (GALDINO-PITTA *et al.*, 2013)

Este trabalho tem por objetivo elaborar um levantamento de dados das diferentes metodologias utilizadas pela equipe do LPSF e, através deste, verificar quais os parâmetros utilizados nas reações que mais interferem no rendimentos. Ademais, a validação estrutural da TZD será executada pela técnica analítica de Cromatografia Gasosa associada à Espectrometria de Massas (CG-EM).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para o levantamento de dados literários foi usado essencialmente a plataforma online de pesquisa SciFinder, A cas solution, e também foram reunidas as anotações das metodologias de síntese dos Cadernos de Laboratório dos pesquisadores que trabalham com TZDs no LPSF/NUPIT-SG.

A metodologia geral utilizada para síntese de TZD do LPSF/NUPIT-SG consistem em: o ácido monocloroacético é diluído em água destilada, e despejado em um balão de duas bocas (250ml) contendo a Tiouréia. Esta solução é mantida sob refluxo constante e também é aquecida até que atinja a temperatura ideal de reação (SILVA *et al.*, 2013).

A metodologia usada para a elucidação estrutural da TZD pelo CG-EM foi a seguinte: as amostras foram solubilizadas em acetonitrila (ACN) na proporção de 0,2 mg/mL, e passadas através de filtro. As amostras foram aplicadas em coluna Restek rtx-5 de dimensões 30m x 0.25mm x 0.25µm, de um Cromatógrafo Gasoso associado a Espectrômetro de Massas modelo QP-2010 (Shimadzu), com o gás hélio servindo de fase móvel. A temperatura de aplicação da solução com amostra foi de 310°C, e a progressão da temperatura durante a passagem do material é apresentada a seguir: 0,01 min - 1 min: Temperatura Final (TF): 40°C sem variação; 1 min - 7 min: TF=160°C

variação de 20°C/min; 7 min - 22 min: TF=310°C variação de 10°C/min; 22 min - 30 min: TF=310°C sem variação; 30 min - Fim da corrida.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo Meng G. *et al.*, 2016, foi possível otimizar a síntese da tiazolidina-2,4-diona(TZD) reagindo Tiouréia e ácido monocloroacético diluído em água, com proporção de 6,67 mol/L, com tempo de reação de 10h, e obter o rendimento de 90% . Este resultado foi estabelecido por experimentos que basearam-se solubilização dos reagentes como variável, usando água e HCl como solventes. Isto evidencia que, alguns parâmetros reacionais influenciam no rendimento da TZD.

Visando usar essa conclusão, os dados das metodologias dos cadernos dos pesquisadores do LPSF/NUPIT-SG foram coletados para elaborar uma tabela, a qual estão listados os possíveis parâmetros reacionais que podem influenciar o rendimento da TZD (**Tabela 1**). Para construir a tabela foram selecionados 10 experimentos de síntese da TZD com os melhores rendimentos identificados nos Cadernos de Laboratório. Cada experimento foi nomeado com um código (lote) e foram comparados aos pares (Ex: 1 e 2, 2 e 3...9 e 10).

Tendo como base a síntese de TZD apresentada anteriormente, os seguintes parâmetros influenciadores dos experimentos de escolha foram determinados: volume do solvente e tratamento da TZD.

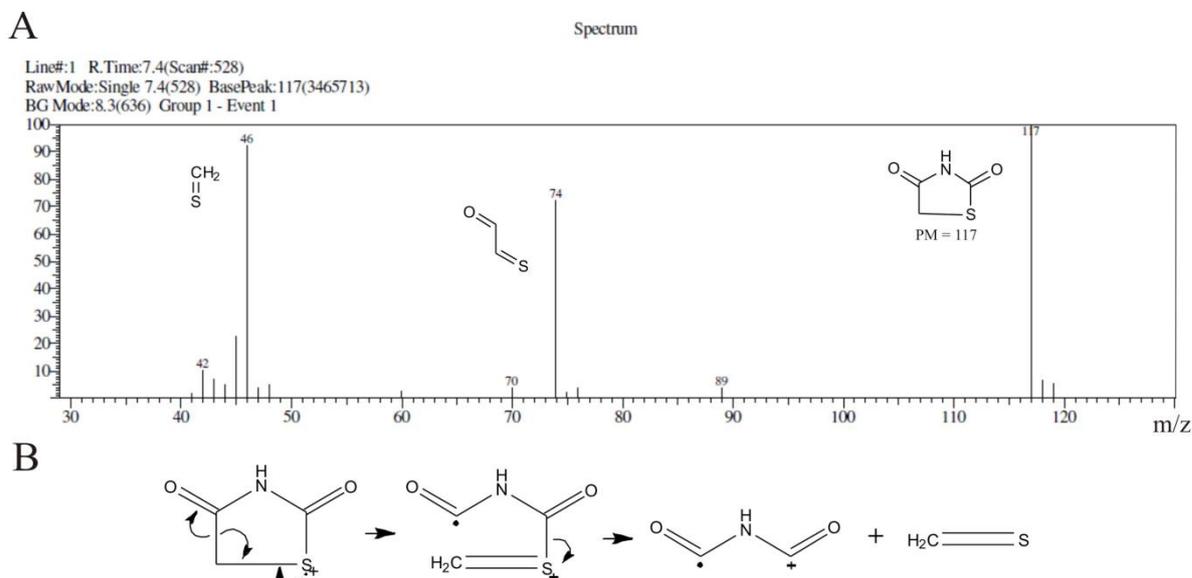
Lote	Solvente (ml)	Tratamento	Tempo de reação(h)	Rendimento (%)
170314	50	Resfriado em temperatura ambiente e estocado na geladeira.	48	60
280514	50	Resfriado em temperatura ambiente e estocado na geladeira.	24	61,7
300715	120	Estocado diretamente na geladeira	24	63,7
141014	120	Estocado diretamente na geladeira	24	65,9
050115	100	Estocado diretamente na geladeira	24	68,86
270514	50	Resfriado em temperatura ambiente e estocado na geladeira.	24	69,5
180314	50	Resfriado em temperatura ambiente e estocado na geladeira.	48	69,63
311014	120	Estocado diretamente na geladeira	24	69,7
170314	50	Estocado diretamente na geladeira	48	71,92
250914	100	Estocado diretamente na geladeira	24	81,57

**Tabela 1.** Parâmetros reacionais dos experimentos. Parâmetros constantes para todos os lotes: Temperatura de reação: 90°C; Proporção dos reagentes: 1 mol de tiouréia para 1,5 mol de ácido cloroacético.

Os parâmetros identificados nos lotes com maior rendimento e menor tempo de reação foram, volume de solvente maior ou igual 100 e com tratamento de resfriamento em temperatura ambiente e com estocagem na geladeira.

Para a execução da validação estrutural, uma amostra de tiazolidina-2,4-diona pura foi analisada por CG-EM, e o padrão de fragmentação da molécula está apresentado na Figura 1. O

pico de  $m/z=117$  corresponde a molécula de TZD. Além deste, o fragmento de  $m/z=46$  representa um fragmento estável da TZD. Ele pode ter sido originado a partir de uma segmentação  $\alpha$  da ligação do carbono  $\alpha$ (C5) e seguida de uma segmentação induzida da ligação do enxofre (S) e o carbonila (OC-R).



**Figura 1** – A. Espectro de Massas por IES do TZD ( $M = 117$ ). Identificação do fragmento de  $m/z 46$  e  $74$ ; B. Possível mecanismo de reação do fragmento de  $m/z 46$ .

#### 4. CONCLUSÃO

A reação de ciclização entre a tiouréia e o ácido monocloroacético em meio aquoso, é método de escolha para síntese da TZD. A partir deste estudo foi concluído que os fatores, solubilização dos reagentes e o tratamento do TZD influenciam no tempo de reação e o rendimento. E em um futuro. Pode-se testar a metodologia na qual os reagentes são solubilizados em 100 ou mais mililitros de água destilada (partindo-se de 5g do reagente limitante) e ter o produto tratado com resfriamento em temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}$ ) com estocagem na geladeira, para se obter rendimentos melhores e em menor tempo de reação.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ROCHA PITTA, M. G. et al. Synthesis and in vitro anticancer activity of novel thiazacridine derivatives. *Medicinal Chemistry Research (Print)*, v. 22, p. 2421-2429, 2013.
- J. G. LIMA. Some chemical Aspects of the ring thiazolidine-2,4-dione. *Rev. Univ. Sér. Ciênc. Exatas e da Terra*, v. 18/20(1/2), p. 1–8 – 11, Agosto 1998. Citado na página
- MENG, G.; Zheng, M.; Dong, M.;Gao, Y.; Zheng, A.; Li1, Z.; Hu1, R.; Synthetic optimization of rosiglitazone and related intermediates for industrial purposes. *Res Chem Intermed*, v. 42, p. 2023–2033 –, 2016.
- SILVA, R. D. et al.. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas do composto candidato a fármaco anticâncer LPSF/AA-3. In: 3o Encontro Brasileiro para Inovação Terapêutica, 2013, Jaboatão dos Guararapes. Anais do 3o EBIT, 2013.

#### 6. AGRADECIMENTOS

Ao NUPIT SG, UFPE, INCT-if, FACEPE, CNPq e CAPES pela infraestrutura e pelo suporte financeiro.



ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL – PNQM 37

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DE NOVOS DERIVADOS HÍBRIDOS DE FTALIMIDA E TIAZOL

L. P. L. FERREIRA<sup>1,2</sup>, A. R. de OLIVEIRA<sup>1</sup>, L. R. P. de SIQUEIRA<sup>1,2</sup>, M. O. BARBOSA, M. V. O. SILVA<sup>1</sup>, F. A. dos SANTOS<sup>2</sup>, M. G. R. PITTA<sup>2</sup>, M. J. B. M. RÊGO<sup>2</sup> e A. C. L. LEITE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Planejamento em Química Medicinal - LpQM

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas - LINAT

E-mail para contato: lalapelagia@hotmail.com

**RESUMO** – *O câncer é um problema de saúde pública de impacto mundial, caracterizada pela proliferação celular descontrolada com capacidade de invasão de tecidos e órgãos devido à capacidade de burlar processos regulatórios das células normais. A maioria dos fármacos utilizados na terapia antineoplásica age de forma inespecífica e ineficaz, podendo ocasionar resistência de forma que o agente antitumoral se mostra ineficaz em controlar o tumor sem causar toxicidade excessiva. O objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade de derivados de ftalimidas e tiazóis frente a células neoplásicas e não neoplásicas in vitro para posterior estabelecimento dos mecanismos de ação intracelulares dos novos protótipos. Os três compostos se mostraram pouco ou não citotóxicos em célula saudáveis nas concentrações testadas. Porém, a citotoxicidade frente às células neoplásicas não se mostrou capaz de reduzir a viabilidade celular a valores inferiores a 59% não justificando submeter a novos ensaios para estabelecimento do mecanismo de ação intracelular dos compostos.*

**Palavras-chave:** Câncer, Ftalimida, Tiazol.

**ABSTRACT** - *Cancer is a public health problem worldwide impact, characterized by uncontrolled cell proliferation with tissue invasiveness and organs due to the ability to circumvent regulatory processes of normal cells. Most drugs used in antineoplastic therapy acts unspecifically and ineffectively and can cause resistance so that the antitumor agent has proven ineffective in controlling the tumor without causing excessive toxicity. The objective of this study was to evaluate the cytotoxicity of phthalimides derivatives and thiazoles against cancer cells in vitro and non-neoplastic for subsequent establishment of intracellular mechanisms of action of new prototypes. All three compounds showed little or no cytotoxic to healthy cells at the concentrations tested.*

*However, the front cytotoxicity to tumor cells was not capable of reducing cell viability to below 59% justifying not undergo further tests to establish the intracellular mechanism of action of the compounds.*

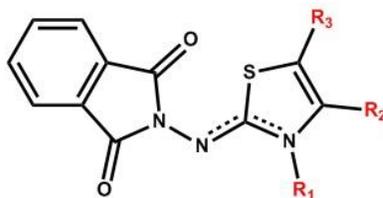
*Keywords: Cancer, Phtalimide, Thiazole.*

## 1. INTRODUÇÃO

Câncer é uma variedade de doenças relacionadas a condições de proliferação celular não programada, de forma rápida, agressiva e incontrolável, com capacidade de invadir tecidos e órgãos. Dentre as causas incluem predisposição genética, influências ambientais, agentes infecciosos e envelhecimento, burlando processos reguladores e efetores das células normais. A resistência inicial ou adquirida aos fármacos antineoplásicos são múltiplas e complexas limitando a sua eficácia no tratamento. Atualmente, o câncer é considerado uma causa de morte mais comum do século XXI. (Pulverer, 2001; Tannock, 2014).

As Ftalimidias e Tiazóis são grupos de destaque para a criação de novas moléculas biologicamente ativas, para diversos tipos de tratamento, proporcionando novas alternativas ao tratamento do câncer. (Santos, 2004) Compostos com grupamento ftalimídico possuem efeito farmacológico imunomodulatório, inibindo da produção do Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ), efetivo mediador em processos inflamatórios e tumorais. (Pessoa *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2010) Outra classe de compostos heterocíclicos bastante pesquisada são os tiazóis, que possui um anel de cinco membros que contém três carbonos, um átomo de enxofre e um átomo de nitrogênio, sendo conhecidas potentes atividades biológicas tais como: antimicrobiana, antiviral e atividade antitumoral promovendo inibição do crescimento e proliferação de células tumorais. (Kashyap *et al.*, 2011; Lima Leite *et al.*, 2006) Diante do exposto, este trabalho apresenta a atividade antitumoral de três compostos derivados de ftalimidias e tiazóis testados frente à linhagem de células normais PBMC e à linhagem tumoral MOLT-4, onde as viabilidades foram analisadas.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS



A) Protótipo do derivado Ftalimidol-Tiazol

A avaliação da atividade biológica *in vitro* dos derivados ftalimidol-tiazóis sintetizados no Laboratório de Planejamento em Química Medicinal (LpQM) foram realizadas no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), ambos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

### ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS NÃO NEOPLÁSICAS E NEOPLÁSICAS

O estudo de citotoxicidade foi avaliado pelo método MTT [3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-

H-brometo de tetrazolium].

**CÉLULA NÃO NEOPLÁSICA** - Realizada em PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells). O sangue periférico foi coletado em 3 tubos com heparina para cada paciente. Foi separado pelo método Ficoll o anel de PBMC e ressuspendida em meio RPMI 1640 contendo Soro Fetal Bovino a 10%, contado na câmara de Neubauer, plaqueadas em placa de 96 poços, cada poço contendo  $5 \times 10^5$  células, com controle Branco e controle DMSO à 0,01%, em triplicata, foram adicionados os compostos na concentração de 10 e 100 $\mu$ M, respectivamente, incubadas na estufa úmida a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, por 48h, onde foi adicionada a solução de MTT em cada poço e após 3h adicionado a solução de SDS à 20%. Aguardou-se 24h para leitura da absorbância por espectroscopia a 570nm no leitor de microplacas EL808 - Biotek®.

**CÉLULA NEOPLÁSICA** - Realizado na linhagem neoplásica humana MOLT-4 (Leucemia Linfoblástica Aguda) adquirida via Banco de Células do Rio de Janeiro, acondicionadas no Banco de Células Tumerais do LINAT (UFPE). Cultivada em garrafa de cultura em meio RPMI 1640 contendo Soro Fetal Bovino a 10%, plaqueadas em placa de 96 poços, cada poço com  $3 \times 10^4$  células, controle Branco, controle DMSO à 0,01%, em triplicata. Após 24h em estufa úmida a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, foram adicionados os compostos na concentração de 10 $\mu$ M, incubada por 48h, seguido da adição da solução de MTT e após 3h foi acrescida a solução de SDS à 20%. Aguardou-se 24h para leitura da absorbância por espectroscopia a 570nm no leitor de microplacas EL808 - Biotek®.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os quimioterápicos utilizados na terapia anticâncer atua de forma inespecífica, lesionando as células malignas e normais que acarreta os diversos efeitos adversos, considerado como um problema na terapêutica. Desse modo, a avaliação citotóxica de células normais (Tabela 1) é de grande importância para estabelecer o perfil de segurança e seletividade dos novos derivados, estabelecendo margens aproximadas de segurança e concentração não tóxica. (Anjos, 2010; Silva & Comarella, 2013)

<i>Composto</i>	<i>Dose (<math>\mu</math>M)</i>	<i>Exp 1 (%)</i>	<i>Exp 2 (%)</i>	<i>Exp 3 (%)</i>	<i>Média (%)</i>	<i>DP</i>
<i>AD</i>	10	94	75	82	83,67	9,61
	100	100	71	86	85,67	14,50
<i>ADH</i>	10	100	88	82	90	9,17
	100	100	75	86	87	12,53
<i>AO</i>	10	100	74	93	89	13,45
	100	100	96	94	96,67	3,06

Tabela 1: Avaliação *in vitro* dos compostos frente às células PBMC.

A citotoxicidade foi realizada frente à cultura de uma linhagem neoplásica (Tabela 2), em concentração única de 10 $\mu$ M, onde os compostos não se mostraram capazes de reduzir a viabilidade celular, por não apresentar valores inferiores a 59% portanto não serão submetidos a novos ensaios posteriormente.

<i>Composto</i>	MOLT-4 (Viabilidade %)
<i>AD</i>	100%
<i>ADH</i>	87%
<i>AO</i>	95%

Tabela 2: Avaliação *in vitro* dos compostos frente à célula tumoral MOLT-4.

#### 4. CONCLUSÃO

A avaliação da viabilidade de células da PBMC *in vitro* se mostrou pouco citotóxico, sendo mais segura. A avaliação da viabilidade da célula tumoral *in vitro* mostrou-se pouco citotóxico, pouco eficaz, não se mostrando eficaz em reduzir a viabilidade celular a valores inferiores a 59% não justificando submeter a novos ensaios para estabelecimento do mecanismo de ação intracelular dos compostos.

#### 5. REFERÊNCIAS

- ANJOS, A. C. Y. As representações do cuidar do idoso em quimioterapia oncológica na vida do familiar cuidador. Tese (Doutorado), Ribeirão Preto, PPGEF/USP, 2010.
- KASHYAP, Shiv Jee; GARG, Vipin Kumar; SHARMA, Pramod Kumar; KUMAR, Nitin; DUDHE, Rupesh; GUPTA, Jitendra Kumar. Thiazoles: having diverse biological activities. *Medicinal Chemistry Research*, v. 21, n. 8, p. 2123–2132, 28 jun. 2011.
- Santos LM, Barbosa FF, de Oliveira Cardoso MV, Moreira DR, de Souza IA.
- LIMA LEITE, Ana Cristina; SANTOS, L. M.; BARBOSA, F. F.; de OLIVEIRA CARDOSO, M. V.; MOREIRA, D. R.; de SOUZA I. A.. Synthesis of aminoacyl thiaolidones as potential antitumour agents. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomédecine & pharmacothérapie*, v. 60, n. 3, p. 121–6, abr. 2006.
- PESSOA, Cláudia; FERREIRA, P.M.; LOTUFO, L. V.; de MORAES, M. O.; CAVALCANTI, S. M.; CÔELHO, L. C.; HERNANDES, Marcelo Zaldini; LEITE, Ana Cristina Lima; COSTA, V. M.; SOUZA, V. M.. Discovery of Phthalimides as Immunomodulatory and Antitumor; *Drug Prototypes*. p. 523 – 528, 2010.
- PULVERER, Bernd. Cancer; *Nature* [0028-0836]; vol:411 iss:6835 pg:335, 2001.
- SANTOS, Thiago André Ramos dos. Avaliação da atividade anticâncer e imunomoduladora de derivados de ftalimidas, hidrazonas e tiazóis. Dissertação (Mestrado). 2014.
- SHARMA, U. *et al.* Recent advances in the chemistry of phthalimide analogues and their therapeutic potential. *Mini reviews in medicinal chemistry*, v. 10, n. 8, p. 678–704, jul. 2010.
- SILVA, Franciele Cristine Marcon Da; COMARELLA, Larissa. Efeitos Adversos Associados À Quimioterapia Antineoplásica: Levantamento Realizado Com Pacientes De Um Hospital Do Estado Do Paraná; *Revista Uniandrade* [1519-5694], vol:14 iss:3 pg:263 -277, 2013.
- TANNOCK, Ian. Cancer: Resistance through repopulation; *Nature* [0028-0836], 2014.

#### 6. AGRADECIMENTOS

A CAPES, CNPQ, FACEPE e PPGIT/UFPE.



ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL – PNQM 38

## SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA DE UM NOVO AGONISTA PARCIAL DE PPAR- $\gamma$ (GQ-16)

D.R.C. TEIXEIRA<sup>1</sup>, I.R. PITTA<sup>1</sup> e M.R. GALDINO-PITTA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Planejamento e síntese de Fármacos (LPSF), Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT SG), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

E-mail para contato: cravo.diego@gmail.com

**RESUMO** – *O uso de Tiazolidinedionas (TZDs), agonistas parciais dos Receptores Proliferadores Peroxisomais Ativados Gama (PPAR $\gamma$ ) no tratamento da diabetes melitus do tipo 2 tem se mostrado bastante eficiente, porém com efeitos colaterais indesejados, como ganho de peso, edema e cardiotoxicidade. O composto 5-(5-bromo-2-metoxi-benzilideno)-3-(4metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (GQ-16) tem se mostrado um bom candidato a fármaco, já que apresenta atividade antidiabética semelhante a outras TZDs, mas sem induzir ganho de peso ou edema. O presente trabalho teve como objetivo a síntese do composto GQ-16 e sua caracterização estrutural pela técnica de cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa (CG-EM). O GQ-16 apresentou uma pureza de 100%, por cromatografia gasosa e teve um padrão de fragmentação esperado, sendo as principais um rearranjo de MacLafferty e uma segmentação  $\alpha$  seguida de uma segmentação induzida.*

**ABSTRACT** - *The use of Thiazolidinediones (TZDs), partial agonists of peroxisomal Proliferator Activated Receptor Gamma (PPAR $\gamma$ ) in the treatment of diabetes mellitus Type 2 has proven quite efficient, but with undesirable side effects, like weight gain, edema and cardiotoxicity. The compound 5- (5-bromo-2-methoxy-benzylidene) -3- (4-methyl-benzyl) thiazolidine-2,4-dione (GQ-16) has proved to be a good drug candidate, since it has antidiabetic activity like other TZDs but without inducing weight gain or edema. This study aimed the synthesis of GQ-16 compound and its structural characterization by gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC-MS). The GQ-16 showed a purity of 100% by gas chromatography, and had an expected fragmentation pattern, the main one is a MacLafferty rearrangement and a  $\alpha$  segmentation followed by an induced segmentation.*



## 1. INTRODUÇÃO

As Tiazolidinedionas (TZDs), agonistas dos Receptores Proliferadores Peroxisomais Ativados gama (PPAR $\gamma$ ), representam uma classe farmacológica atualmente utilizada no tratamento da diabetes mellitus do tipo 2, que melhoram a resistência à insulina e são eficazes na prevenção da progressão de doença renal em diferentes modelos experimentais. Esta proteção parece ser secundária ao efeito anti-inflamatório das TZDs (Sarafidis e Bakris, 2006). Infelizmente, estes ligantes também apresentam efeitos colaterais indesejáveis, tais como ganho de peso, edema e cardiotoxicidade. No Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF) da UFPE foi desenvolvido um promissor agonista parcial de PPAR $\gamma$ , o 5-(5-bromo-2-metoxi-benzilideno)-3-(4metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (GQ-16) (PI 0601826-2. 2006), que apresenta atividade antidiabética semelhante a outras TZDs, mas sem induzir ganho de peso ou edema (Choi et al., 2010; Amato et al. 2012; Martini, 2012). Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo a síntese e caracterização estrutural do composto GQ-16 por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (CG-EM).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

A síntese do GQ-16 se deu pela reação de adição de Michael do 3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (GQ-01), dissolvido em etanol anidro, com o Éster 3-(5-bromo-2-metoxi-fenil)-2-ciano-acrílico (IP-23) na presença de morfolina como catalisador. A mistura reacional foi mantida a uma temperatura de 60°C, sob agitação de 500 rpm por 8 horas, e foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (CCD). Para a caracterização por CG-EM (modelo QP-2010; Shimadzu), a amostra foi solubilizada em acetonitrila na proporção de 0,1 mg/mL, filtrada, e, posteriormente, transferidas para vazio. A amostra passou por uma coluna Restek rtx-5 com dimensões de 30m x 0.25mm x 0.25 $\mu$ m, tendo Hélio como gás de arraste. A temperatura de aplicação da solução com amostra foi de 300°C com progressão da temperatura. A corrida durou 40 minutos.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da análise por CG-EM podemos observar que o composto GQ-16 teve um tempo de retenção de 24.581 minutos e pureza de 100%, de acordo com o cromatograma abaixo (Figura 1).

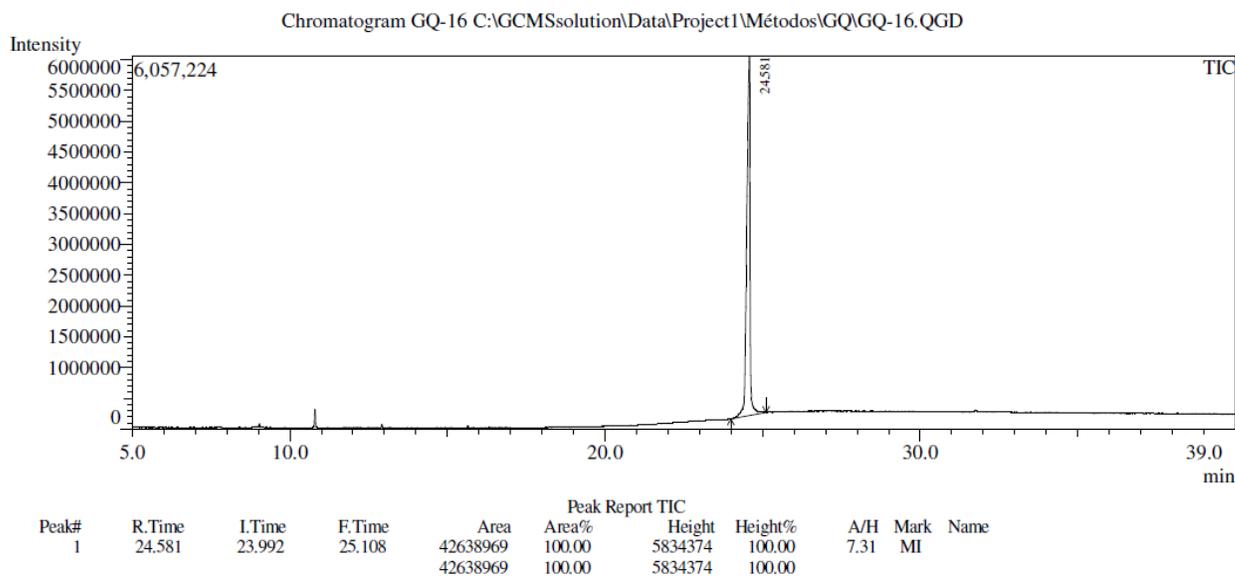


Figura 1 - Cromatograma do composto GQ-16

A partir do espectro de massas (Figura 2), podemos observar os íons moleculares M ( $m/z = 416,80$ ) e M+2 ( $m/z = 418,80$ ) do composto GQ-16, com intensidades relativa de 23.77% e 24.47% respectivamente. Estes íons moleculares de intensidades relativas similares são característicos de moléculas que possuem o átomo de Bromo, que possui dois isótopos de massas 79 e 81, com abundância natural de 50,69% e 49,31% respectivamente. O pico base identificado no espectro apresentou  $m/z = 105$ , com intensidade relativa de 100%, que pode ter sido formado pelo rearranjo de MacLafferty, com a formação do íon tropílio (Figura 3A). Outro pico de grande relevância é o pico de  $m/z = 243,80$ , com intensidade relativa de 14.95%. Este pico pode ter sido formado por uma segmentação  $\alpha$  da quebra da ligação com carbono  $\alpha$  (C5) e em seguida, uma segmentação induzida da ligação entre o enxofre e o carbono da carbonila (Figura 3B).

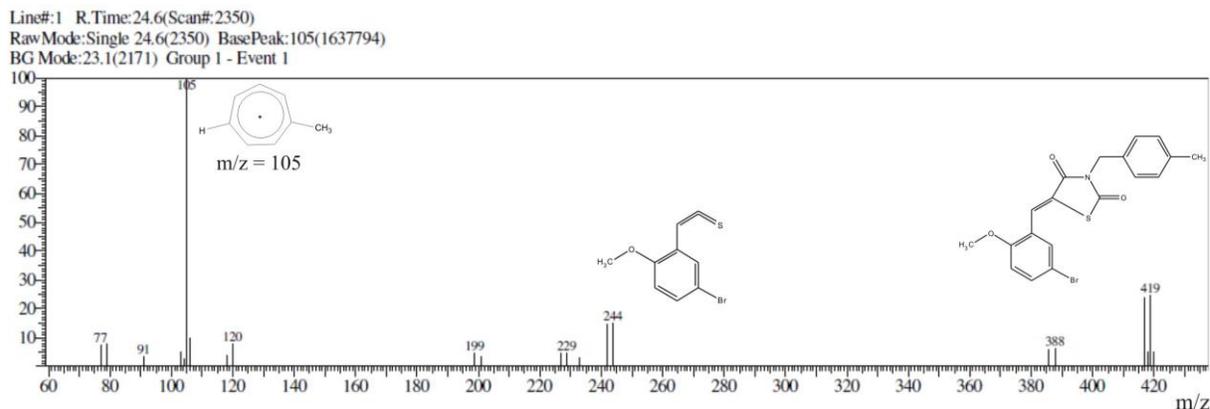


Figura 2 - Espectro de massas por Impacto Eletrônico (IE) do GQ-16 mostrando o íon molecular ( $m/z = 417$ ), pico base ( $m/z = 105$ ) e um terceiro pico de bastante importância ( $m/z = 244$ ).

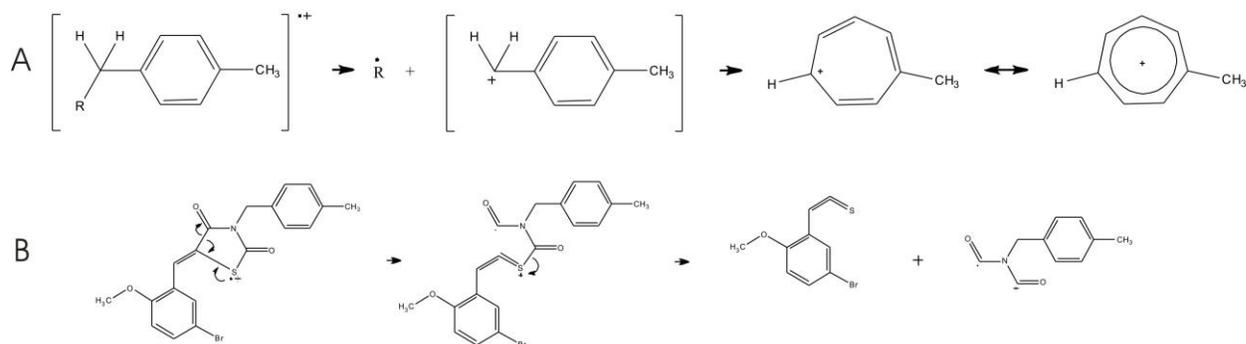


Figura 3 – Mecanismos de fragmentação do GQ-16.. A- Formação do íon tropílio. B- Segmentação  $\alpha$  seguida de segmentação indutiva.

## 4. CONCLUSÃO

A síntese do GQ-16 mostrou ser eficiente, visto que gerou um produto de alto rendimento e grau de pureza (100%), como pode ser observado no cromatograma (CG). O perfil de fragmentação da molécula foi característico, apresentando dois picos de íons moleculares (M e M+2), que correspondem à presença dos dois isótopos de Bromo na molécula. O pico base, correspondente à formação do íon tropílio pelo rearranjo de MacLafferty e um terceiro pico, formado por uma segmentação  $\alpha$  seguido de uma segmentação por indução.

## 5. REFERÊNCIAS

- AMATO, A.A., RAJAGOPALAN, S., LIN, J.Z.; GQ-16, a Novel Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) Ligand, Promotes Insulin Sensitization without Weight Gain. *J. Biol. Chem.* 2012. 287 (33), p 28169-28179.
- CHOI, J.H., ET AL., Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPAR $\gamma$  by Cdk5. *Nature*, 2010. 466(7305): p. 451-6.
- MARTINI, A.G. GQ-16, Agonista parcial de PPAR $\gamma$ , diminui proliferação de células mesangiais humanas. Tese, 2012.
- PITTA, I.R.; GALDINO, S.L.; LIMA, M.C.A.; Compostos tiazolidinadiônicos com atividade hipoglicêmica - PI 0601826-2. 2006, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI 0601826-2, data de depósito: 30/03/2006. Instituição financiadora: UFPE.
- SARAFIDIS, P.A. AND G.L. BAKRIS, Protection of the kidney by thiazolidinediones: an assessment from bench to bedside. *Kidney Int*, 2006. 70 (7), p. 1223-33.

## 6. AGRADECIMENTOS

A FACEPE, pela concessão da bolsa de estudos, ao Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT-SG) e ao Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF).

ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL – PNQM 39

## SÍNTESE E COMPROVAÇÃO ESTRUTURAL DE UM NOVO DERIVADO TIAZOLIDÍNICO GQ-402/LPSF CANDIDATO A FÁRMACO ANTI-INFLAMATÓRIO

D. B. SILVA<sup>1</sup>, D. R. C. TEIXEIRA<sup>1</sup>, I. R. PITTA<sup>1</sup>, M. R. GALDINO-PITTA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco.

E-mail para contato: dayvid.batitsa.silva@gmail.com

*RESUMO* – A busca pelo melhor fármaco, atualmente, é algo bastante discutido no meio científico para assim atender a demanda de enfermidades que assolam o cenário da saúde mundial. Nesse sentido, este trabalho visou sintetizar e caracterizar uma nova molécula que venha ter um desejado efeito terapêutico, no caso, um anti-inflamatório. As técnicas instrumentais utilizadas para comprovação estrutural da molécula foram a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) de impacto eletrônico e também a espectroscopia de infravermelho. Métodos qualitativos e quantitativos utilizados para análise do perfil de fragmentação do GQ-402 e de seus principais grupos funcionais, respectivamente. A partir da análise dos dados, podemos verificar que a estrutura do produto foi identificada.

*Palavras Chaves:* Inflamação, Tiazolidina, Química Medicinal.

*ABSTRACT* –The search for the best drug, currently, is something discussed in the scientific world to meet the demand for diseases that devastate the world health scenario. In this sense, this work aimed to synthesize and characterize a new molecule that has a desired therapeutic effect, in this case, an anti-inflammatory. The instrumental techniques used for structural verification of the molecule were the gas chromatography coupled to mass spectrometry (CG-EM) of electronic impact as well as infrared spectroscopy. Qualitative and quantitative methods used to analyze the fragmentation profile of GQ-402 and its main functional groups, respectively. From the analysis of the data, we can verify that the structure of the product was identified.

*Key words:* Inflammation, Thiazolidine, Medicinal Chemistry.

### 1. INTRODUÇÃO

Segundo (Santos Júnior, 2003) A inflamação é uma resposta orgânica local ou geral que tem como fim proteger o indivíduo contra qualquer tipo de agressão, através de um processo de regulação que mantenha o equilíbrio das diversas funções e composições químicas do corpo e pode



ser desencadeada por diversos fatores: agentes físicos (trauma mecânico, radiação, calor, frio), agentes químicos (substâncias irritantes, álcalis e outros) ou fatores biológicos, provocada por microorganismos (fungos, bactérias, vírus ou protozoários) (Balbino *et al.*, 2005).

No tocante à química, o conhecimento da estrutura molecular é fundamental, uma vez que, a estrutura de um composto afeta propriedades que estão intimamente inter-relacionadas à sua atividade biológica (Korolkovas, 1988). Existem dois tipos de anti-inflamatórios: os anti-inflamatórios não esteroidais (AINE's) e os esteroidais; Os AINE's são os mais utilizados, pois correspondem ao grupo de fármacos que se apresentam quimicamente diferente pois inibem as enzimas da via cicloxigenase (Cox-2), sendo excelentes medicamentos para minimizar os efeitos indesejáveis causados pela resposta inflamatória (Goodman & Gilman, 2006).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi sintetizar o derivado tiazolidínico LPSF/GQ-402 e caracterizá-lo estruturalmente através da técnica de Espectrometria de Massa (MS) e Infravermelho (IV) visando esclarecer o seu perfil de fragmentação e identificar seus principais grupos funcionais, respectivamente.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a obtenção da molécula final GQ-402/LPSF foram necessárias 4 etapas reacionais: uma reação de ciclização para obtenção da tiazolidina-2,4-diona (TZD), uma substituição nucleofílica, uma condensação de Knoevenagel e, por fim, uma reação de adição de Michael. Cada reação durou de 4 a 24 horas. (Rego, 2014).

Para realização da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, a amostra foi solubilizada em acetonitrila (ACN) na proporção de 0,2 mg/mL, e transferida para um vaio através de um filtro e aplicadas em coluna Restek rtx-5 de dimensões 30m x 0.25mm x 0.25µm, com o gás hélio servindo de fase móvel. A temperatura de aplicação da solução com amostra foi de 320°C, com um tempo de corrida de 40 minutos. Para a análise em espectrofotometria de Infravermelho (IV) as amostras foram preparadas em forma de pastilha com Brometo de Potássio (KBr), na proporção de 1:100.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na síntese do GQ-402/LPSF, o composto foi obtido em 5 horas e teve um rendimento de 48,93%. A precipitação completa do produto durou cerca de 2 horas após o desligamento da reação sem haver a formação de segundos cristais. O peso da amostra foi de 0,4478 gramas. A partir das análises instrumentais, a comprovação da estrutura da molécula via GC-MS e IV foi obtida. Na análise por CG-EM, onde se produz um feixe de elétrons que impacta as moléculas onde esses elétrons fragmentam essas moléculas, o composto teve um tempo de retenção de 25,725 minutos, apresentando 94,49% de pureza. A massa do composto foi comprovada pelo método de ionização de Impacto Eletrônico (IE). Através da análise do perfil de fragmentação, podemos verificar os seguintes fragmentos:  $m/z$  121 = pico base, representando o grupamento  $C_8H_8O$ ;  $m/z$  65 = representando a eliminação de uma molécula de acetileno neutro ( $C_2H_2$ );  $m/z$  77 = representando a saída de um anel aromático;  $m/z$  91 = representando um indicativo de uma alquil substituído de um anel de benzeno (Figura 1).

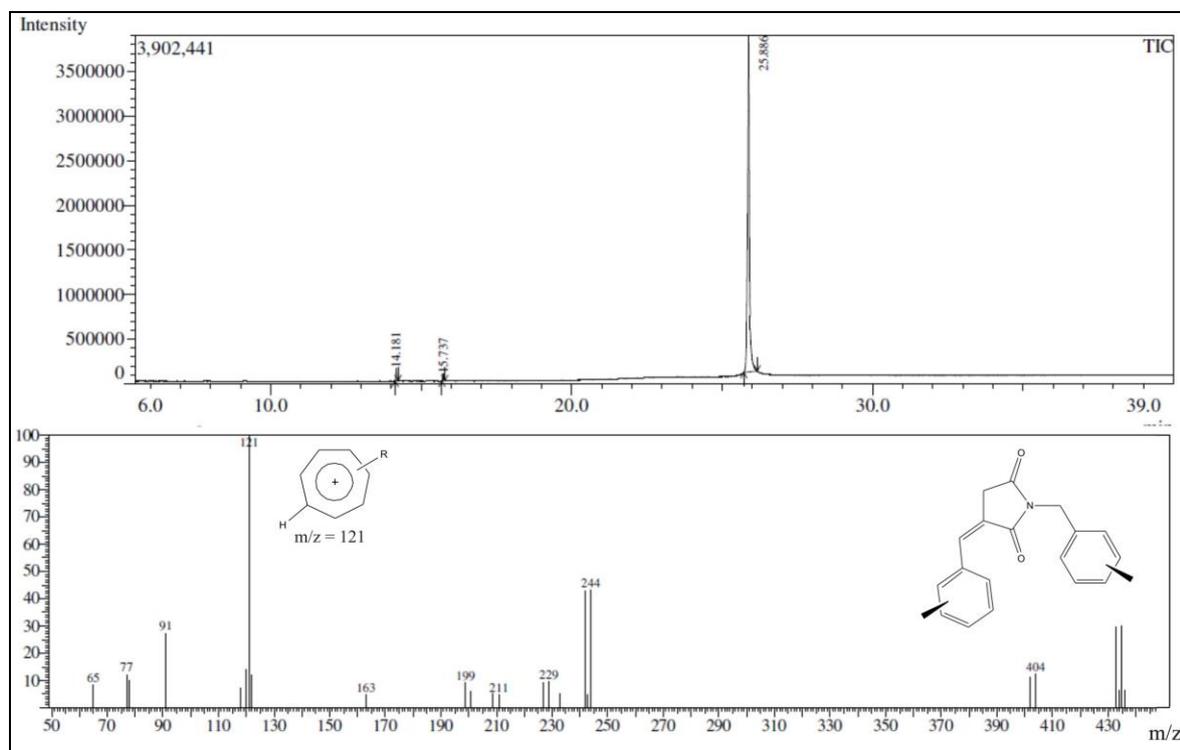


Figura 1- Cromatograma e Espectro de Massa (IE) do GQ 402/LPSF

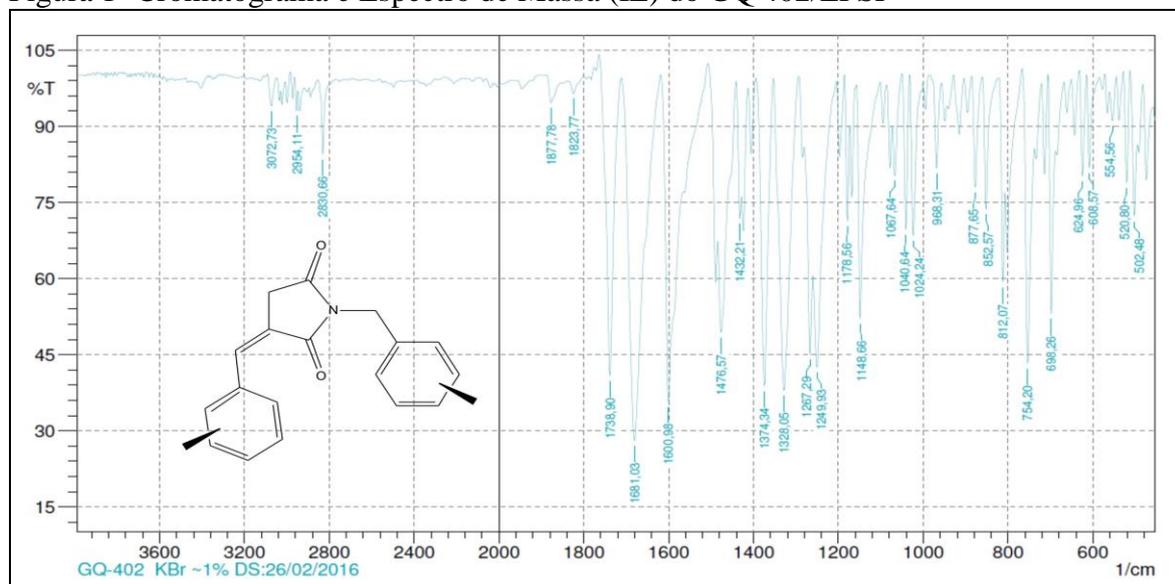


Figura 2- Espectro de Infravermelho do GQ 402/ LPSF

A partir do IV, onde é lançado um feixe de infravermelho sobre as moléculas e analisa como acontece as absorvâncias, foi possível verificar as bandas de absorção características dos grupos funcionais presentes no derivado sintetizado. Conforme os dados contidos no resultado verificou-se a presença de N-H associada a amina (3072,73), C-H alifáticos (2954,11), C=O (1738,90), C=O de amidas (1681,03).



#### 4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que o GQ-402/LPSF foi sintetizado e sua estrutura foi comprovada através das técnicas de CG-EM e Infravermelho. Podemos verificar também que a metodologia aplicada para análise do GQ-402 por CG-MS foi considerada eficiente, visto que foi possível verificar o padrão de fragmentação e o alto grau de pureza do composto.

#### 5. REFERÊNCIAS

- AMARAL, A.T.; MONTANARI, C. A. Química medicinal: 25 anos de planejamento racional de fármacos *Química Nova*, v. 25, Supl. 1, p. 39-44, 2002.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.
- BLANCHET, J.; ZHU, J. Reeve's synthesis of 2-imino-4-thiazolidinone from alkyl (aryl) trichloromethylcarbinol revisited, a three-component process from aldehyde, chloroform and thiourea *Tetrahedron Letters*, v. 45, p. 4449-4452, 2004.
- SANTOS JÚNIOR J.C.M. Rubor, calor, tumor e dor e o paciente grave *Rev. Bras. coloproct*, v. 23, n.3, p. 206-210, 2003.
- SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X., *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*, 7ª. ed. LTC Livros Técnicos e Científicos, Rio de Janeiro, 2010.
- RÊGO, M. J. B. DE M.; GALDINO-PITTA, M. R.; PEREIRA, D. T. M.; SILVA, J. C.; RABELLO, M. M.; LIMA, M.C.A.; HERNANDES, M. Z.; PITTA, I. R.; GALDINO, S. L.; PITTA, M. G. R. Synthesis, in vitro anticancer activity and in silico study of new disubstituted thiazolidinedione derivatives. *Medicinal Chemistry Research (Print)*, v. p., 2014.
- SANTOS JÚNIOR J.C.M. Rubor, calor, tumor e dor e o paciente grave *Rev bras coloproct*, v. 23, n.3, p. 206-210, 2003.
- KOROLKOVAS, A. *Essentials of medicinal chemistry*. New York: Wiley-Interscience Publication, 1988.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.

#### 6. AGRADECIMENTOS

Agradeço pela oportunidade ao INCT\_IF pela confiabilidade cedida, agradeço a todos do LPSF pelo apoio nas análises. Ao NUPIT SG, UFPE, INCT-if, FACEPE, CNPq e CAPES pela infraestrutura e pelo suporte financeiro.



ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL – PNQM 40

## SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE NOVAS 1-3 TIAZÓIS PARA A ATIVIDADE ANTI-Trypanosoma cruzi.

M.C. H.B. DIAS<sup>1</sup>, M. O. BARBOSA<sup>1</sup>, A.R. OLIVEIRA<sup>1</sup>, L. R. P DE SIQUEIRA<sup>1</sup>, C. A. L. MIRANDA FILHO<sup>1</sup>, P. A. T. M. GOMES<sup>1</sup>, T. A. R. DOS SANTOS<sup>2</sup>, V. R. A. PEREIRA<sup>2</sup> e A. C. L. LEITE<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia.

<sup>2</sup> Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Departamento de Imunologia.

E-mail para contato: mabilly\_holanda@hotmail.com

**RESUMO** – *A doença de Chagas é classificada pela Organização Mundial da Saúde como doença negligenciada e um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo. A quimioterapia é composta por apenas um medicamento, o benznidazol, no entanto, necessita de um longo período e apresenta graves efeitos colaterais. Haja vista a grande parcela da população afetada e com uma quimioterapia restrita, a busca de novos protótipos a fármacos anti-T. cruzi se torna necessária e emergencial. Para o planejamento da série química utilizaram-se os tiazóis visto que esta constitui uma classe de composto com uma versatilidade química e ampla gama de atividades biológicas, com destaque para sua potencial atividade tripanocida. Para o planejamento da síntese utilizaram-se técnicas de bioisosterismos e hibridação molecular. Todos os 5 compostos tiveram sua estrutura química determinada por técnicas espectroscópicas e a atividade tripanocida foi determinada, além da citotoxicidade que foi estimada em esplenócitos de camundongos BALB/c. Todos os compostos foram mais eficazes que o benznidazol na forma epimastigota e menos citotóxicos que o fármaco de escolha.*

**Palavra-chave:** *Doença de Chagas; Planejamento Estrutural; Heterociclos.*

**ABSTRACT** - *Chagas disease is classified by the World Health Organization as a neglected disease and a serious public health problem in Brazil and worldwide. Chemotherapy consists of only one drug available, benznidazole; however, the needs a long period and has serious side effects. In fact of the large part of the affected population and with restricted chemotherapy, the search of new prototypes for anti-T. cruzi drugs becomes necessary and emergency. For the planning of the chemical series, the thiazole were used, since it constitutes a class of compounds with a chemical versatility and a wide range of biological activities, with emphasis on its potential trypanocidal activity. For the*



*planning of the synthesis, techniques of bioisosterisms and molecular hybridization were used. All five compounds had their chemical structure determined by spectroscopic techniques and the trypanocidal activity was, in addition to the cytotoxicity that was estimated in splenocytes of BALB /c mices. All compounds were more effective than Benznidazole in the epimastigote form and less cytotoxic than the drug of choice.*

*Key-words: Chagas Disease, Structural Planning, Heterocycles.*

## 1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas está inserida em um grupo de patologias negligenciadas (DNDi, 2016). A enfermidade é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e transmitida aos seres humanos, principalmente por insetos triatomíneos conhecidos como barbeiros. O benznidazol tem um resultado positivo apenas na fase inicial da doença obtendo cura de até 80% dos pacientes tratados. A sua eficácia diminui significativamente na segunda fase ou fase crônica da doença e os efeitos colaterais são mais agravados, além de possuir efeitos colaterais graves (FIOCRUZ, 2016).

Nesse contexto, o planejamento e síntese de novos compostos com potencial atividade biológica anti-*T cruzi* foi baseado em pesquisas anteriormente realizadas pelo nosso grupo de pesquisa. Escolheu-se grupamentos farmacofóricos tiossemicarbazonas e seu bioisómero cíclico (tiazóis) foram selecionados com o intuito de obter compostos menos tóxicos e com efeito tripanocida elevado. (Moreira *et al*, 2012)

Este trabalho descreve a síntese de tiazóis candidatos a fármaco antichagásicos, concebidas por estratégias de bioisosterismo e hibridação molecular. Os compostos sintetizados exibiram uma baixa citotoxicidade, quando comparada ao benznidazol. Quanto a atividade na forma epimastigota todas as moléculas demonstraram-se mais potente que o benznidazol. Para a forma tripomastigota o composto mais promissor foi a tiossemicarbazona de origem dos tiazóis.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### Síntese da tiossemicarbazona e 1,3-tiazóis

A série que é composta por 4 moléculas, se inicia com a síntese de uma tiossemicarbazona. que foram preparadas a partir da condensação do 4'-trifluormetil benzaldeído com a tiossemicarbazida em temperatura ambiente e refluxo por três horas. O produto obtido foi recristalizado em tolueno, a quente. Os tiazóis propostos foram preparados em agitação magnética, sob refluxo, com isopropanol, em 24 horas. Os compostos foram obtidos como sólidos cristalinos após evaporação a baixa pressão e posterior filtração, com rendimentos satisfatórios que variaram de 85% para tiossemicarbazida a 60% para tiazóis.

### Toxicidade em esplenócitos

Células esplênicas ( $6 \times 10^5$  células/poço) obtidas de camundongos foram cultivadas em placas de 96 poços, contendo meio de cultura completo. As células foram incubadas com os compostos em

diferentes concentrações e com 1  $\mu\text{M}$  de timidina tritiada/poço durante 24 h em estufa de  $\text{CO}_2$  a 37°C. Após 24 h de incubação a captação de timidina tritiada foi determinada através do contador beta de cintilação e o percentual de citotoxicidade foi determinado.

### Atividade antiproliferativa para epimastigotas e tripomastigotas

Os parasitas foram contados em um hemocítômetro e depois vertidas em placas de 96 poços, a um número de células de  $10^6$  células/poço para a forma epimastigota. Para a forma tripomastigotas o sobrenadante de células LLC-MK2 infectadas foi recolhido e, em seguida, distribuídas em placas de 96 poços a uma série de células de  $4 \cdot 10^5$  células/poço. Todos os compostos foram dissolvidos em DMSO e depois diluídos em meio LIT em cinco concentrações diferentes. A placa foi incubada durante 5 dias a 26°C, foram recolhidas alíquotas de cada poço, e o número de parasitas viáveis foram contadas numa câmara de Neubauer e comparados com cultura parasitária não tratada. IC50 foram calculados por meio do software GraphPad Prism 4.0. Benznidazol foi utilizado como fármaco de referência.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 1,3-tiazóis foram avaliados in vitro quanto as propriedades tripanocidas em modelos experimentais frente às formas evolutivas epimastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi*. Nestes ensaios, os valores de IC50 foram determinados para esplenócitos de BALB/c e para as formas evolutivas epimastigota e tripomastigota. Os resultados foram expressados em valores em  $\mu\text{M}$  como descrito na tabela 1.

COMPOSTOS	CITOTOXICIDADE	EPIMASTIGOTA	TRIPOMASTIGOTA
	Esplenócitos ( $\mu\text{M}$ )	CEPA DM28c( $\mu\text{M}$ )	CEPA Y ( $\mu\text{M}$ )
MB01	20,2	4	13,8
MB1.1	287,9	24,3	83,1
MB1.2	13,7	10,6	33
MB1.3	131,0	29,6	40,7
MB1.4	234,6	8,5	80,3
BZD	96,1	48,8	6,3

Tabela 1: Atividade anti-*T. cruzi* da tiossemicarbazona e 1,3-tiazóis.

A maioria dos compostos apresentaram uma citotoxicidade, superior ao Benznidazol. Verificou-se que a ciclização da tiossemicarbazona para a produção de bioisósteros cíclicos foi um processo de modificação molecular de grande eficácia para a melhoria da citotoxicidade.



Os compostos tiazólicos foram mais eficazes que o fármaco de referência com um leve aumento da IC<sub>50</sub> quando comparados à tiossemicarbazonas de origem. O tamanho do raio atômico *para*-substituído não influencia com regularidade na atividade biológica, no entanto, a presença de um bromo no composto MB1.4 beneficia significativamente a atividade biológica. Na análise da atividade verificou-se que a ciclização produziu compostos que tem uma IC<sub>50</sub> que variam de 33 a 83 µM. Mesmo esses resultados não possuindo uma atividade tão parecida com o Benznidazol, pode-se observar que, exceto o MB1.2, todos os compostos são ativos em doses 50% inferior ao limiar de citotoxicidade.

#### 4. CONCLUSÃO

Observou-se que a modificação estrutural proposta para o trabalho não foi benéfica para a atividade tripanocida e necessita de novas técnicas de modificação molecular para a síntese de um composto protótipo na doença de Chagas.

#### 5. REFERÊNCIAS

Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi). Disponível em: <http://www.dndi.org.br/pt/centro-de-documentacao/comunicados-de-imprensa/331-30-05-2012-lote-comercialbzn-pediatrico.html>, acessado em 01 de novembro de 2016.

FIOCRUZ – Chagas. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=125>, acessado em 01 de novembro de 2016.

MOREIRA, D. R. M. M. et al Structural Investigation of Anti-Trypanosomacruzi 2-Iminothiazolidin-4-ones Allows the Identification of Agents with Efficacy in Infected Mice. *Journal of Medical Chemistry*, V.55, n. 24, Pg.10918-10936, 2012.

#### 6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos a todos os participantes do LpQM e do laboratório da Dr<sup>a</sup> Valéria Pereira da FIOCRUZ – PE e aos órgãos de fomento como FACEPE, CAPES e CNPQ.



# **TERAPIAS EM SAÚDE**



ÁREA DE SUBMISSÃO: TERAPIAS EM SAÚDE – TS 2

## ANÁLISE DIFRATOMÉTRICA DE HIDROTALCITAS SINTÉTICAS PARA CARREAMENTO DE FÁRMACOS

A. D., LEÃO<sup>1</sup>, MARINHO, F.A.<sup>1</sup>, SOARES, M.F.R.<sup>1</sup>, SOARES-SOBRINHO, J.L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia  
E-mail para contato: felipemarinho3@hotmail.com

**RESUMO** – Os Hidróxidos Duplos Lamelares (HDLs) são argilominerais com capacidade de troca e adsorção de ânions e biomoléculas, são materiais biocompatíveis e com variada composição estrutural dependendo do método de síntese utilizado. Atualmente estes carreadores vêm se destacando pela capacidade de promover liberação modificada, melhora na taxa de dissolução e proteção térmica de fármaco. O presente trabalho propôs-se à sintetizar 3 tipos de HDLs, Mg<sub>2</sub>Al-Cl, Mg<sub>3</sub>Al-Cl e Zn<sub>2</sub>Al-Cl e avaliar através da Difratometria de Raio X (DRX) qual HDL apresenta melhor potencial para carreamento de fármacos. A avaliação do DRX possibilitou concluir que o HDL Zn<sub>2</sub>Al-Cl seria o melhor sistema devido sua maior densidade de carga e menor cointercalação de hidroxila.

**Palavras-chave:** Argila aniônica. Sistema de Liberação. Cointercalação. Cristalinidade.

**ABSTRACT-** The double hydroxides (LDHs) are clay minerals with exchange capacity and adsorption of anions and biomolecules, are biocompatible materials and structural composition varied depending on the method of synthesis used. Currently these carriers have been highlighted by the ability to promote modified release, improved dissolution rate and drug thermal protection. This study was proposed to synthesize three types of HDLs, Mg<sub>2</sub>Al-Cl, Mg<sub>3</sub>Al-Cl and Zn<sub>2</sub>Al-Cl and evaluate through the diffraction of X-ray (XRD) which HDL has better potential for entrainment of drugs. The evaluation of the XRD led us to conclude that HDL-Cl Zn<sub>2</sub>Al would be the best system due to its higher charge density and lower cointercalation.

**Keywords:** anionic clay. Release System. Interleaving. Crystallinity.

### 1. INTRODUÇÃO

Os hidróxidos duplos lamelares (HDL) são uma classe de argilominerais que nas últimas décadas têm merecido um interesse crescente por conta de suas aplicações como carreadores inorgânicos de espécies bioativas, capacidade de melhorar a taxa de dissolução de fármacos, alterar a cinética de

liberação e proteger termicamente as espécies com as quais estão interagindo. Estes materiais estruturalmente são formados pelo empilhamento de camadas mistas de hidróxidos de cátions di e trivalentes formando lamelas e por ânions hidratados entre os espaços interlamelares (Rodrigues *et al.*, 2004; Rojas *et al.*, 2015; Cunha *et al.*, 2010).

Os HDLs podem ser encontrados na natureza ou podem ser obtidos através de rotas sintéticas em decorrência das vantagens proporcionadas ao material pela síntese, como alto grau de pureza e capacidade de controle de suas propriedades, como tamanho de partícula e morfologia, gerando desta forma materiais mais uniformes e com variada composição química, proporção e métodos de obtenção (Cunha *et al.*, 2010).

Objetivando melhorar as interações com as espécies bioativas carregadas, podem ser previstas combinações variadas de cátions para compor os HDLs, como alteração no tipo de cátion utilizado, proporção de cátion divalente e/ou trivalente, solvente utilizado na obtenção do material, além de parâmetros como tempo de síntese e utilização de aquecimento (Mendoza-Damián *et al.*, 2016; Dong *et al.*, 2014). Tais modificações alteram significativamente as propriedades e capacidade de interação química com as espécies biológicas.

O método de coprecipitação é o método mais utilizado por diversos grupos de pesquisa por ser em uma única etapa (*one pot*), apresentar materiais com menor tamanho de partícula, boa cristalinidade, menor contaminação com íons carbonato e maior capacidade de carregamento da espécie escolhida em relação a outros métodos (Cunha *et al.*, 2010). Diante do exposto, o presente trabalho propôs-se à sintetizar 3 tipos de HDLs, Mg<sub>2</sub>Al-Cl, Mg<sub>3</sub>Al-Cl e Zn<sub>2</sub>Al-Cl e avaliar através da Difractometria de Raio X (DRX) qual HDL apresenta melhor potencial para carregamento de fármacos.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram sintetizados hidróxidos duplos lamelares do tipo Mg<sub>2</sub>Al-Cl (S1), Mg<sub>3</sub>Al-Cl (S2), Zn<sub>2</sub>Al-Cl (S3) através do método de coprecipitação de Miyata (1975). Para o preparo de S1 e S2 uma solução aquosa de KOH (0,2 mol L<sup>-1</sup>) era adicionada gota a gota à solução metanólica até ser atingido um pH um pouco acima 9,5. Em seguida, iniciou-se a adição dos sais MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O e AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O em proporções adequadas para ser obtida a relação 2:1 e 3:1 de M<sup>2+</sup>/M<sup>3+</sup>. Para o preparo de S3 seguiu-se a mesma metodologia sendo utilizadas as soluções ZnCl<sub>2</sub> anidro e AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O para obter a relação 2:1 de M<sup>2+</sup>/M<sup>3+</sup> sob pH 7,5. Os sistemas foram mantidos sob agitação magnética, temperatura ambiente e atmosfera de N<sub>2</sub> para evitar contaminação. Após a última lavagem o sobrenadante foi descartado e em seguida o precipitado foi seco em estufa à 50°C por 12h, depois de seco, o sólido foi triturado em almofariz e armazenado em frasco devidamente vedado em dessecador.

### 2.1 Método de Caracterização- Difractometria de Raio X

Foram obtidos no difratômetro Rigaku, modelo miniflex originário do Japão, através de raios X gerados por um ânodo de Cu(K $\alpha$ ), operado a 30 Kv de tensão, corrente de 15mA e filtro de Ni. Foi utilizada uma faixa de varredura ( $2\theta$ ) de 1,5 a 70° a um passo de 0,03° por segundo.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

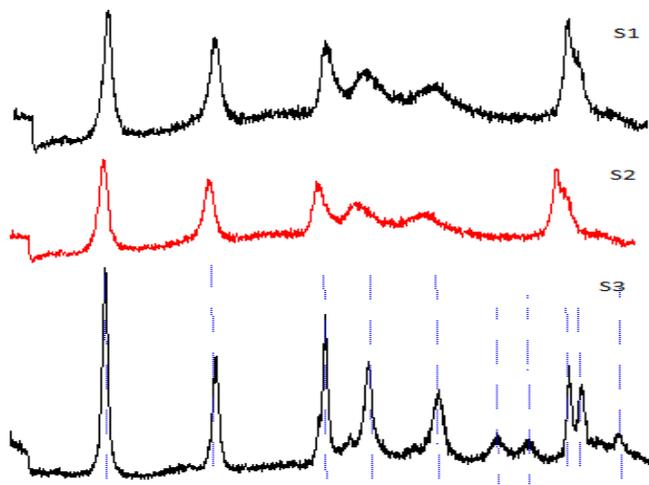


Figura 1- Difrátogramas dos HDLs S1, S2 e S3 na faixa de varredura ( $2\theta$ ) de 1,5 a 70° a um passo de 0,03° por segundo.

Na figura 1, o sistema S3 apresenta maior cristalinidade comparativamente aos sistemas S1 e S2, pois a obtenção de HDLs mais cristalinos ao se utilizar zinco é bem relatada na literatura este fato relaciona-se com a menor capacidade de ocorrer cointercalação de hidroxilas na síntese de HDLs contendo este metal (Rocha, 2015). A cointercalação de hidroxilas no espaço interlamelar promove alargamento no pico basal 003 (primeiro pico) que corresponde ao espaço interlamelar, com aumento no valor de  $d_{003}$  e redução de sua intensidade, gerando difratogramas menos intensos. A intercalação de hidroxilas é favorecida por valores de pH maiores, a síntese dos HDLs de S1 e S2 ocorre em pH 9,5 e a síntese de S3 em pH 7,5, esta diferença no pH das sínteses explicaria a menor cointercalação e maior organização dos HDLs contendo zinco.

A análise difratométrica demonstra que os sistemas sintetizados em maiores valores de pH S1 e S2 apresentam maior tendência de cointercalação de hidroxila, o que poderia ser desfavorável para o carregamento de fármacos, pois existiria menor tendência de interação entre a molécula orgânica e as lamelas. O HDL sintetizado com zinco S3 apresenta menor cointercalação de hidroxilas, apresentando DRX com maiores contagens e menor deslocamento. Enquanto o sistema S2, por apresentar maior densidade de carga, consequentemente possui maior capacidade de interagir com fármacos aniônicos em comparação à S1 e S3, apresentando portanto potencial para carrear maior percentual de fármaco.

## 4. CONCLUSÃO

Pode-se concluir através dos dados difratométricos que HDLs contendo zinco, como S3, apresentam menor cointercalação de hidroxila e que HDLs com proporção  $M^{2+}/M^{3+}$  2:1 apresentam maior densidade de carga e maior potencial de interação lamela-íon intercalado, desta forma, o HDL S3 de  $Zn_2Al-Cl$  foi considerado o melhor sistema para carrear fármacos aniônicos.

## 5. REFERÊNCIAS

- CUNHA, V. R. R.; MARIA, A.; FERREIRA, C. Hidróxidos Duplos Lamelares: Nanopartículas inorgânicas para armazenamento e liberação de espécies de interesse biológico e terapêutico. *Química Nova*, v. 33, n. 1, p. 159–171, 2010
- DONG, L.-E ; GOU, G.J.; JIN, X.Q.; ZHANG, M. Synthesis pretreatment and characterization of a magnetic layered double hydroxides fluorescent probe. *Chinese Chemical Letters*, v. 25, n. 6, p. 923–928, 2014.
- MENDOZA-DAMIÁN, G.;TZOMPANTZI, F.;MANTILA, A.; HERNANDEZ-GORDILLO, A.Improved photocatalytic activity of  $SnO_2-ZnAl$  LDH prepared by one step  $Sn^{4+}$  incorporation. *Applied Clay Science*, v. 121-122, n. February, p. 127–136, 2016
- MIYATA, S. The Syntheses of Hydrotalcite-like physico-chemical properties: the systems  $Mg^{2+}-Al^{3+}-NO_3^-$ ,  $Mg^{2+}-Al^{3+}-Cl^-$ ,  $Mg^{2+}-Al^{3+}-ClO_4^-$ ,  $Ni^{2+}-Al^{3+}-Cl^-$  and  $Zn^{2+}-Al^{3+}-Cl^-$ . *Clays and Clay Minerals*, v. 23, p. 369–375, 1975
- ROCHA, M.A. *Materiais Híbrido Nanoestruturados à base de Hidróxidos Duplos Lamelares e o Fármaco Sulindaco*. 2015. 173. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. São Paulo.
- RODRÍGUEZ, M. S. ;LUNA, J.; CARLUCCI, A.; BREGNI, C. Relación de estabilidad termodinámica relativa entre polimorfos de glibenclamida. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v. 23, n. 2, p. 169–175, 2004.
- ROJAS, R.;JIMENEZ-KAIRUZ, A. F.;MANZO, R. H.GIACOMELLI, C. E.Release kinetics from LDH-drug hybrids: Effect of layers stacking and drug solubility and polarity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 463, p. 37–43, 2014

## 6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Universidade Federal de Pernambuco pela estrutura física e à CAPES pela bolsa concedida.



ÁREA DE SUBMISSÃO: TERAPIAS EM SAÚDE – TS 3

## EFETIVIDADE DAS PRÁTICAS INTEGRATIVAS E COMPLEMENTARES PARA SOFRIMENTO DIFUSO

V.P. JORDÃO<sup>1</sup>, A.F.B. BEZERRA<sup>1</sup>, C.M.F AQUINO.<sup>2</sup> R.F.GONÇAVES<sup>3</sup>. I.M.C SOUSA, K.S<sup>4</sup>  
BRITO e SILVA<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco;

<sup>2</sup> Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco

<sup>3</sup> Universidade de Pernambuco

<sup>4</sup> Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

E-mail para contato: vitorpj@live.com

**RESUMO** - *Objetivos: Avaliar a efetividade das práticas integrativas e complementares (PIC) no cuidado em sofrimento difuso no ano de 2014 em dois centros de PIC. Metodologia: O método utilizado foi avaliação de efetividade. A pesquisa foi realizada a partir da coleta de dados de prontuário e entrevista com terapeutas dos centros de prática integrativa e complementares Equilíbrio do Ser (CPICES) em João Pessoa/PB e CPIC Professor Guilherme Abath (CPICGA) em Recife/PE, a partir das variáveis referentes à identificação do usuário por sofrimento difuso, número de atendimentos, queixas, resolução das queixas, altas e perfil de usuário. Resultados: Usuários com sofrimento difuso apresentaram remissão dos sintomas em média de duas a três sessões de floral e acupuntura, com número aceitável de abandono da terapia. Conclusão: As três PIC avaliadas mostram efetividade na redução das queixas. Porém, fazem-se necessários estudos complementares. Palavras-chaves: Efetividade; Terapias Complementares; Saúde Mental.*

**ABSTRACT** - *Objective: To evaluate the effectiveness of integrative and complementary practices (ICP) on diffuse suffering care in the year of 2014 in two ICP centers. Method: The method used for effectiveness assessment was based on patient reported outcomes available in medical register. Medical records and interviews with practitioners were used for data collection on both centers of ICP: Equilíbrio do Ser (ICPES) in João Pessoa, Paraíba, Brazil, and Guilherme Abath (ICPGA) in Recife, Pernambuco, Brazil. As variables of interests were patient personal data, health issues (complaints responsible for attendance at an ICP center) and practice profile (number of sessions, resolution or not of complaints). Results: Individual with diffuse suffering showed symptoms remission in an average of two to three sessions of floral and acupuncture, with an acceptable number of therapy abandonment. Conclusion: All three ICP evaluated are effective in reducing symptoms. However, further studies are*

*needed.*

*Keywords: Effectiveness; Complementary Therapies; Mental Health*

## 1. INTRODUÇÃO

As práticas integrativas e complementares (PIC) complementam o Sistema Único de Saúde (SUS) e muitas vezes é uma das alternativas a terapêutica de saúde hegemônica que não surte efeito em causas com relação a integralidade do sujeito, solucionadas por ópticas alternativas ao tratamento convencional. em busca da cura de seu sofrimento/doença/queixa e em muitos casos o sofrimento difuso é solucionado por alguma das PICs fora das medicina convencional (Sousa, 2013). A presença das PIC nos sistemas de saúde pública tem estimulado a discussão acerca de seu custo-efetividade.

No campo da Saúde Mental, tem sido pouco explorada a efetividade dessas práticas, apesar da crescente busca de usuários em “sofrimento” por outros tipos de cuidados não biomédicos. O aumento dessa procura, talvez revele a insuficiência do modelo biomédico em prover cuidado resolutivo a esses usuários e, conseqüentemente o seu encaminhamento para outras práticas (Sousa, 2004; 2013).

Segundo Fonseca (2007), seis em cada dez casos que chegam aos hospitais públicos são identificados como sofrimento difuso. O sistema de saúde não consegue e nem pode suportar tais pacientes que aparentemente são hipocondríacos, mas que na verdade possuem sim queixas de saúde com pouco efeito de resolutividade no sistema hegemônico de saúde.

O sofrimento difuso (SD) foi um termo criado por Viktor Valla (Fonseca, 2007), a fim de refletir sobre um conjunto de sintomas de causas inespecíficas, tanto físicos quanto psíquicos, que não conseguem ser discernidos pelo médico ou por exames como uma patologia reconhecida. Apesar de não possuir diagnóstico preciso, as queixas apresentadas pelos usuários geram um grande impacto na sua vida e, possivelmente, são catalisadores de outras patologias.

Uma vez que usuários com este perfil procuram outras formas terapêuticas de encontrar alívio, este estudo buscou verificar a efetividade das práticas integrativas e complementares no atendimento a usuários com SD em dois Centros de Práticas da rede pública.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram selecionados dois Centros de Práticas Integrativas e Complementares (CPIC), o primeiro no município de Recife, o Unidade Prof. Guilherme Abath (CPICGA), construído em 2004, com ênfase em práticas integrativas coletivas, e atendendo a população da região metropolitana do Recife/PE, e o segundo local do estudo é o Centro Equilíbrio do Ser (CPICES), localizado em João Pessoa/PB construído em 2011, com práticas desenvolvidas tanto por voluntários quanto por funcionários do município. A entrada de usuários do SUS nos CPIC ocorre por meio de demanda espontânea ou por encaminhamento de outras Unidades de Saúde.

Os dados foram coletados por meio de consulta aos terapeutas, a partir de entrevistas, e informações presentes em prontuário, no ano de 2014, cujo acesso foi autorizado mediante a aprovação do Comitê de Ética e pesquisa de ambos os municípios. Desta fonte foram identificados os usuários com SD, a partir das queixas apresentadas e inexistência de diagnóstico prévio de doença psiquiátrica, e o acompanhamento da terapia. Junto a isso foram observados dados de identificação, como idade, sexo e profissão; esses dados deram aporte para a análise de relação com o sofrimento difuso, sessões e alta.



Os dados foram agrupados por meio do Microsoft Excel® e a análise considerou a frequência simples de sexo, profissão e alta de tratamento, conjuntamente às médias de idade, de tempo para alta e queixas mais comuns de usuários. Para possibilitar o comparativo entre as práticas, foram selecionadas as três práticas individuais mais utilizadas entre os CPIC: acupuntura, floral e homeopatia.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No CPICS Equilíbrio do Ser, foram identificados 180 casos de SD no ano de 2014. Entre a amostra, 85% eram mulheres, na faixa etária média de 47 anos, 53% possuem ensino superior completo ou incompleto e são professores em sua maioria (11%). A forma de entrada no serviço foi a busca espontânea (76%), enquanto as queixas mais comuns foram: ansiedade (43%), insônia (39%) e algias, as quais foram identificadas em todos os usuários. Para altas, a acupuntura atendeu 46 usuários com SD, com frequência de alta de 52%, abandono de 28% e não comparecimento após primeira consulta de 20%; para floral houve 31 casos em sofrimento difuso, em que 39% dos sujeitos obtiveram alta, 45% obtiveram alta por falta, e 16% não compareceram após primeira consulta, momento no qual o Plano Terapêutico Singular (PTS) é criado; em homeopatia foram localizados sete casos de SD, com 71% de alta por falta, enquanto 29% obtiveram alta.

Cabe informar que o quantitativo de atendimentos é influenciado pelo preço do floral e complexo homeopático, visto que os usuários referiram em prontuário não poder manter o tratamento, uma vez que o serviço não oferece os produtos, restando ao usuário arcar com os custos.

No CPICGA foram encontrados 21 casos de sofrimento difuso. Os usuários têm em média 45 anos de idade, sendo todos do sexo feminino, 38% declararam ter o nível médio, e não houve número expressivo em relação à profissão. As queixas mais comuns são algias (90%), ansiedade (47%) e insônia (38%). A forma de entrada para atendimentos das práticas individuais é a referência de outros serviços, como Unidades de Saúde da Família, Centros de Atenção Psicossocial e Policlínicas. Diante dessa característica, era comum identificar diagnósticos psiquiátricos estabelecidos em usuários que poderiam se encaixar no perfil de SD, dessa forma, o número de casos presentes nesse campo é mais restrito. Os dados disponíveis em prontuários era escassos, e limitavam-se a informar os dados cadastrais do usuário e as práticas a que foi encaminhado no serviço, sem descrição do acompanhamento e evolução, o que se deve à cultura dos terapeutas em realizar registros outros, individuais, dos usuários que acompanham. Quanto aos desfechos das práticas, para acupuntura foram identificados seis casos, dos quais 33% receberam alta e em 67% o desfecho é desconhecido; para floral e homeopatia, o CPICGA atende em conjunto, foram identificados sete casos, em que apenas um informa alta e os demais possuem desfecho ignorado.

Não é incomum a baixa manutenção do regime terapêutico no tratamento de condições de longa duração, como diabetes mellitus (De Oliveira *at al.*, 2014), hipertensão (Cade, 1997) e psicoterapia breve (Chilelli e enéas, 2000). Segundo estes autores, a taxa de desistência de 47% é aceitável, visto a presença de algumas variáveis como o custo da terapia, ou quando o processo de continuidade da terapia encontra-se estagnado. Estudos internacionais também apontam que terapias que exigem mudança de vida trazem também uma quantidade significativa de desistência, quando em um estudo com 203 pacientes, 89 (43,8%) desistiram de uma psicoterapia por motivos de desmotivação (Bados, 2007).



A escassez de dados dos prontuários do CPICGA impossibilitou a avaliação do acompanhamento, portanto, apenas do CPICES, pode-se verificar a partir dos registros dos terapeutas e relatos dos usuários que houve a remissão da sintomatologia que precipitou a classificação em SD antes da alta do usuário. A média de sessões para o início dos relatos de redução das queixas variou de duas a três sessões, respectivamente para a terapia de florais e acupuntura. Homeopatia não possuía dados em detalhamento suficiente para permitir essa análise. Contudo, vale ressaltar, a lógica do cuidado das PIC não se baseia unicamente na ausência das queixas iniciais, mas sim da valorização da análise integral do sujeito e, dessa forma, o número de sessões e o acesso a outras práticas, concomitantemente, serão avaliados de modo singular.

O CPICES tem como critério, porém, um número mínimo de quatro sessões para terapias individuais, mas em média são necessárias oito sessões para alta. O CPICGA, por sua vez, informa realizar um mínimo de dez sessões.

#### **4. CONCLUSÃO**

De posse dos dados, é possível afirmar que as PIC apresentadas, em especial, acupuntura e floral, apresentaram efetividade no tratamento de sofrimento difuso, devido à presença de efeitos positivos nos usuários em número reduzido de sessões e ao quantitativo aceitável de adesão ao tratamento.

São necessárias novas pesquisas para entender o fenômeno das práticas integrativas, do acompanhamento dos usuários e do motivo para abandono das práticas, pois mesmo que aceitável o número de abandonos, o ônus dos tratamentos não finalizados recai sobre o SUS e as contas públicas.

#### **5. REFERÊNCIAS**

- BADOS, A; BALAGUER, G.; SALDAÑA, C. The efficacy of cognitive-behavioral therapy and the problem of drop - out. *Journal of clinical psychology*, v. 63, n.6, p. 585-592, 2007.
- CADE, N.V. Aspectos psicossociais no cotidiano dos hipertensos: um estudo sobre a descontinuidade do tratamento em pacientes pertencentes ao programa para controle da hipertensão arterial. *Revista Brasileira de Enfermagem*, v. 50, n.1, p. 146, 1997.
- CHILELLI, K.B.; ENEAS, M.L.E. Desistência em psicoterapia breve: pesquisa documental e da opinião do paciente. *Boletim de Iniciação Científica de Psicologia*, v. 1, n.1, p. 47-52, 2000.
- FONSECA, M.L.G. Sofrimento difuso, transtornos mentais comuns e problema de nervos: uma revisão bibliográfica a respeito das expressões de mal-estar nas classes populares. *Dissertação de Mestrado em Saúde Pública*. Rio de Janeiro: Ensp-Fiocruz, 2007.
- DE OLIVEIRA, J.S.A; SOARES, A.L.; DE ARAÚJO, T.D. Revisão integrativa de literatura sobre a desistência ao tratamento de diabetes mellitus. *Catussaba*, v.3, n.2, p.87-95, 2014.
- SOUSA I.M.C. Medicinas tradicionais alternativas e complementares e sua estruturação na atenção primária: uma reflexão sobre o cuidado e sua avaliação. *Tese de Doutorado em Saúde Pública*. Rio de Janeiro: Ensp-Fiocruz, 2013.
- SOUSA I.M.C; VIEIRA, A.L.S. Serviços Públicos de saúde e medicina alternativa. *Ciência & Saúde Coletiva*, v.10, Supl, p.255-266, 2004.

#### **6. AGRADECIMENTOS**

Ao CNPq



ÁREA DE SUBMISSÃO : TERAPIAS EM SAÚDE – TS 4

**DIETILCARBAMAZINA (DEC) PROTEGE CONTRA  
HEPATOTOXICIDADE AGUDA INDUZIDA POR  
TETRACLORETO DE CARBONO (CCl<sub>4</sub>) EM CAMUNDONGOS,  
POR REDUZIR MARCADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS E  
ESTRESSE OXIDATIVO**

S.W.S. ROCHA<sup>1,2</sup>, B.V.S. RUFINO<sup>2</sup>, L.A.C. BARROS<sup>2</sup>, D.R.B. ALBUQUERQUE<sup>2</sup>, L.C.S. FEIJÓ<sup>2</sup>,  
C.A. PEIXOTO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Departamento de Entomologia.

<sup>2</sup> Faculdade de Ciências Humanas de Olinda, Núcleo de Estudos e Pesquisas FACHO, Departamento de Enfermagem.

E-mail para contato: surawanessa@gmail.com

*RESUMO – As doenças hepáticas representam sérios problemas de saúde pública, afetando indivíduo, sociedade e economia do país. O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos protetores de DEC sobre a hepatotoxicidade induzida por CCl<sub>4</sub> em camundongos. Uma dose de 50 mg/kg de DEC foi administrada via intragástrica, durante 12 dias antes do CCl<sub>4</sub> (óleo de oliva, 2 ml / kg). Os camundongos foram eutanasiados 24 horas após a injeção de CCl<sub>4</sub>. O aumento nos níveis séricos de óxido nítrico nos animais intoxicados por CCl<sub>4</sub> foi suprimido após tratamento com DEC. A atividade hepática de glutatióna redutase (GR) foi significativamente reduzida no grupo de CCl<sub>4</sub>, no entanto após tratamento com DEC a atividade de GR aumentou. A histopatologia do fígado também demonstrou que a DEC reduziu as lesões induzidas por CCl<sub>4</sub>. Além disso, a DEC reduziu a expressão do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) em camundongos tratados com CCl<sub>4</sub>. O envolvimento da metaloproteinase de matriz (MMP) -9 no desenvolvimento de lesão do fígado induzida por CCl<sub>4</sub> em ratos também foi examinada, observou-se que a DEC diminuiu a expressão dessa proteína. Em contraste, o grupo CCl<sub>4</sub> exibiu baixa expressão da IL-10, ao passo que o grupo CCl<sub>4</sub>+ DEC aumentou significativamente a expressão de IL-10. Os resultados deste estudo indicam que a DEC pode ser eficaz na proteção da lesão hepática aguda induzida por CCl<sub>4</sub>. Os mecanismos hepatoprotetores de DEC podem estar relacionados com a atenuação de estresse oxidativo, bem como a atividade anti-inflamatória deste fármaco.*

*Palavras-chave: Dietilcarbamazina, hepatoprotector, anti-inflamatório, tetracloreto de carbono, lesão aguda.*



**ABSTRACT-** *Liver diseases represent serious public health problems, affecting the individual, society and economy of the country. The aim of present study investigated the protective effects of DEC on CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity in mice. A dose of 50 mg/kg of DEC was administered intragastrically for 12 days before the CCl<sub>4</sub> (olive oil, 2 ml/kg) was administered via injection. Mice were euthanized 24 h after the CCl<sub>4</sub> injection. The rise in serum levels of nitric oxide in CCl<sub>4</sub>-intoxicated mice was suppressed markedly by DEC. Hepatic activity of glutathione reductase (GR) was significantly reduced in the CCl<sub>4</sub> group, whereas DEC induced increased levels of GR activity. Liver histopathology also showed that DEC reduced the incidence of liver lesions induced by CCl<sub>4</sub>. In addition, DEC reduced the expression of tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) and interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in CCl<sub>4</sub>-treated mice. The involvement of matrix metalloproteinase (MMP)-9 in the development of CCl<sub>4</sub>-induced liver damage in rats was also examined. DEC decreased the expression of this protein. Contrastingly, the CCl<sub>4</sub> group exhibited low expression of IL-10, whereas the CCl<sub>4</sub>+DEC group significantly enhanced IL-10 expression. The results of this study indicate that DEC could be effective in protecting the liver from acute CCl<sub>4</sub>-induced injury. The hepatoprotective mechanisms of DEC may be related to the attenuation of oxidative stress, as well as to anti-inflammatory activity.*

**Keywords:** *Diethylcarbazine, hepatoprotective, anti-inflammatory, carbon tetrachloride, acute injury*

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças hepáticas representam um grave problema de saúde pública, comprometendo não só o bem-estar social do indivíduo com também a economia do país. Oriundas de diferentes etiologias, as doenças do fígado têm gerado uma curva ascendente de morbidade, sendo responsável por um considerável número de atendimentos e internações hospitalares com um índice crescente de risco de morte. Dentre as causas mais comuns das doenças do fígado estão o consumo excessivo de álcool e as hepatites virais (Tsui *et al.*, 2006). Recentemente, em nosso laboratório, demonstrou-se que a DEC atua reduzindo os níveis de mediadores inflamatórios em hepatócitos de camundongos expostos ao uso crônico de etanol, além de atuar como um fármaco hepatoprotetor, diminuindo lesões celulares em camundongos desnutridos (Rocha *et al.*, 2012, Rocha *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2015).

Desta forma, faz-se necessário esclarecer o mecanismo de ação da DEC sobre o processo inflamatório hepático agudo de camundongos C57BL/6 com o objetivo de elucidar o mecanismo de ação deste fármaco e avaliar se o composto apresenta atividade anti-inflamatória e antioxidante ampliando sua utilização no mercado.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 40 camundongos machos da linhagem C57BL/6 com 4-6 semanas, provenientes do Centro de Criação de Animais de Laboratório (FIOCRUZ - Rio de Janeiro). Os grupos experimentais foram (n= 10 animais): grupo controle; grupo DEC 50mg/kg; grupo CCl<sub>4</sub> e grupo CCl<sub>4</sub>+DEC. Administrações diárias da solução de DEC 50mg/kg foi realizada via gavagem (cânula estomacal), em volume total de 200µl, por 12 dias; o grupo controle e CCl<sub>4</sub> receberam 200µl de água destilada também via gavagem (Rocha *et al.*, 2012). No penúltimo dia do pré-tratamento com DEC, foi realizada uma injeção intraperitoneal de CCl<sub>4</sub> (2 ml/kg, em óleo de oliva), nos grupos CCl<sub>4</sub> e CCl<sub>4</sub>+DEC. Vinte e quatro horas após a injeção, os camundongos foram eutanasiados e fragmentos hepáticos foram retirados e processados para bioquímica, microscopia óptica, imunohistoquímica e western blot.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos resultados histopatológicos do grupo controle e grupo DEC 50 mg/kg, não houve alteração em sua morfologia padrão. No grupo dos animais expostos ao CCl<sub>4</sub>, foi observada marcante degeneração citoplasmática e nuclear, com a presença de necrose, infiltrados inflamatórios e focos hemorrágicos, conforme a figura 1. Santos Rocha *et al.*, também observou redução das lesões hepáticas após o tratamento com DEC. Os animais tratados com CCl<sub>4</sub>+DEC, mostraram uma diminuição de todas as lesões observadas no grupo CCl<sub>4</sub>. Resultados da imunohistoquímica revelaram grande expressão dos marcadores inflamatórios como TNF- $\alpha$  e IL 1 $\beta$  nas áreas necróticas e nos infiltrados mononucleares, principalmente em áreas perivenulares no grupo CCl<sub>4</sub>. No entanto, houve uma redução da imunoreatividade dessas citocinas após tratamento com DEC 50 mg/kg, conforme figura 2 e 3. Análises feitas por western blot mostraram aumento da expressão de IL1 $\beta$  e MMP-9 no grupo CCl<sub>4</sub> e houve uma significativa redução da expressão destas proteínas após tratamento com DEC 50mg/kg, no entanto a expressão da citocina anti-inflamatória IL10, houve um aumento significativo no grupo CCl<sub>4</sub>+DEC, conforme figura 4C, D e E. De acordo com Rodrigues *et al.*, 2015, a DEC tem um potencial anti-inflamatório por aumentar os níveis de IL-10. A atividade hepática de glutatona redutase (GR) foi significativamente reduzida no grupo de CCl<sub>4</sub>, no entanto após tratamento com DEC a atividade de GR aumentou, ver figura 4A. O aumento nos níveis séricos de óxido nítrico nos animais intoxicados por CCl<sub>4</sub> foi suprimido após tratamento com DEC, conforme figura 4B.

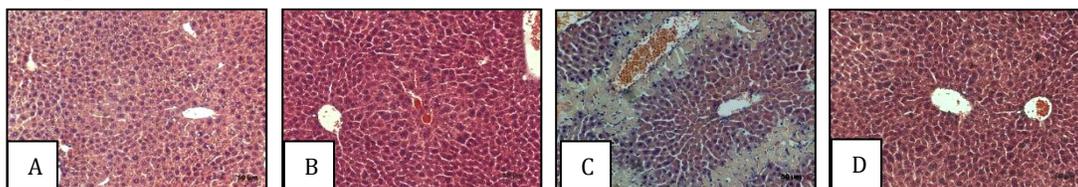


Figura 1: Histopatologia do fígado. (A) Grupo de controle, receberam apenas água; (B) grupo DEC 50mg/ kg; (C) grupo CCl<sub>4</sub>; (D) grupo CCl<sub>4</sub> + DEC 50mg/kg. Ampliação: 200x.

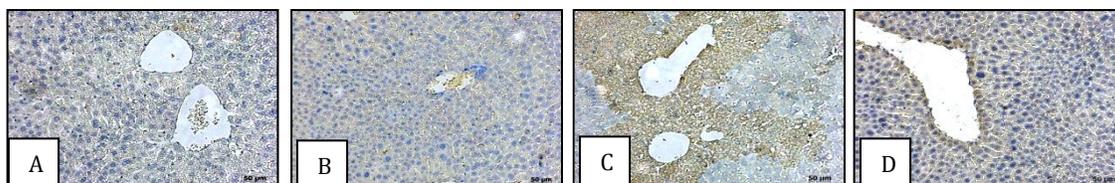


Figura 2: Micrografias de imunohistoquímica para marcação de TNF- $\alpha$ . (A) grupo controle; (B) grupo DEC 50 mg/kg; (C) grupo CCl<sub>4</sub>; (D) grupo CCl<sub>4</sub>+DEC 50mg/kg; Ampliação: 200x.

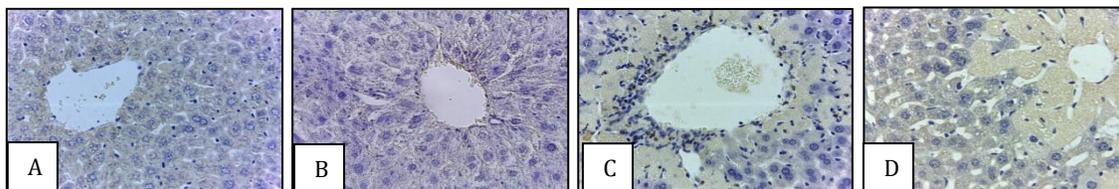


Figura 3: Imunohistoquímica para marcação de IL-1 $\beta$ . (A) grupo controle; (B) grupo DEC 50 mg/kg; (C) grupo CCl<sub>4</sub>; (D) grupo DEC+CCl<sub>4</sub>. Ampliação: 200x.

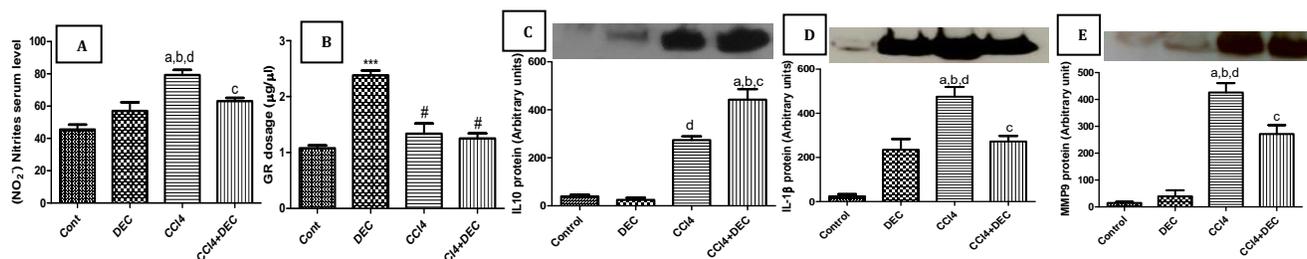


Figura 4: Determinação da atividade de glutationa redutase (GR) e óxido nítrico (NO). Os níveis da dosagem de GR e NO estão ilustrados nos gráficos A e B respectivamente (média  $\pm$  D.P (n = 5). Legendas dos gráficos \*\*\* p<0,01 quando comparado com o controle; # p <0,01 quando comparado com o grupo de DEC. Análise de expressão por western blot. IL10 (C), IL1 $\beta$  (D) e MMP-9 (E). Os dados foram avaliados por análise de variância one-way seguida do pós-teste de Tukey. Legendas dos gráficos de NO e western blot: (a) p <0,05 quando comparado com o grupo controle; (b) p <0,05 quando comparado com o grupo DEC; (c) p <0,01 quando comparado com o grupo CCl<sub>4</sub>; (d) p <0,05 quando comparado com o grupo CCl<sub>4</sub> + DEC.

## 4. CONCLUSÃO

O presente trabalho permitiu verificar que a DEC tem ação hepatoprotetora e anti-inflamatória em modelo de injúria hepática aguda. Foi possível observar que na injúria aguda a DEC foi capaz de reduzir necrose celular, infiltrados inflamatórios e focos hemorrágicos. Verificou-se também que a DEC reduziu a expressão de mediadores inflamatórios. Em contra partida, um aumento significativo dos níveis da enzima antioxidante glutationa redutase e da citocina anti-inflamatória IL-10 foi observado após o tratamento com a DEC, atribuindo um efeito hepatoprotetor, antioxidante e anti-inflamatório desse fármaco. Conclui-se, portanto, que em modelo de injúria hepática aguda a DEC apresenta benefícios atuando como um fármaco hepatoprotetor e anti-inflamatório frente às lesões induzidas pela substância tóxica CCl<sub>4</sub>, a qual apresenta semelhanças com patologias humanas.

## 5. REFERÊNCIAS



ROCHA, S.W.S.; et al. Effects of Diethylcarbamazine (DEC) on hepatocytes of C57BL/6J mice submitted protein malnutrition. *JFDA*. 20, 524–531, 2012.

RODRIGUES, G.B. Diethylcarbamazine: Possible therapeutic alternative in the treatment of alcoholic liver disease in C57BL/6 mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 42, 369–379, 2015.

SANTOS ROCHA, S.W., et al. Effect of diethylcarbamazine on chronic hepatic inflammation induced by alcohol in C57BL/6 mice. *Eur. J. Pharmacol*. 689, 194–203, 2012.

TSUI, J.I. et al. Hepatitis C and hospital outcomes in patients admitted with alcohol-related problems. *J Hepatol*. 44: 262-266, 2006.

#### **6. AGRADECIMENTOS**

PAPES/FIOCRUZ/CNPq e Instituto Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem (INBEB).



**VIGILÂNCIA E  
EPIDEMIOLOGIA EM SAÚDE**

ÁREA DE SUBMISSÃO: VIGILÂNCIA E EPIDEMIOLOGIA EM SAÚDE – VE 1

## CHIKUNGUNYA COMO FATOR DE RISCO PARA RECIDIVA DE ERISPELA

I.B.SILVA<sup>1</sup>, D.P.C.MACÊDO<sup>2</sup> e K.P.RANDAU<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Farmacognosia. Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT).

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas. Laboratório de Análises Microbiológicas.

E-mail para contato: ivanisebrito1@gmail.com

**RESUMO:** *Erisipela é uma doença de etiologia bacteriana, que causa linfangite, danos teciduais e comprometimento do estado geral do paciente. Acomete pacientes imunodeprimidos e/ou portadores de lesões na pele que servem de porta de entrada. Este estudo objetivou associar a recidiva de erisipela com a ocorrência de febre de Chikungunya em duas pacientes cadastradas em duas Unidades de Saúde da Família (USF) da Região Metropolitana do Recife-RMR. A coleta de dados aconteceu com auxílio de entrevista semi-estruturada com uma paciente de cada USF. As pacientes apresentaram recidiva da erisipela, com manifestações mais acentuadas da doença, após a infecção pelo CHIK vírus. Conclui-se que a ocorrência de Febre de Chikungunya em pacientes portadores de erisipela pode desencadear recidivas, além de contribuir para um pior prognóstico.*

*Palavras-chave:* Arbovirose; APS; linfangite.

**ABSTRACT:** *Erysipelas is a disease of bacterial etiology, which causes lymphangitis, tissue damage and impairment of the general condition of the patient. It affects immunocompromised patients and /or skin lesions that is gatekeepers. This study aimed to associate the recurrence of erysipelas with the occurrence of Chikungunya fever in two patients enrolled in two Family Health Units (USF) of the Metropolitan Region of Recife (RMR). Data collection was performed using a semi-structured interview with a patient from each USF. The patients presented recurrence of erysipelas, with more pronounced manifestations of the disease, after infection by the CHIK virus. It is concluded that the occurrence of Chikungunya Fever in patients with erysipelas can trigger relapses, besides contributing to a worse prognosis.*

*Keywords:* Arbovirus; PHC; lymphangitis.

### 1. INTRODUÇÃO

A erisipela é uma infecção cutânea aguda causada essencialmente por estreptococos, especialmente *Streptococcus pyogenes* (estreptococo do grupo A, beta-hemolítico), embora

estreptococos dos grupos C e G e *Streptococcus agalactiae* (grupo B) também possam estar associados. Com frequentes recidivas ao longo da vida do indivíduo acometido, esta infecção se caracteriza por apresentar lesões eritematosas, com perda parcial da pele, flictena, comprometimento de tecido subcutâneo e necrose (Silva *et al.*, 2013). Não possui faixa etária específica para ocorrência, contudo, é mais comum em idosos, manifesta-se preferencialmente em membros inferiores, superiores e região facial (Bernardes *et al.*, 2002).

O diagnóstico é essencialmente clínico, o isolamento do(s) agente(s) etiológicos raramente é realizado, provavelmente devido a suas complexas exigências dos meios de cultura. O antibiótico de escolha para o tratamento é Penicilina G, via intramuscular (IM), quando o paciente apresenta reação alérgica a esse tipo de medicamento, pode-se utilizar eritromicina oral (Bernardes *et al.*, 2002).

Alterações na pele, que promovam porta de entrada para microrganismos, são consideradas fatores de risco, destacando-se dermatoses preexistentes, traumas, feridas operatórias e alterações vasculares, bem como, diabetes mellitus, etilismo, corticoterapia, e doenças que causem leucopenia (Okajima *et al.*, 2004). Doenças virais podem atuar como fatores de risco por causarem comprometimento da imunidade, o Brasil atualmente enfrenta um problema de saúde pública, provocado pelas arboviroses: dengue (DEN), Zika (ZIKA) e Chikungunya (CHIK), transmitidas pelos mesmos vetores: *Aedes aegypti* e *A. albopictus* (Maniero *et al.*, 2016).

Há na literatura, poucos trabalhos envolvendo tratamentos adequados e alternativos para erisipela, o manejo para diagnóstico e terapia ainda é subestimado na prática clínica, especialmente quando a doença está associada à outras patologias. Outro entrave encontrado pelos pacientes está relacionado ao acompanhamento na Atenção Básica, que nem sempre apresenta condições adequadas para diagnóstico e elaboração de Projeto Terapêutico eficaz, agravando dessa forma, a patologia. Esse trabalho objetiva associar a recidiva de erisipela com a ocorrências de febre de Chikungunya em duas pacientes cadastradas em duas USF, localizadas nos municípios de Recife/PE e Jaboatão dos Guararapes/PE (Região Metropolitana do Recife - RMR) através de um estudo de caso.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo qualitativo, descritivo, do tipo estudo de caso, realizado no 1º semestre de 2016 em duas Unidades de Saúde da Família (USF), uma localizada no município de Recife/PE e outra em Jaboatão dos Guararapes/PE (Região Metropolitana do Recife - RMR). O trabalho foi aprovado no Comitê de ética em Pesquisa com Humanos da UFPE-CAAE 48994015.3.0000.5208. A coleta de dados aconteceu com auxílio de entrevista semi-estruturada com uma paciente de cada USF. As questões norteadoras estavam relacionadas à doença bacteriana, recidivas, fatores de risco, comorbidades associadas e tratamento.

### • História clínica 1

Paciente SLSS, sexo feminino, 64 anos, hipertensa e diabética, em uso de anti-hipertensivo e insulina. Relata que teve a primeira crise há aproximadamente um ano, após ter machucado a perna com uma pedra no mar. Refere preocupação, pois sua genitora também tem erisipela e encontra-se com dificuldade para deambular por conta da doença. Deu entrada numa Unidade de Pronto Atendimento em fevereiro de 2016, com sintomas de

erisipela, recebeu uma dose de Benzetacil IM, foi encaminhada para casa e orientada para procurar a USF para realizar acompanhamento. Dois meses depois, os sintomas persistem, com presença de edema em membros inferiores, vermelhidão, febre, pele descamativa, e dor no local. A paciente refere que o fato de ter tido febre da Chikungunya no mês de janeiro agravou seu quadro e piorou as dores nas articulações e no joelho, que apresentava edema importante.

- **História clínica 2**

Paciente OM, sexo feminino, 59 anos, refere que apresenta a doença há aproximadamente 5 anos, com 2 recidivas nesse período, este ano apresentou uma crise após ter tido Chikungunya. Faz tratamento com Benzetacil IM a nível ambulatorial, nega internamento hospitalar, porém apresenta queixa de dor e ardor em membros inferiores. A realização do curativo alivia a sensação de “queimação” segundo a paciente. A genitora e a irmã apresentam a doença, nega a utilização de plantas medicinais para tratamento da doença, apesar de os vizinhos indicarem a colocação da folha da pimenta no leito da ferida. Encontrase com lesão bolhosa em MMII, áreas com rompimento de epiderme, bordas definidas, hiperemia e edema em MMII realizando curativo com soro fisiológico 0,9% e loção hidratante a base de ácidos graxos essenciais.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A erisipela manifesta-se, principalmente, nos membros inferiores, mas pode também aparecer em membros superiores, tronco e face em uma proporção menor. A bactéria *Streptococcus pyogenes* propaga-se pelos vasos linfáticos, acometendo com maior frequência diabéticos, obesos e portadores de deficiência da circulação venosa (Silva *et al.*, 2013). As manifestações do vírus Chikungunya (CHIKV) são: febre aguda, dor articular intensa (geralmente tornozelos, punho e articulação da mão), mialgia, náusea, vômito, erupção cutânea e exantema maculopapular, com recuperação por volta do décimo dia, porém alguns indivíduos podem evoluir com dor articular por meses ou anos (Pustiglione, 2016).

O boletim epidemiológico 44, do Ministério da saúde (MS), apresenta as notificações das arboviroses no Brasil no período de 04/01/15 a 05/12/15. Destacando 1.587.080 casos prováveis de dengue no país, Pernambuco apresentou 92.395 notificações, das quais 20 evoluíram para óbito. Em relação à Chikungunya foram confirmados 6.784 casos autóctones, as cidades Recife e Jaboatão dos Guararapes notificaram 43 e 2 casos confirmados, respectivamente (Brasil, 2015).

As duas pacientes do estudo, residentes na RMR, apresentaram recidiva de erisipela após a infecção pelo CHIKV, cursando com manifestações clínicas mais severas. Na literatura não há trabalhos que associam CHIKV e erisipela, dificultando dessa forma, o levantamento de justificativas que expliquem a ocorrência da erisipela secundária à doença viral e elucidem os fatores envolvidos nesse processo. Uma hipótese é associar as erupções cutâneas, depressão do sistema imunológico e leucopenia causadas pela arbovirose com fatores de risco e/ou criação de portas de entrada para os agentes causadores da doença bacteriana. Recidiva de dores articulares provocadas por CHIKV são descritas na literatura, apesar de não haver bem definido os mecanismos responsáveis pelas recaídas. As artralguas podem se manifestar meses depois da infecção, na ocorrência de infecções preexistentes, como artrite, a doença

apresenta pior prognóstico (Simon *et al.*, 2008). Os efeitos do CHIKV sobre doenças infecciosas e de manifestações cutâneas precisam ser vistos, uma vez que são escassos trabalhos que avaliam os impactos da febre de Chikungunya sobre essas patologias.

#### 4. CONCLUSÃO

A ocorrência de Chikungunya em pacientes portadores de erisipela pode desencadear recidivas da doença, além de contribuir para um pior prognóstico, que requer maior atenção. Os profissionais da atenção primária precisam estar atentos à ocorrência dessas arboviroses em pacientes que apresentam doença de base. Além disso, faz-se necessário a criação de protocolos que orientem os profissionais de saúde, sobre o atendimento a pacientes quem estão com a integridade da pele comprometida e foram acometidos por infecções como CHKV.

#### 5. REFERÊNCIAS

- BERNARDES, C.H.A.; AUGUSTO, J.C.A.; LOPES, L.T.C.; CARDOSO, K.T.; SANTOS, J.R.; SANTOS, L.M. Experiência clínica na avaliação de 284 casos de erisipela. *An Bras Dermatol.* v. 77, p.605-609, 2002.
- BRASIL. *Boletim Epidemiológico*. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da saúde. v. 44, p 1-9, 2015.
- MANIERO, VC.; SANTOS, M.O.; RIBEIRO, R.L.; OLIVEIRA, P.A.C.; SILVA, T.B.; MOLERI, A.B.; MARTINS, I.R.; LAMAS, C.C.; CARDOZO, S.V. Dengue, chikungunya e zika vírus no brasil: situação epidemiológica, aspectos clínicos e medidas preventivas. *Almanaque multidisciplinar de pesquisa.* v.1, p. 118-145, 2016.
- OKAJIMA, R.M.O.; FREITAS, T.H.P.; ZAITZ, C. Estudo clínico de 35 pacientes com diagnóstico de erisipela internados no Hospital Central da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. *An Bras Dermatol.* v. 79, p.295-303, 2004.
- PUSTIGLIONE, M. Medicina do Trabalho e doenças emergentes, reemergentes e negligenciadas: a conduta no caso das febres da dengue, do Chikungunya e do Zika vírus. *Rev Bras Med Trab.* v.14, p. 1-12, 2016.
- SILVA, P.L.N.; ABREU, G.G.D.; FONSECA, J.R.; SOUTO, S.G.T.; GONÇALVES, R.P.F. Diagnósticos e intervenções de enfermagem em paciente com erisipela: estudo de caso em hospital de ensino. *Revista Eletrônica Gestão & Saúde.* v. 4, p. 512-1526, 2013.
- SIMON, F.; SAVINI, H.; PAROLA, P. Chikungunya: a paradigm of emergence and globalization of vector-borne diseases. *Med Clin North Am.* v. 92, p. 1323-43, 2008.

#### 6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro e as USF Campo do Banco (Distrito IV – Recife) e Odorico Melo (Jaboatão dos Guararapes).



# TRABALHOS COMPLETOS



**BIOENSAIOS**



ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOENSAIOS – B 2

## AVALIAÇÃO ELETROQUÍMICA DA PLATAFORMA NANOESTRUTURADA COM NANOTUBOS DE CARBONO PARA DETECÇÃO DE MICOTOXINA

M.P. COSTA<sup>1</sup>, C.A.S. ANDRADE<sup>2</sup>, I.A.M. FRIAS<sup>1</sup>, M.D.L. OLIVEIRA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, UFPE, Recife/PE, Brasil.

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, UFPE, Recife/PE, Brasil

E-mail: maurilia\_palmeira@hotmail.com.br

*RESUMO – Neste trabalho, desenvolvemos uma plataforma nanoestruturada com base em nanotubos de carbono (MWCNTs) ligados a cisteína através do grupo sulfidril na superfície do eletrodo de trabalho para detectar aflatoxina B1 (AFB1) presente em farinha de milho. A interação antígeno-anticorpo foi realizada utilizando o par redox ferro-ferricianeto de potássio ( $[Fe(CN)_6]^{4-}/[Fe(CN)_6]^{3-}$ ). As alterações nas propriedades interfaciais do eletrodo foram determinadas por meio da espectroscopia de impedância electroquímica. A interação do sensor com diferentes concentrações de antígeno AFB1 presente na farinha de milho resultou em alterações na resistência de transferência de carga para a detecção de aflatoxina B1 em baixas concentrações (limite de detecção  $3,5 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ).*

*Palavras-chave: Imunossensor, Impedância Eletroquímica, Aflatoxina B1.*

*ABSTRACT: In this work, we developed a sensor platform based on carbon nanotubes (MWCNTs) attached to cysteine through the sulfhydryl group to the surface of the working electrode to detect aflatoxin B1 present in cornmeal. The antigen-antibody interaction was performed by using  $[Fe(CN)_6]^{4-}/[Fe(CN)_6]^{3-}$  redox couple. Changes in interfacial properties of the electrode were determined by electrochemical impedance spectroscopy. The interaction of the sensor with different concentrations of AFB1 antigen present in the corn flour resulted in changes in the charge transfer resistance for aflatoxin B1 detection at low concentrations (detection limit  $3.5 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ).*

*Keywords: Imunosensor, Electrochemical Impedance, Aflatoxin B1.*



## 1. INTRODUÇÃO

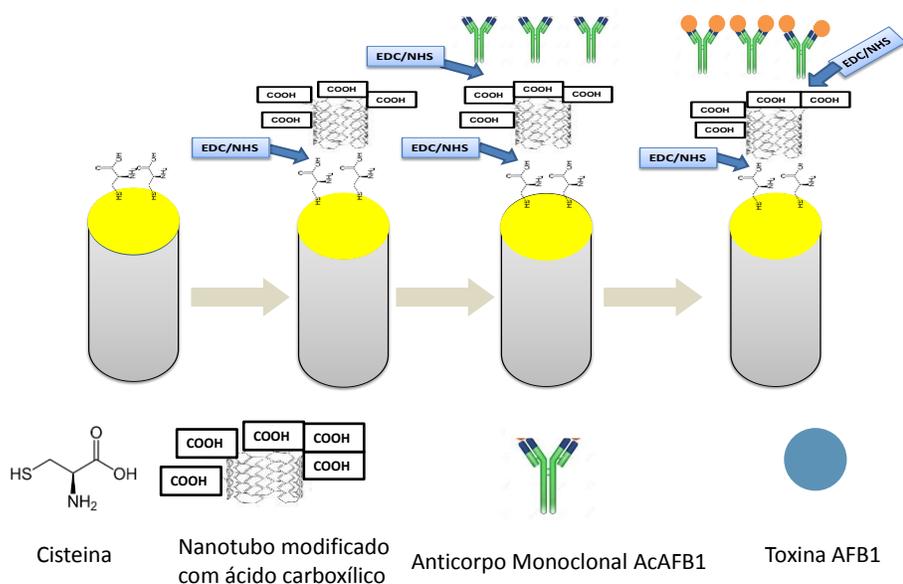
As Aflatoxinas são derivadas de fungos do gênero *Aspergillus*, que se caracteriza por ser um fungo diversificado e filamentosos que tem dois representantes principais: *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* que atuam como agentes patogênicos oportunistas, causando a deterioração dos alimentos que podem ser responsáveis por várias doenças [1-2]. A aflatoxina B1 (AFB1) que está ganhando destaque entre as demais micotoxinas por representar o grupo de micotoxinas que apresenta mais resultados positivos já relatado alimentos [3]. De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer para AFB1 é caracterizado como um potente cancerígeno, teratogênico, mutagênico [4], além de ser um fator de risco para o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular pois apresenta alta toxicidade. Os métodos atuais de detecção incluem a cromatografia em camada fina [6], cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE [7] e de enzimas linked immunosorbent assay (ELISA) requerem uma análise de tempo e um pré-tratamento da amostra. Por meio das técnicas eletroquímicas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), que fornece um estudo da cinética de eletrodo e dupla camada elétrica. Em adição, a voltametria cíclica (CV) é um método que fornece as informações da interface de eletrodo biologicamente modificado, permitindo o acompanhamento da taxa de transferência de carga entre o eletrodo e a solução [5]. O emprego de biossensores eletroquímicos demonstra uma alternativa viável na análise devido à detecção precoce, boa sensibilidade, especificidade elevada, seletividade e muitas vezes apresenta simplicidade em desenvolvimento e custo reduzido [6]. Neste contexto, o objetivo deste estudo é desenvolver uma plataforma nanoestruturada formada por MWCNT para a identificação de aflatoxina B1 em farinha de milho com limite de detecção em escala de picograma para evitar a proliferação da toxina B1 nos alimentos e a possível contaminação da população.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Cloreto férrico, cloreto ferroso, ferrocianeto de potássio e ferricianeto de potássio foram obtidos a partir VETEC (Brasil), (3-dimetilaminopropil) carbodiimida 1-etil-3- (EDC), N-hidroxissuccinimida (NHS), nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT), cisteína (Cys), anticorpo monoclonal aflatoxina (AcAAB1), aflatoxina B1 (AFB1), foram obtidos a partir de Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). A farinha de milho foi obtida da Neogen (EUA). O método empregado para as análises foi por meio das técnicas analíticas de Voltametria Cíclica (VC) e Espectroscopia utilizando o equipamento PGSTAT 128N potenciostato / galvanostato (AUTOLAB, Eco Chemie, Holanda). As medições EIE foram entre 100 MHz e 100 kHz com a amplitude do potencial de onda senoidal aplicada de 10 mV. As medições eletroquímicas foram realizadas à temperatura de 24°C no interior de uma gaiola de Faraday. Todas as experiências foram realizadas em triplicado utilizando, pelo menos, três sensores diferentes. O eletrodo de ouro (BGE) com = 2 milímetros (Microchimica, Brasil) foi polido com pó

de alumina (0,05 M), sonificado em água ultrapura durante 10 minutos e seco ao ar. Na montagem do Imunossensor foi adicionado 2 $\mu$ L cisteína (Cys) na superfície do sensor seguido pela ativação de EDC / NHS e adicionando subsequentemente 2 $\mu$ L nanotubo de carbono durante 40 minutos em seguida, adicionando EDC / NHS durante 10 minutos para ativar o agrupamento Cys- EDC / NTC-NHS-EDC / NHS. Foi subsequentemente adicionando 2 $\mu$ L Anticorpo Monoclonal Aflatoxina B1 (AcAFB1) durante 30 min. Além disso, a especificidade da sonda: Cys EDC / NHS-NTC-EDC / NHS-AcAFB1 foi avaliada contra o alvo com o uso da farinha de milho para uma possível detecção de toxina B1. No exemplo a farinha de milho estava contaminada com AFB1 em níveis de 0,026ng/ $\mu$ L<sup>-1</sup>; 0,013ng/ $\mu$ L<sup>-1</sup> 6,5pg/ $\mu$ L<sup>-1</sup> 3,25pg/ $\mu$ L<sup>-1</sup>.

### METODOLOGIA PARA MONTAGEM DA PLATAFORMA SENSORA



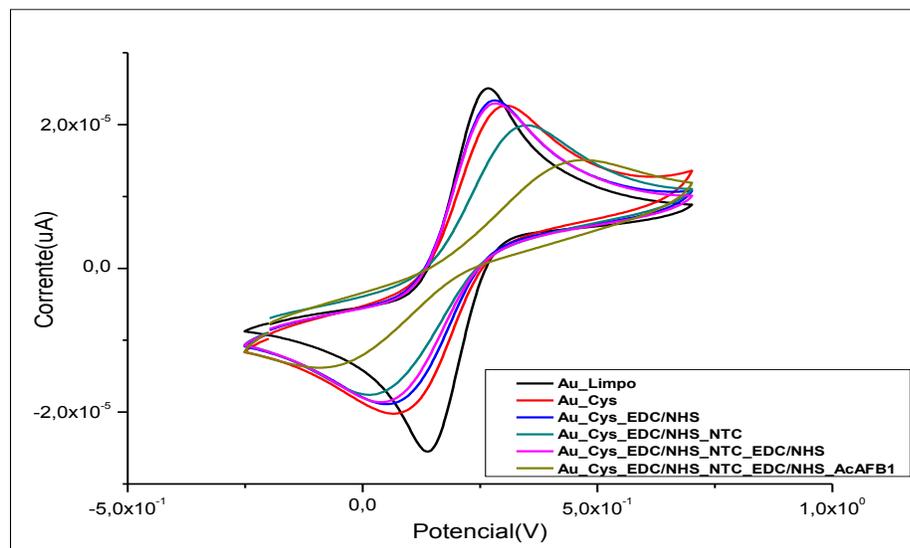
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As técnicas de VC e EIE empregadas foram realizadas seguidamente, para cada analito adicionado na superfície do sensor. VC é um método eficaz que proporciona informação das alterações no comportamento eletrodo depois de cada passo de modificação, uma vez que as alterações na corrente de pico e a separação de potencial de pico estão relacionadas com a resistência de transferência de elétrons [8]. Na figura 1 são observados modificações da superfície do eletrodo, revelou um voltamograma cíclico reversível, houve um aumento na resposta da corrente foi observada após a modificação com Cys foi observado um aumento

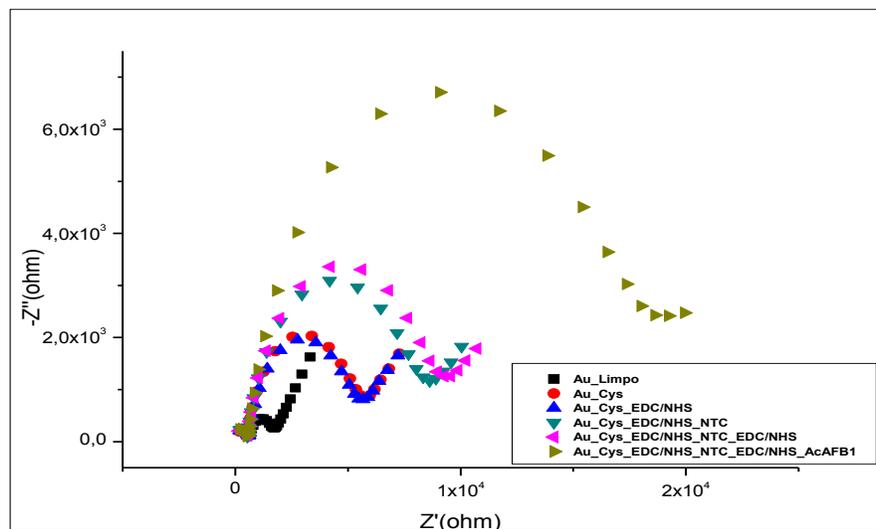
devido ao efeito da repulsão entre as cargas negativas para sinalizar amplificação. Seguida pela adição do nanotubo houve uma diminuição da corrente, seguida pela adição do anticorpo de aflatoxina B1 e novamente houve um aumento devido a repulsão entre as cargas.

Os resultados da EIE estão de acordo com os da VC. Para EIE foi observada uma modificação gradual eletrodo mostrados na Fig. 1B. Os diagramas de Nyquist obtidos apresentam um semicírculo em frequências mais altas que é atribuída ao processo limitada transferência de elétrons seguidos por uma linha reta em frequências mais baixas, atribuída ao processo de transferência de elétrons limitada difusão.

A resposta impedimétrica da camada de cisteína apresentou uma maior resistência à transferência de elétrons interfacial ( $R_{CT} = 374\Omega$ ) indicando que o material foi depositado na superfície do eletrodo. A ativação da camada de Cys utilizando NHS/EDC de acoplamento agentes resultou em uma diminuição do RCT ( $R_{CT} = 411\Omega$ ). Após a imobilização do NCT no eletrodo foi obtido um aumento no ( $R_{ct} = 621\Omega$ ). Após o acoplamento do eletrodo NTC-Cys-modificado EDC/NHS com o anticorpo monoclonal AcAFB1 a resistência interfacial aumentou notavelmente ( $R_{ct} = 5040\Omega$ ). Os dados de EIE indicaram a presença de moléculas na superfície do eletrodo, onde a quantidade de material imobilizada -refletiu no aumento da resposta impedimétrica.



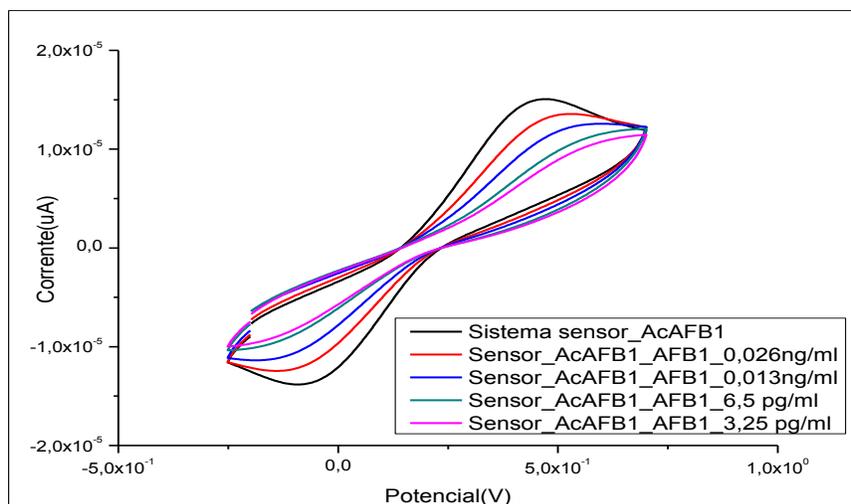
**Figura 1A.** Voltamograma cíclico da imobilização gradual do sistema: Cys-NTC-AcAFB1: eletrodo de ouro limpo, eletrodo modificado com Cys, Cys-EDC / NHS, Cys-EDC / NHS- NTC, Cys-EDC / NHS-NTC-EDC / NHS, e Cys-EDC / NHS-NTC-EDC / NHS-AcAFB1.



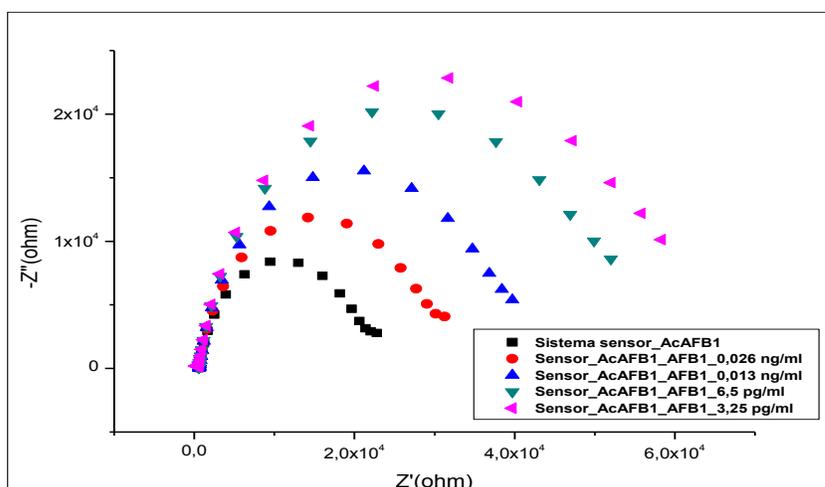
**Figura 1B.** Curvas de Nyquist da imobilização gradual do sistema: Cys-NTC-AcAFB1: eletrodo de ouro limpo, eletrodo modificado com Cys, Cys-EDC / NHS, Cys-EDC / NHS- NTC, Cys-EDC / NHS-NTC-EDC / NHS, e Cys-EDC / NHS-NTC-EDC / NHS-AcAFB1.

As Figuras 2A e 2B mostram os voltamogramas e diagramas de Nyquist do imunossensor expostos a diferentes concentrações de toxina AFB1 presente na farinha de milho-alvo. A montagem do sistema sensor e o processo de hibridação foram acompanhados por uma diminuição na resposta amperométrica do sistema e um aumento na separação de pico-a-pico entre as ondas catódicas e anódicas da sonda redox.

**Figura 2.** Os voltamogramas cíclicos (a), Nyquist (b), representam o sistema sensor e sua interação com aflatoxina B1 presente em farinha de milho.



**Figura 2A.** Voltamograma cíclico representa o sistema sensor e sua interação com aflatoxina B1 presente em farinha de milho (  $0,026\text{ng}/\mu\text{L}^{-1}$ ;  $0,013\text{ng}/\mu\text{L}^{-1}$   $6,5\text{pg}/\mu\text{L}^{-1}$   $3,25\text{pg}/\mu\text{L}^{-1}$  ).



**Figura 2B.** Diagrama de Nyquist representa o sistema sensor e sua interação com aflatoxina B1 presente em farinha de milho (  $0,026\text{ng}/\mu\text{L}^{-1}$ ;  $0,013\text{ng}/\mu\text{L}^{-1}$   $6,5\text{pg}/\mu\text{L}^{-1}$   $3,25\text{pg}/\mu\text{L}^{-1}$  ).

A reprodutibilidade foi avaliada utilizando o sensor baseado em AcAFB1 pelo menos cinco sensores fabricados independentemente sob as mesmas condições, o desvio padrão obtido aceitável (R.S.D.) foi de  $\sim 5\%$ , o que sugere que o sensor para AFB1 é reproduzível. Os resultados por obtidos por VC e EIE indicam a possibilidade de emprego do biossensor para aplicações práticas que usam pequenos volumes de amostra, em comparação com



técnicas convencionais alternativas. Os métodos analíticos utilizados foram previamente avaliados com o uso da farinha de milho e reuniram-se a uma possível detecção de toxina B1. No exemplo a farinha de milho foi contaminada com AFB1 em níveis que variou de nanograma a picograma nas seguintes concentrações ( $0,026\text{ng}/\mu\text{L}^{-1}$ ;  $0,013\text{ng}/\mu\text{L}^{-1}$ ;  $6,5\text{pg}/\mu\text{L}^{-1}$ ;  $3,25\text{pg}/\mu\text{L}^{-1}$ ).

#### 4. CONCLUSÃO

A sensibilidade do biossensor ao alvo a toxina B1 foi atingido em níveis picogramas no valor de  $3,25\text{ pg}/\mu\text{L}^{-1}$ . Apresentando um bom desempenho na determinação da AFB1 alvo exibindo baixo limite de detecção, seletividade e reprodutibilidade da AFB1 ensaio de imobilização. Neste caso, o dispositivo proposto tem vantagens como a operação conveniente, de baixo custo, simplicidade na montagem do sistema. Dadas estas características únicas e atraentes do imunossensor proposto pode ser uma promissora tecnologia invasiva aplicações não bioanalíticas para o diagnóstico de aflatoxina. Acreditamos que estes resultados servem como uma base importante para o desenvolvimento de um sensor sensível à aflatoxina B1.

#### 4. REFERÊNCIAS

- MURRAY, PATRICK, R.; ROSENTHAL, KEN S.; PFALLER, MICHAEL A. Microbiologia Medica. 5. ed. Rio de Janeiro:Elsevier,2006.
- ULIANA, C. V.; RICCARDI, C. S.; TOGNOLLI, J. O.; YAMANAKA, H. Optimization of an amperometric biosensor for the detection of Hepatitis C virus using fractional factorial designs. J. Braz. Chem. Soc., v. 19, p. 782-787, 2008.)
- PEREIRA, M.L.G.; CARVALHO, E.P.; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. B. Ceppa. v.20, n.1, p.141-156, 2002.)
- IARC-INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC Monographs, 82. Lyon:IARC,2002).
- A.J. BARD, L.R. FAULKNER, Electrochemical methods: fundamentals and applications, 2nd ed., John Wiley & Sons, New York, 2000.
- WANG, H.; SHEN, G.; YU, R. Aspects of recent development of immunosensors. In: ZHANG, X.; JU, H.; WANG, J. Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications. Oxford: Elsevier, 2008. Cap. (9, p. 237-260) .
- VIDOTTI, M.; CARVALHAL, R.F.; MENDES, R.K.; FERREIRA, D.C.M.; Kubota, L.T. (2011) J. Braz. Chem. Soc. Vol, 22, p. 3-20.

#### 6. AGRADECIMENTOS

FACEPE, CNPq e CAPES-Rede de Nanobiotecnologia.



ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOENSAIOS – B 3

## AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE SURFACTANTES QUÍMICOS E BIOLÓGICOS EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

M. A. B. CORREIA<sup>1</sup>, V. A. S. SILVA<sup>1</sup>, T. U. L. LINS<sup>1</sup>, M. J. B. M. RÊGO<sup>1</sup>, M. C. PEREIRA<sup>1</sup>,  
C. M. SOUZA-MOTTA<sup>2</sup> e M. G. R. PITTA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêutica (LINAT), Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT)

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Laboratório de taxonomia e sistemáticas de fungos

E-mail para contato: marandrezabcorreia@yahoo.com.br

**RESUMO** – *Os surfactantes são moléculas de superfície ativa que em solução originam micelas ao atingirem a concentração micelar crítica (CMC). Devido a estas propriedades, os surfactantes são utilizados em sistemas de liberação de fármacos por sua capacidade de formar monocamadas, emulsões e dispersões. Os biosurfactantes constituem uma das principais classes de surfactantes naturais que vêm sendo intensamente estudada por conta da sua baixa toxicidade, baixa irritabilidade e compatibilidade com a pele. Uma análise comparativa entre os surfactantes químicos sarcosina laurio de sódio, polisorbato 80, Tween 80 e os biológicos ramnolipídeo e surfactina foi utilizado para avaliar a citotoxicidade utilizando o ensaio MTT. Foram testadas as concentrações de 1,5; 1,0; 0,75; 0,50; 0,25; 0,10 mM por 48 horas em meio RPMI-1640 suplementado com soro fetal bovino a 10% em PBMC. A IC50 obtida demonstrou que a citotoxicidade dos surfactantes ramnolipídeo de 0,29 foi maior que o da surfactina de 0,96 mM. Dos surfactantes químicos testados a sarcosina laurio de sódio foi de 0,48, polisorbato 80 de 1,18, e o Tween 80 de 1,44 mM. Os surfactantes biológicos ramnolipídeo, surfactina mesmo obtendo toxicidade maior que dos polissorbatos não-iônicos, possuem um potencial de aplicação em formulações farmacêuticas em sistemas de liberação de fármacos que necessitem da aplicação de surfactantes com carga.*

**Palavras chaves:** *MTT, biosurfactante, sistemas de liberação de fármacos coloidais, indústria farmacêutica.*

**ABSTRACT** – *Surfactants are surface active molecules that originate micelles in solution to reach the critical micelle concentration (CMC). Due to these properties, surfactants are used in drug delivery systems by their ability to form monolayers, emulsions and*



*dispersions. The biosurfactants are one of the major classes of natural surfactants that have been intensively studied because of their low toxicity, low irritability and skin compatibility. A comparative analysis between the chemical surfactants sodium lauroyl sarcosinate, polysorbate 80, Tween 80 and the biological surfactants Rhamnolipid and Surfactin was assayed to evaluate the cytotoxicity using MTT assay. The concentrations tested were 1.5; 1.0; 0.75; 0.50; 0.25; 0.10 mM for 48 hours in RPMI-1640 supplemented with fetal bovine serum at 10% in PBMC. The IC50 obtained showed that the rhamnolipid cytotoxicity (0,29 mM) was greater than the surfactin cytotoxicity (0.96 mM). Among the chemical surfactants tested, the IC50 values for lauroyl sodium sarcosine, polysorbate 80 and Tween 80 was 0.48 mM, 1.18, and 1.44 mM, respectively. The rhamnolipideo organic surfactants, surfactin obtained even greater toxicity of non-ionic polysorbates, have a potential application in pharmaceutical formulations for drug delivery which require the application of load with surfactant systems.*

*Keywords: MTT, biosurfactant, colloidal drug delivery systems, pharmaceutical industry.*

## 1. INTRODUÇÃO

O comportamento dos agentes tensoativos em solução depende da polaridade da molécula (aniônica, catiônica, anfotérica e não-iônicos), da tensão superficial e do comportamento das partes polares e apolares do composto em solução. Ao adicionar um tensoativo em uma mistura heterogênea do tipo água-em-óleo e agitarmos, teremos a formação de uma mistura homogênea, consideravelmente estável, denominada emulsão. Isso ocorre porque todas as superfícies (líquido-ar, líquido-sólido e líquido-líquido) começam a ser preenchidas com as moléculas do surfactante por causa das porções hidrofílicas e hidrofóbicas presentes em sua estrutura (DALTIM, 2011).

Todo surfactante tem uma quantidade mínima necessária para a formação de estruturas denominadas micelas, conhecida como CMC (Concentração Micelar Crítica). São as micelas que conseguem misturar o óleo na água, pois a porção hidrofóbica do surfactante forma uma espécie de “cápsula” que tem afinidade pelo óleo e o armazena em seu interior, separando-o da água. Esta característica dos surfactantes vem sendo utilizada não apenas para aprisionar o óleo, originando uma mistura homogênea, mas para transportar compostos apolares em seu interior (DALTIM, 2011).

Os surfactantes são amplamente utilizados como excipientes para estabilizar formulações farmacêuticas que possuem substâncias imiscíveis que precisam ser solubilizadas. A emulsão proporciona uma liberação mais lenta do fármaco em comparação com as formulações aquosas, aumentando o tempo de contato e facilitando a fagocitose pelas células (BHADORIYA *et al.* 2013). Porém, apesar dos excipientes serem classificados como inertes, os surfactantes são conhecidos pela sua toxicidade que está intimamente relacionada com o tipo de molécula e sua concentração (ARAÚJO; BORIN, 2012).

Os surfactantes biológicos produzidos por micro-organismos denominados de biossurfactantes possuem uma baixa CMC, requerendo baixas concentrações da molécula quando comparado aos tensoativos químicos e, desta forma, reduzindo a toxicidade do meio (BHADORIYA *et al.* 2013). Já

foram realizadas pesquisas utilizando biossurfactantes na transfecção de genes, recuperação de produtos intracelulares, atividade antimicrobiana, redução da viabilidade de células cancerígenas, agente emulsionante em cosméticos e em formulações de antibióticos (GHARAEI-FATHABAD, 2010).

Com o propósito de especificar o levantamento dos surfactantes utilizados nas formulações farmacêuticas, foi utilizada a classificação proposta por Garg, Rath e Goyal (2015), que traz uma extensa pesquisa sobre os Sistemas de Liberação de Fármacos Coloidais (SLFC). O SLFC consiste em uma área de pesquisas em pleno desenvolvimento, que contém uma série de fármacos disponíveis comercialmente e em pesquisa clínica, os quais utilizam surfactantes químicos para elaboração de niosomas, transferosomos, etosomos, cubosomos, microemulsões, emulsões múltiplas, liposferas, micelas e SEDDS.

Além disso, foi realizado um levantamento dos surfactantes que vêm sendo estudados com o propósito de introdução nas formulações farmacêuticas (dados não mostrados). Estas pesquisas justificam a substituição do surfactante químico, visto que, os biológicos são produzidos por processos de fermentação microbiana, e são relatados pela baixa toxicidade, baixa irritação, compatibilidade com a pele humana (ALVES, 2015), aceitabilidade ecológica e disponibilidade de substratos renováveis para produção (BANAT, 1995; CHIOMA et al., 2013; KAPADIA; YAGNIK, 2013).

Com base nestas informações uma análise comparativa entre os surfactantes químicos e os biológicos, o teste de citotoxicidade MTT foi realizado empregando dois polissorbatos 80 (não-iônicos), o polissorbato 80 e o Tween 80, sendo este último específico para meios de cultura celular, o lauroil sarcosinato de sódio (aniônico) utilizado pela indústria de cosméticos e dois biossurfactantes, a surfactina e o ramnolípido produzidos por micro-organismos.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Isolamento das células mononucleadas do sangue periférico (PBMC)

Para realização do ensaio foi coletado sangue de quatro voluntários saudáveis que receberam e assinaram o TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) aprovado pelo comitê de ética (CAAE 4472.3515.80000.5208). Após a coleta do sangue, as células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) foram separadas dos demais componentes utilizando Ficoll Paque Plus (GE HEALTHCARE) por centrifugação (velocidade 450g, 45 minutos, aceleração 4 e freio 0). Após a centrifugação, as PBMCs separadas foram lavadas duas vezes utilizando meio RPMI-1640 (com 1% de Heps e 1% antibiótico e antifúngico) por centrifugação (velocidade 350g, 20 minutos, aceleração 6, freio 4).

### 2.2. Ensaio do MTT

O ensaio de citotoxicidade MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina),

descrita inicialmente por Mosmann (1983) foi realizado para avaliar a toxicidade de surfactantes químicos e biológicos em cultura de células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) de voluntários saudáveis. Este ensaio está baseado na clivagem de um anel presente na molécula de MTT por uma enzima mitocondrial, a desidrogenase succínica, das células vivas, dando origem a cristais de Formazan, de coloração violeta insolúveis. Para que seja possível a leitura dos resultados obtidos nesse teste, o produto violeta insolúvel em água deve ser dissolvido e a intensidade de cor, medida (FERNANDES, 2011).

Os compostos testados foram o surfactante aniônico sarcosina lauril de sódio (CAS nº 137-16-6); dois polisorbatos não-iônicos (CAS nº 9005-65-6) o Tween 80 e o polisorbato 80, sendo o primeiro específico para cultura celular; e dois biossurfactantes, a surfactina anfótera (Surfactin, Sigma) produzida por *Bacillus subtilis* (MM = 1036,34; CAS nº 24730-31-2) e o ramnolipídeo (R-95Dd Rhamnolipid, Sigma) produzido por micro-organismo, com 95% de di-ramnolipídeo (MM = 649 g/mol) e 5% de mono-ramnolipídeo (MM = 487 g/mol) considerados para calcular a média ponderada (MM = 640,9 g/mol).

As PBMCs foram isoladas foram ressuspendidas utilizando o meio RPMI-1640 (com 1% de HEPES e 1% antibiótico e antifúngico) suplementado com soro fetal bovino a 10% e contadas em câmara de Neubauer com o corante azul de Tripán. Em seguida foram distribuídas, em triplicata, em placas de 96 poços na concentração de  $10^5$  células por poço e adicionadas as concentrações dos surfactantes 1,5; 1,0; 0,75; 0,50; 0,25; 0,10 mM diluídos em meio suplementado em 150  $\mu$ L. Para o branco foram utilizados três poços de meio suplementado e os surfactantes adicionados nas mesmas condições da placa de célula. Todas as placas foram incubadas por 48 horas em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, foram adicionados 20  $\mu$ L de MTT (5 mg/mL) incubada por 3 horas e mantidas as condições de incubação.

Posteriormente, foi adicionado SDS a 20% para a diluição dos cristais de Formazan e aguardadas 24 horas para a realização da leitura em um leitor de microplacas (Biotek EL808) a 570 nm. 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

A partir dos resultados obtidos no teste de citotoxicidade nas concentrações de 1,5; 1,0; 0,75; 0,50; 0,25; 0,10 mM por 48 horas foi possível observar que os biossurfactantes ramnolipídeo e a surfactina demonstraram uma maior citotoxicidade em relação aos polisorbatos não-iônicos e valores aproximados ao surfactante aniônico sarcosina lauril de sódio demonstrado na tabela 1.

**Tabela 3-** Toxicidade dos biossurfactantes e dos surfactantes químicos às células mononucleadas do sangue periférico (PBMC)

Natureza do surfactante	Surfactante	IC50 (mM)
Biológico	Ramnolípídeo	0,29
Biológico (anfótero)	Surfactina	0,96
Químico (aniônico)	Sarcosina lauril de sódio	0,48
Químico (não-iônico)	Polisorbato 80	1,18
Químico (não-iônico)	Tween 80	1,44

Os polisorbatos utilizados, por serem não-iônicos, apresentaram menor toxicidade (1,5 mM), em relação aos demais, já o surfactante sarcosina lauril de sódio (aniônico) apresentou toxicidade de 0,50 mM similar ao ramnolípídeo que possui carga e a surfactina de 1,00mM, sendo esta última anfotérica, e desta forma, com carga dependente do pH. O ramnolípídeo constituído de 95% de di-ramnolípídeo utilizado neste trabalho apresentou IC50 de 37,12 mg/L e a surfactina de 198,9 mg/L. Dos surfactantes químicos testados a sarcosina lauril de sódio apresentou IC50 de 28,13 mg/L, polisorbato 80 de 305,5 mg/L e o Tween 80 de 377 mg/L.

O ramnolípídeo demonstrou uma citotoxicidade maior (0,50 mM), com a metade da concentração, em relação a surfactina (1,0 mM) como demonstrado na figura 1. Dos três surfactantes químicos testados, a sarcosina lauril de sódio exibiu citotoxicidade na concentração de 0,50 mM e os dois surfactantes polisorbatos classificados como não-iônicos apresentaram toxicidade na concentração de 1,5 mM, conforme demonstrado na figura 2.

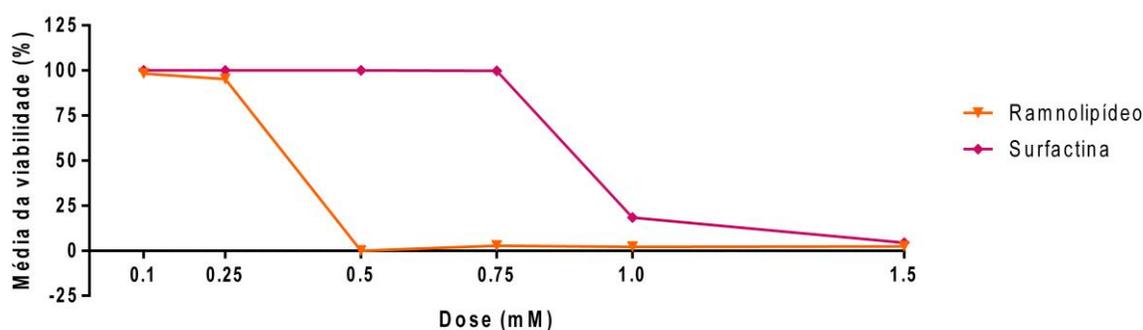


Figura 1- Efeito dos biossurfactantes ramnolípídeo e surfactina sobre a viabilidade celular. Os resultados são expressos como a porcentagem da média da viabilidade versus doses testadas

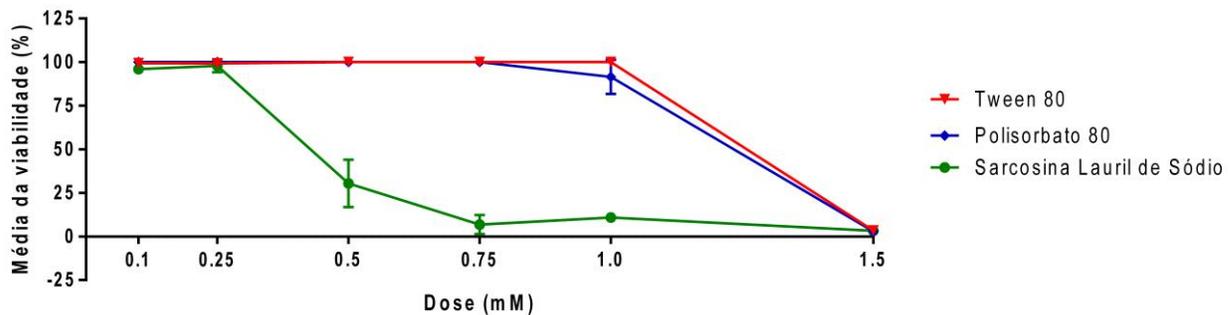


Figura 2- Efeito dos surfactantes químicos sarcosina lauril de sódio, Tween 80 e polisorbato 80 sobre a viabilidade celular. Os resultados são expressos como a porcentagem da média da viabilidade versus doses testadas

#### 4. DISCUSSÃO

Vários trabalhos realizam bioensaios utilizando surfactantes químicos e biológicos com o objetivo de avaliar a toxicidade em processos que envolvem o meio ambiente (FÉRARD; BLAISE, 2013), porém ensaios utilizando biosurfactantes e a metodologia do MTT consistem em uma nova abordagem que vem sendo aplicada para avaliar o potencial citotóxico em células normais e linhagens cancerígenas (NOZHAT; ASADI; ZAHRI, 2012; JIANG et al., 2012).

A inibição e proliferação de células normais e cancerígenas variando as concentrações de soro fetal bovino (FBS) foram estudadas em linhagens cancerígenas de HepG2, Caco-2, HeLa, MCF-7 e normais de HK-2 e hepatócitos. Foram utilizados os surfactantes biológicos mono-ramnolipídeo e di-ramnolipídeo e os químicos, Tween-80, Dodecil sulfato de sódio (SDS) e Sulfonato de alquilbenzeno (SDBS). Neste estudo, foi possível notar que tanto as células cancerígenas quanto as células normais exibiram sensibilidades semelhantes na adição de ramnolipídeos no meio de cultura e a citotoxicidade foi largamente atenuado pela presença de soro fetal de bovino (FBS) em meio de cultura. Com a concentração de 10% de FBS a IC10 foi calculada obtendo a viabilidade celular de 90% em 100 mg/L mono-ramnolipídeo; 150 mg/L di-ramnolipídeo; >500 mg/L Tween; 60,9 mg/L SDS e 84,9 mg/L SDBS (JIANG et al., 2012).

Um estudo comparativo entre surfactantes sintéticos e biológicos utilizando como organismo teste estipes bacterianas, Ivshina e colaboradores (1998) obtiveram CE50 de 650 mg/L para o biosurfactante glicolipídeo produzido por *Rhodococcus ruber*, 1000 mg/L do ramnolipídeo produzido por *Pseudomonas aeruginosa* e de 7 mg/L para o surfactante Finasol OSR-5® e 5 mg/L para o surfactante Coretix 9597®.

Ensaios utilizando a metodologia MTT também vêm sendo aplicados para testar a citotoxicidade de novos compostos como, por exemplo, na síntese de novos surfactantes e em



sistemas de liberação de fármacos que utilizam surfactantes químicos comumente aplicados pelas indústrias farmacêuticas. Na síntese de quatro surfactantes com o propósito de solubilização de drogas foi realizada em células endoteliais de veia umbilical (RUVEC) no ensaio de MTT. Os surfactantes sintetizados denominados de C19:0-NTA, C20:4-NTA, C25:0-NTA, C25:4-NTA apresentaram uma IC50 de 0,02 mg/mL; 0,32 mg/mL; NA; 0,04 mg/mL respectivamente e de 0,25 mg/mL para o polisorbato 80 utilizado como controle (MÉNARD et al., 2012).

## 5. CONCLUSÃO

A toxicidade dos polisorbatos, polisorbato 80 e do Tween 80, não-iônicos justifica sua aplicação em formulações farmacêuticas que necessitam de surfactantes não-iônicos. Os valores obtidos do ramnolípido, surfactina e da sarcosina laurio de sódio por apresentarem cargas e terem sido testados em concentrações relativamente altas, mesmo obtendo toxicidade maior que dos polisorbatos não-iônicos, possuem um potencial de aplicação em formulações farmacêuticas em sistemas de liberação de fármacos que necessitem da aplicação de surfactantes com carga.

## 6. REFERÊNCIAS

- ALVES, N. C. Penetração de ativos na pele: revisão bibliográfica. *Revista Amazônia Science & Health*. p. 1-8, 2015.
- ARAÚJO, A. A. F.; BORIN, M. F. Influência de excipientes farmacêuticos em reações adversas a medicamentos. *Brasília Med: artigo de revisão*. v. 49, p.267-278, 2012.
- BANAT, I.M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. *Bioresource Technology*, v.51, p.1-12, 1995.
- BHADORIYA, S.S.; MADORIYA, N.; SHUKLA, K.; PARIHAR, M. S. Biosurfactants: A New Pharmaceutical Additive for Solubility Enhancement and Pharmaceutical Development. *Biochemistry pharmacology*. v. 2, p. 1-5, 2013.
- CHIOMA, O.; OGECHUKWU, M.; BRIGHT, O.; SIMON, O.; CHINYERE, A. Isolation and characterization of biosurfactants producing bacteria from oil polluted soil. *Journal of Natural Sciences Research*, v.3, n.5, 2013.
- DALTIN, D. *Tensoativos: química, propriedades e aplicações*. In: DALTIN, D. Introdução e primeiros conceitos. Ed 1. São Paulo: Blucher, 2011. p. 1-43.
- FERNANDES, T. C. C. Investigação dos efeitos tóxicos do biosurfactante ramnolípido e suas implicações quando usado na biorremediação de águas contaminadas por petróleo. 2011. 188 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, São Paulo, 2011.



FÉRARD, J. F.; BLAISE, C. Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology. *Springer Science*: Metz, France, 2013.

GANRG, T.; RATH, G.; GOYAL, A.K. Colloidal Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. v. 32, p. 89-147, 2015.

GHARAEI-FATHABAD, E. Biosurfactants in pharmaceutical industry: a mini-review. *American Journal of Drug Discovery and Development*. p. 1-11, 2010.

IVSHINA, I.B.; KUYUKINA, M.S.; PHILP, J.C.; CHRISTO, N. Oil desorption from mineral and organic materials using biosurfactant complexes produced by *Rhodococcus* species. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. v. 14, p. 711-717, 1998.

JIANG, L.; LONG, X. MENG, Q. Rhamnolipids enhance epithelial permeability in Caco-2 monolayers. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 446, p. 130-135, 2013.

KAPADIA, S. G.; YAGNIK, B. N. Current Trend and Potential for Microbial Biosurfactants. *Asian J. Exp. Biol. Sci*, v. 4, p.1-8, 2013.

NOZHAT, Z.; ASADI, A.; ZAHRI, S. Properties of Surfactin C-15 Nanopeptide and Its Cytotoxic Effect on Human Cervix Cancer (HeLa) Cell Line. *Journal of Nanomaterials*. v. 2012 , p.1-5, 2012.

MÉNARD, N.; TSAPIS, N.; POIRIER, C. ARNAULD, T.; MOINE, L.; LEFOULON, F.; PÉAN, J. M.; FATTAL, E. Drug solubilization and in vitro toxicity evaluation of lipoamino acid surfactants. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 423, p. 313-320, 2012.

## 7. AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT) e a empresa Novartis.



ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOENSAIOS – B 6

## AVALIAÇÃO PROTEÔMICA DO MECANISMO DE AÇÃO DO NOVO DERIVADO OXAZOLIDINICO LPSF-NB-3 EM LINHAGEM DE LEUCEMIA AGUDA

L.V.N. CARVALHO<sup>1</sup>, J. CAMPOS<sup>1</sup>, L. PIZZATTI<sup>2</sup>, E. ABDELHAY<sup>2</sup>, M. CRISTINNY<sup>1</sup>, M.C.A. LIMA<sup>3</sup>, M.G.R. PITTA, I.R. PITTA<sup>1</sup>, M.J.B.M. RÊGO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Imunodulação e Novas Abordagens Terapêuticas –LINAT, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.

<sup>2</sup>Laboratório de Células Tronco, Instituto Nacional do Câncer, INCA, Rio de Janeiro, RJ.

<sup>3</sup> Laboratório de Química e Inovação Terapêutica – LQIT, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.

E-mail para contato: lidiane.v.n.carvalho@gmail.com

*RESUMO – Leucemias são um grupo heterogêneo de neoplasias hematológicas que tem como primeira linha de tratamento a quimioterapia. Sabe-se, porém, que os agentes quimioterápicos não agem exclusivamente em células tumorais, podendo levar a diferentes graus de toxicidade e inúmeros efeitos adversos. Nesse sentido, a presente proposta buscou a elucidação do mecanismo de ação de um novo agente antineoplásico por meio de análise proteômica na linhagem leucêmica, HL60. No estudo foi utilizado um derivado oxazolidinico, LPSF/NB-3, com atividade antileucêmica in vitro comprovada anteriormente pelo grupo. LPSF/NB-3 é 5,6 vezes mais seletivo para linhagem leucêmica quando comparada as células normais indicando-o como um agente antitumoral promissor. A avaliação do mecanismo de ação feita por proteômica gel free e label free utilizando cromatografia bidimensional acoplada à espectrometria de massas, identificou um total de 1805 proteínas moduladas. Em nossa análise somente foram consideradas proteínas identificadas em todas as réplicas experimentais bem como proteínas moduladas acima de 2 vezes. Com isso, após utilizado este filtro, 407 proteínas estavam expressas diferencialmente, 130 com o aumento da expressão e 278 com diminuição da expressão. As principais vias moduladas pelo tratamento estavam relacionadas à regulação do citoesqueleto, processo indispensável na replicação celular. Diversas proteínas foram moduladas negativamente, com atenção especial a proteína RhoA, indicando assim um possível mecanismo de ação e provável alvo do novo derivado.*

*Palavras chaves: Oxazolidinas; Prospecção molecular, HL60; proteômica label free.*



**ABSTRACT** – *Leukemia are a heterogeneous group of hematologic malignancies in which chemotherapy is the first treatment option. However, chemotherapeutic drugs do not act exclusively on tumor cells, and they can lead to different degrees of toxicity and several side effects. Thus, this proposal aimed to elucidate the mechanism of action of a novel chemotherapeutic drug by proteomic analysis in HL60 leukemia cell line. In this study was used an oxazolidine derivative, LPSF/NB-3, with antileukemia activity previously proved by our group. LPSF/NB-3 is 5.6 times more selective in leukemia cells when compared to normal cells, indicating a promising tumor agent. The evaluation of the mechanism of action, performed by gel free and label free proteomics using two-dimensional chromatography coupled to mass spectrometry, identified 1805 modulated proteins. In our analysis were only considered proteins found in all experimental replicates and proteins modulated more than 2 times. Therefore, after using this filter, 407 proteins were differentially expressed, in which 130 have their expression increased and 278 showed reduced expression. The main pathways modulated by LPSF-NB-3 treatment were related to cytoskeleton regulation, essential process to cell replication. Several proteins were downregulated, including RhoA protein, indicating a possible mechanism of action and a likely target of this novel derivative.*

*Keywords: Oxazolidines; molecular prospecting; HL60; proteomic label free.*

## 1. INTRODUÇÃO

A leucemia aguda é caracterizada pelo acúmulo de células imaturas na medula óssea e sangue periférico com consequente redução da produção de elementos hematopoiéticos maduros e saudáveis no corpo (Bodet-Milin *et al.*, 2016). A principal estratégia de tratamento empregada envolve quimioterapia, que combina vários agentes antineoplásicos que variam de acordo com o tipo e grau da doença. No entanto, mielossupressão profunda, má resposta terapêutica e desenvolvimento de resistência às drogas utilizadas são impedimentos comuns às estratégias atuais de tratamento (Narasimhan *et al.*, 2015). Não raramente, pacientes leucêmicos desenvolvem resistência ao tratamento muitas vezes associada com má resposta ao tratamento e menor taxa de sobrevivência global (Bartholomae *et al.*, 2016). Assim, é essencial a pesquisa de novos agentes antineoplásicos que possam ser utilizados em associação na prática clínica. Com esse objetivo, ferramentas proteômicas tem desempenhado um papel particularmente importante na melhoria da nossa compreensão acerca das vias celulares que são ativadas e inibidas por essas novas moléculas candidatas a fármacos anticâncer. Ela viabiliza a identificação de novas moléculas bioativas ao desenvolvimento de novos medicamentos e permite a identificação e caracterização de marcadores biológicos (Raimondo *et al.*, 2011).

Nesse contexto, destacam-se as oxazolidinas que são uma classe de azóis, formadas por um anel heterocíclico de cinco membros. A atividade antineoplásica dos derivados de oxazolidinas tem sido relatada na literatura em várias linhas de células de tumor *in vitro*, incluindo A2058 (melanoma), MCF-7 (adenocarcinoma da mama), HT-29 (carcinoma do cólon) e DU145 (câncer de próstata) (Tadesse *et al* 2011; Annavareddi *et al* 2014; Mumyatova *et al* 2016). Singh *et al.* (2011) relataram atividade citotóxica de novas oxazolidinas em linhagem celular de HL-60 (leucemia promielocítica), a morte celular ocorreu por apoptose, correlacionando-os com a fragmentação do DNA. Em um estudo



anterior realizado pelo nosso grupo, cinco derivados novos oxazolidínicos foram sintetizados e tiveram sua atividade antineoplásica avaliada contra várias linhagens celulares, incluindo HL-60 (Campos, 2013). A análise do mecanismo de ação é essencial para o conhecimento acerca das vias celulares que são ativadas e/ou inibidas por novas moléculas candidatas a fármacos anticâncer, pois elas podem ser inseridas em um determinado esquema terapêutico baseado em seu mecanismo de ação. Nesse sentido, o derivado LPSF-NB-3 foi selecionado para a elucidação de seu mecanismo de ação por análise proteômica.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

**2.1 Novas moléculas antineoplásicas** - O derivado oxazolidínico LPSF-NB-3 utilizado nesse estudo, foi sintetizado, caracterizado e cedido pelo Laboratório de Química e Inovação Terapêutica – LQIT do Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT-SG), Universidade Federal de Pernambuco.

**2.2 Linhagem e cultivo celular** - A linhagem de estudo, HL60, obtida da *American Type Cell Culture* (ATCC, USA), é uma linhagem de leucemia promielocítica humana. As células foram mantidas a 37°C contendo 5% de CO<sub>2</sub> em meio RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino. A troca de meio foi realizada sempre que necessário para manter a viabilidade das células.

**2.3 Extração proteica e digestão triptica** - Os extratos proteicos das células tratadas com o valor de IC<sub>50</sub> do derivado oxazolidínico LPSF-NB-3 foram obtidos a partir da homogeneização com 200 µL de tampão de lise frio contendo 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, 50 mM NaF, 20 mM KCl, and 250 mM NaCl suplementado com 1 µL de coquetel inibidor de protease (GE Healthcare, Life Sciences, Piscataway, NJ) e inibidor de fosfatase. Depois de 1 hora a 4 °C, a suspensão foi congelada e descongelada duas vezes em nitrogênio líquido. Os extratos totais foram centrifugados a 12000g durante 30 min, e os sobrenadantes foram recolhidos para armazenamento a -80°C. Após quantificação de proteína por Bradford, as amostras foram concentradas 39× e tiveram o tampão trocado por bicarbonato de amônio usando um dispositivo de ultrafiltração de 3kDa (Millipore, Billerica, MA). No total, 200 µg de proteína foi desnaturada (0,1% RapiGest SF a 60 ° C durante 15 min) (Waters, Milford, MA), reduzida com DTT 10 mM a 60 ° C durante 30 min, alquiladas com iodoacetamida 10 mM durante 30 min temperatura ambiente no escuro, e digerido enzimaticamente com tripsina a uma proporção de 1:50 enzima/ proteína (Promega, Madison, WI). A digestão foi parada pela adição de 10 µL de 5% de TFA. Álcool desidrogenase de levedura foi utilizado como um padrão interno para quantificação absoluta. (ADH; P00330, Waters) e adicionada a uma concentração final de 10 fmol/µL.

**2.4 Quantificação proteica label-free por espectrometria de massas** - Os experimentos qualitativos e quantitativos nano UPLC ESI (Ultra Performance Liquid Chromatography Electrospray ionization) foram conduzidos com um sistema ACQUITY UPLC (Waters), com ligeiras modificações. Para assegurar a reprodutibilidade e a robustez metodológica, as amostras foram analisadas em triplicata. Para a primeira dimensão, foi usada uma coluna de troca catiônica forte (SCX) (Waters) com enchimento de um 5 µm *polySulfoethyl aspartamida* (PolyLC, Columbia, MD). As amostras foram eluídas em nove frações a partir da coluna SCX utilizando um gradiente de sal (2 µL de sal tampões contendo 50, 100, 150, e 200 de formiato de amônio mM (NH<sub>4</sub>FA) com 5% de ACN, seguido por um gradiente de fase inversa (RP). Os peptídeos libertados foram capturados por uma coluna RP de armadilha (180 µm x 20 mm, 5 µm Simetria C18, Waters). Depois de todos os peptídeos terem sido



capturados, a coluna armadilha foi colocada em linha com uma outra coluna analítica RP (100  $\mu\text{m}$  x 100 mm, 1,8  $\mu\text{m}$  C18, nano ACQUITY UPLC HSS T3, Waters) e RP em um gradiente de 5-40% de ACN (contendo 0,1% de ácido fórmico v / v) em 58 min foi usado para a segunda dimensão com uma taxa de fluxo de 600 nL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>. Todas as análises foram realizadas utilizando ionização do tipo nano eletro spray em modo de íons positivo nanoESI (+) e uma fonte de ionização NanoLockSpray™ (Waters). O espectrômetro de massa foi calibrado com uma solução de peptídeo *Glu-1*-fibrinopeptídeo B (*Glu-Fib*) (Sigma-Aldrich) (100 fmol  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>) entregue através do pulverizador de referência da fonte NanoLockSpray. A aceleração ortogonal do tempo de voo (OA-TOF) MSE foi adquirida a partir de m/z 50 até 2000. O perfil de MS foi ajustado para garantir que os dados de LC-MS de baixa energia fosse efetivamente adquiridos a partir de m/z 400-2000.

**2.5 Pesquisa de banco de dados** - Identificação das proteínas foi gerada por algoritmos adequados e pesquisado contra um banco de dados específico humano. As bases de dados utilizadas foram randomizadas "on-the fly" durante as consultas de banco de dados e anexados ao banco de dados original para acessar a taxa de falso-positivo de identificação. Os valores foram considerados FDR (*false discovery rate*), até 1%. As condições adequadas de processamento e procurando banco de dados espectrais, foi utilizado um v.2.5.2 ProteinLynxGlobalServer (PLGs) com a informática ExpressionE v.2.5.2. UniProtKB (liberar 2013\_11). Apenas as proteínas identificadas presentes em todas as repetições de cada condição, obtido no passo de análise IdentityE PLGs foram consideradas para análise de expressão utilizando ferramenta ExpressionE. As proteínas obtidas foram organizadas pelo algoritmo ferramenta PLGs ExpressionE em uma lista estatisticamente significativa correspondente ao aumento e diminuição da regulação entre os diferentes grupos em comparação com amostras de controle. Um procedimento de filtragem adicional foi realizado para selecionar apenas as proteínas que apresentaram níveis de expressão diferenciais estatísticas com p valor inferior a 0,05. As interações entre as proteínas foram analisadas usando o software GeneGo MetaCore (GeneGo, Encinitas, CA).

### 3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

#### 3.1 Seletividade

O derivado oxazolidinico utilizado, teve sua citotoxicidade avaliada em um estudo anterior desenvolvido pelo grupo (Campos, 2013). LPSF/NB-3 não apresentou toxicidade em células saudáveis (PBMC) na maior dose testada, 100  $\mu\text{M}$ . Em contrapartida, a atividade citotóxica na linhagem leucêmica de estudo foi bastante pronunciada com valor de IC<sub>50</sub> de 17,84  $\mu\text{M}$ . A partir dos valores de IC<sub>50</sub> obtidos nos ensaios de seletividade e citotoxicidade foi possível avaliar aqui seu potencial com agente quimioterápico promissor. Essa avaliação foi feita por meio da análise do índice de seletividade (IS) que indica a seletividade de um composto entre uma linhagem normal e uma neoplásica, e reflete seu potencial em testes clínicos. Esse índice corresponde à razão entre IC<sub>50</sub> de cada composto em uma linhagem de células normais e em uma linhagem neoplásica, (IS= IC<sub>50</sub> células normais/IC<sub>50</sub> células neoplásicas) (Ramesh *et al.*, 2009). O resultado dessa divisão indica quantas vezes esse composto é mais ativo na linhagem tumoral que na linhagem normal. O derivado LPSF-NB3 apresentou IS de 5.6, indicando bom potencial antineoplásico (Bézivin *et al.*, 2003).

O estudo anterior conduzido por Campos (2013) revelou que células de HL60 tratadas com o composto LPSF/NB-3 tiveram indução da expressão de genes relacionados à necrose. A indução da necrose programada através desses genes é uma estratégia antitumoral que deve ser considerada, já que

não raro, muitos tipos de câncer apresentam resistência à apoptose, que é o mecanismo de ação da grande maioria de quimioterápicos. Até o momento, não há evidências claras que indiquem se a necrose é benéfica ou prejudicial no câncer (Moriwaki & Chan, 2013).

### 3.2 Avaliação do mecanismo de ação

Dentre as proteínas identificadas, 1.805 proteínas totais (nas duas amostras) apresentaram valor de FDR (*false discovery rate*), abaixo de 4% e por esta razão foram consideradas pelo programa de análise PLGS (Waters) para a posterior análise de expressão. Além disso, em nossa análise somente foram consideradas proteínas identificadas em todas as réplicas experimentais de cada amostra. As principais vantagens de utilizar análise proteômica *label-free* acoplada a espectrometria de massas estão na estabilidade do sistema LC-MS, bem como na precisão e velocidade de aquisição que garantem a maior reprodutibilidade e repetibilidade dos dados (Muller *et al.*, 2016; Navarro *et al.*, 2016). Com isso, após utilizarmos este filtro, 565 proteínas, de fato, foram analisadas com a ferramenta Expression<sup>E</sup> (Waters). O diagrama de Venn criado permite uma melhor visualização destas proteínas moduladas, bem como a sua presença em cada amostra (Figura 1a).

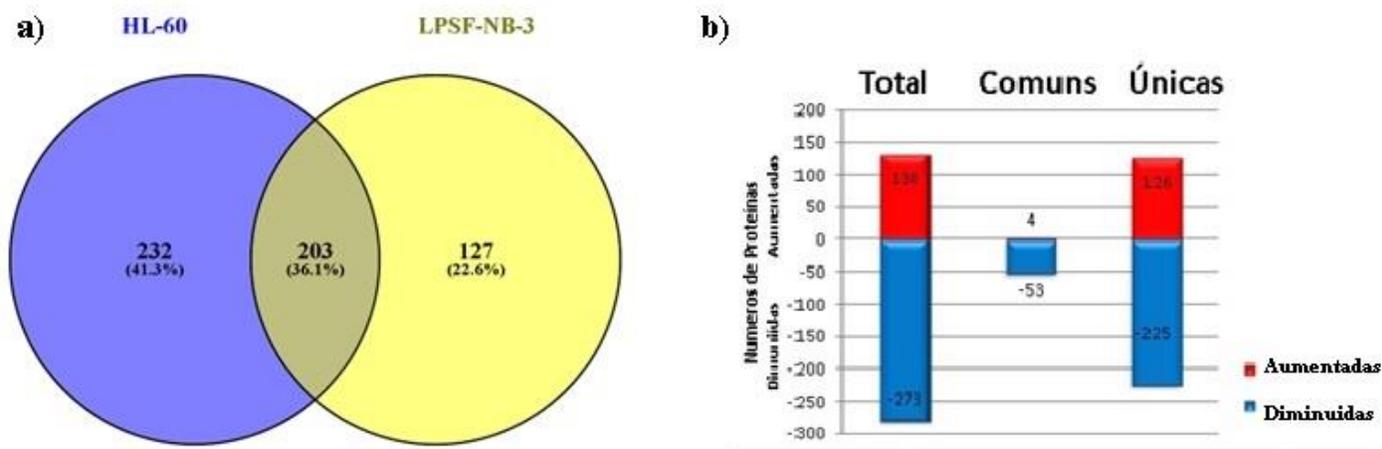


Figura 1. Distribuição de proteínas entre a amostra de controle (HL60) e tratada (LPSF/NB-3). A) diagrama de Venn representando as 565 proteínas moduladas com os valores respectivos de presença em cada amostra. B) Das 407 proteínas diferencialmente expressas de acordo com os critérios estabelecidos, 130 foram moduladas positivamente (região vermelha), enquanto 278 foram diminuídas com o tratamento (região azul).

Dentro do grupo de proteínas consideradas para análise quantitativa com os critérios estabelecidos (modulação de no mínimo 2 vezes), 407 estavam expressos diferencialmente, 130 com o aumento da expressão e 278 com diminuição da expressão em relação ao controle (Figura 1b). A aplicação de ponto de corte é importante, pois garante maior fidedignidade a técnica (Panis *et al.*, 2014). As principais funções e vias de sinalização alteradas com o tratamento LPSF-NB-3 pôde ser identificada nas 407 proteínas analisadas no programa MetaCore GO. Entre os principais processos biológicos diferencialmente expressos, destacam-se os processos que envolvem desenvolvimento e

regulação do citoesqueleto e adesão celular. Na tabela abaixo estão listados os processos estatisticamente mais relevantes usando Análise MetaCore.

A análise *in silico* revelou várias vias que o tratamento com LPSF-NB-3 foi capaz de modular, dentre essas, destacamos a via de remodelação do citoesqueleto denominada “*Cytoskeleton remodeling\_Hyaluronic acid\_CD44 signaling pathways*” na qual houve menor expressão da proteína RhoA (Figura 3).

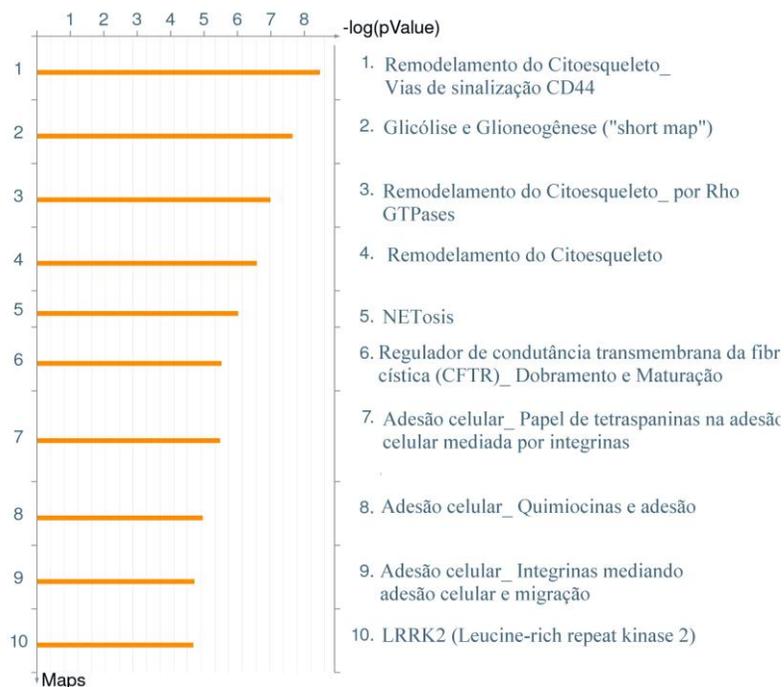


Figura 2. Os processos biológicos estatisticamente mais relevantes usando a Análise MetaCore.

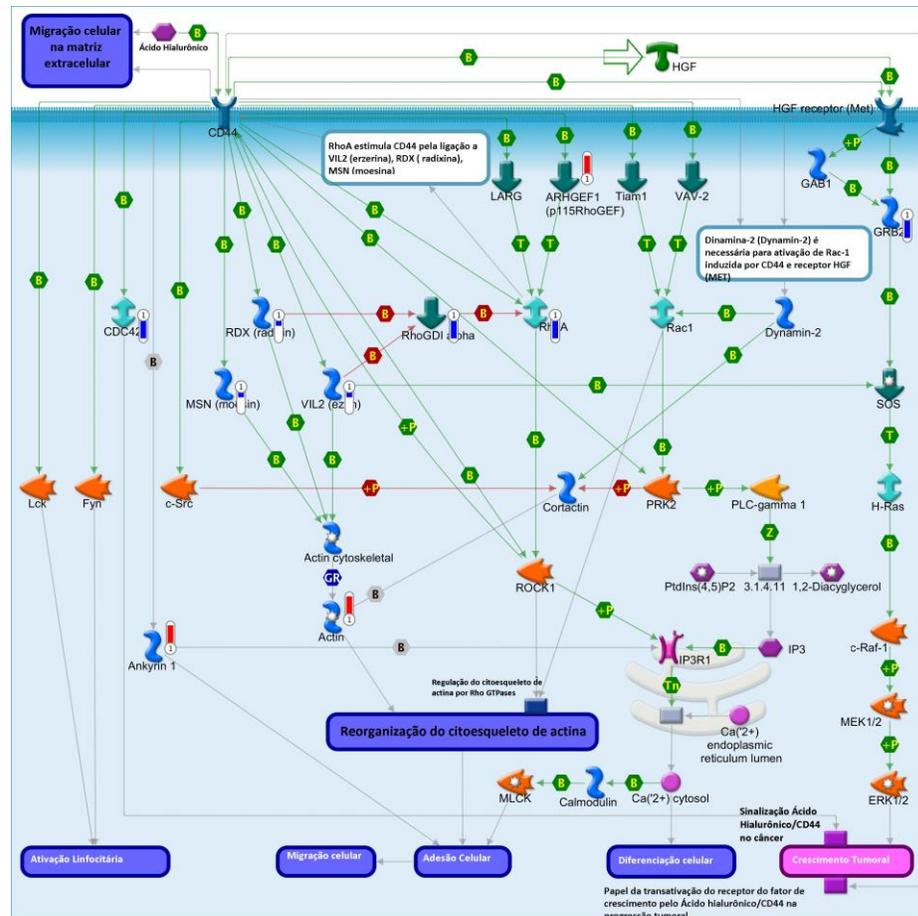
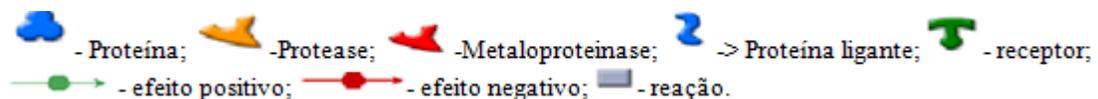


Figura 3. Via “Cytoskeleton remodeling\_Hyaluronic acid\_CD44 signaling pathways”, modificada de Metacore. Legenda para os símbolos:



RhoA é uma proteína pertencente a grande família de proteínas relacionadas conhecida como a superfamília Ras, envolvidas na regulação e momento da divisão celular. RhoA é uma das mais antigas Rho GTPases, promove a reorganização do citoesqueleto de actina e regula a forma da célula e motilidade. A superexpressão dessa proteína está associada à proliferação de células tumorais e metástases (Wu *et al* 2004). RhoA especificamente é considerada como um fator de regulação de destaque em outras funções, tais como a regulação da dinâmica do citoesqueleto, transcrição, progressão do ciclo celular e transformação celular (Li *et al* 2014). Em um estudo conduzido por Molli e colaboradores (2012) foi possível observar diferenças na expressão, organização ou estimulação de três tipos de GTPases em leucócitos de pacientes com leucemia mielóide crônica. De acordo com o estudo, o tratamento com inibidores da via de Rho/ROCK resultou numa diminuição dos níveis de



expressão dessa proteína na linhagem leucêmica com consequente inibição de crescimento específico das células leucêmicas (Molli *et al* 2012). RhoA é uma proteína responsável por defeitos funcionais-chaves em diversos tipos de câncer, incluindo leucemias e, portanto, pode ser utilizada como um alvo terapêutico promissor.

#### 4. CONCLUSÃO

Com os resultados até então encontrados observamos que o derivado oxazolidinônico, LPSF/NB-3 apresentou-se como candidato antineoplásico promissor. A análise proteômica fornece dados que indicam que ele é capaz de atuar em vias envolvidas na manutenção do citoesqueleto, em especial na menor expressão da proteína RhoA. Assim, é vital que os estudos de validação sejam conduzidos para que o LPSF-NB-3 possa ser usado em novas terapias eficazes para o tratamento de células leucêmicas.

#### 5. REFERÊNCIAS

- ANNAVAREDDI, NA.; MADDIMSETTI VENKATESWARA, RA.; SUDHA, SK.; RAMESH, U.; BATCHU, VR. Oxazolidinone derivatives: CytozoneeLinezolid hybrids induces apoptosis and senescence in DU145 prostate cancer cells, *Eur J Med Chem.* 80 295-307, 2014.
- BARTHOLOMAE S.; GRUHN, B.; DEBATIN, K-M.; ZIMMERMANN, M.; CREUTZIG, U.; REINHARDT, D.; STEINBACH, D. Coexpression of Multiple ABC-Transporters is Strongly Associated with Treatment Response in Childhood Acute Myeloid Leukemia. *Pediatr Blood Cancer*, 63 242-247. 2016.
- BÉZIVIN, C.; TOMASI, S.; LOHÉZIC-LE DÉVÉHAT, F.; BOUSTIE J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine.* ;10(6-7):499-503, 2003.
- BODET-MILIN, C.; KRAEBER-BODÉRE, F.; EUGÈNE, T.; GUÉRARD, F.; GASCHET, J.; BAILLY, C.; MOUGIN, M.; BOURGEOIS, M.; FAIVRE-CHAUVET, A.; CHÉREL, M.;
- CHEVALLIER, P. Radioimmunotherapy for treatment of acute leukemia, *Semin Nucl Med*, 46 135-146, 2016.
- CAMPOS, JULIA FURTADO. **Síntese e atividade anticâncer de novos derivados 2-tioxo-oxazolidínicos.** Universidade Federal de Pernambuco, 2013. Tese de Doutorado, Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica, Recife 2013.
- LI, G.; LIU, L., SHAN, C.; CHENG, Q.; BUDHRAJA, A.; ZHOU, T.; CUI, H.; GAO, N. RhoA/ROCK/PTEN signaling is involved in AT-101-mediated apoptosis in human leukemia cells in vitro and in vivo. *Cell Death Dis.* 2014.
- MOLLI, PR.; PRADHAN, MB.; ADVANI, SH.; NAIK, NR. RhoA: a therapeutic target for chronic myeloid leukemia. *Mol Cancer.* 2012.
- MORIWAKI, K.; CHAN, F. K. RIP3: a molecular switch for necrosis and inflammation. *Genes Dev.* 27(15):1640-9. 2013.
- MULLER, L., FORNECKER, L.; DORSSELAER, A.; CIANFÉRANI, S.; CARAPITO, C. Benchmarking sample preparation/digestion protocols reveals tube-gel being a fast and repeatable method for quantitative proteomics. *Proteomics.* 2016.
- MUMYATOVA, VA.; BALAKINA, AA.; FILATOVA, NV.; SEN, VD.; KOREPIN, AG.; TERENCEV, AA. Effect of Cytotoxic Compounds on Activity of Antioxidant Enzyme System in MCF-7 and H1299 Cells, *Bull Exp Biol Med.* 161 179-83, 2016.
- NARASIMHAN K.; LEE, YM.; LIM, TK. Genistein exerts anti-leukemic effects on genetically different acute myeloid leukemia cell lines by inhibiting protein synthesis and cell proliferation while inducing apoptosis – molecular insights from an iTRAQ™ quantitative proteomics study, *Oncoscience.*, 2 111-124, 2015.
- NAVARRO, P.; KUHAREV, J.; GILLET, LC.; BERNHARDT, OM.; MACLEAN, B.; RÖST, HL., TATE, SA., TSOU, CC.; REITER, L.; DISTLER, U.; ROSENBERGER, G.; PEREZ-RIVEROL, Y.; NESVIZHSHKII, AI.; AEBERSOLD, R.; TENZER, S. A multicenter study benchmarks software tools for label-free proteome quantification. *Nat Biotechnol.*, 2016.
- RAIMONDO, F., MOROSI, L., CHINELLO, C., MAGNI, F., PITTO, M., Advances in membranous vesicle and exosome proteomics improving biological understanding and biomarker discovery. *Proteomics.* 11, 709–720, 2011.



RAMESH BB.; SELINA, FDR.; JOSEPH, P., COOPERWOOD, JS.; LATINWO, LM.; GOODMAN, C B. Selective Cytotoxic Activities of Two Novel Synthetic Drugs on Human Breast Carcinoma MCF-7 Cells. *Anticancer Res.* 29(8): 2993–2996. 2009.

SINGH, A.; HA, HJ.; PARK, J.; KIM, JH.; LEE, WK. 3,4-Disubstituted oxazolidin-2-ones as constrained ceramide analogs with anticancer activities. *Bioorg Med Chem.* 19 6174-81,2011.

TADESSE, M; SVENSON, J; JASPARS, M; STROM, MB; ABDELHAMAN, MH; ANDERSEN, JH; E HANSEN, P E KRISTIANSEN, K STENSVAG, T HAUG, Synoxazolidinone C; a bicyclic member of the synoxazolidinone family with antibacterial and anticancer activities. *Tetrahedron Letters.* 52 1804–1806. 2011.

WU, K.; BOTTAZZI, ME.; DE LA FUENTE, C.; DENG, L.; GITLIN, SD.; MADDUKURI, A.; DADGAR, S.; LI, H.; VERTES, A.; PUMFERY, A.; KASHANCHI, F. Protein profile of tax-associated complexes. *J Biol Chem*, 2004.

## 6. AGRADECIMENTOS

Instituto Nacional Ciência e Tecnologia - INCT\_IF, Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco – Facepe e ao Laboratório de Células Tronco do Instituto Nacional do Câncer, pela ajuda na execução do trabalho.



ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOENSAIOS - B 8

## **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DO MIGLUSTATO ZAVESCA® SOBRE INTERFERON-GAMA E INTERLEUCINA-6: UM POSSÍVEL MECANISMO PARA UM FUTURO REPOSICIONAMENTO?**

L. G. S. SANTOS<sup>1</sup>, M. F. CORDEIRO<sup>1</sup>, F. G. BESERRA<sup>1</sup>, L. C. TORRES<sup>2</sup>, M. G. R. PITTA<sup>1</sup>, M. J. B. M. RÊGO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas.

<sup>2</sup> Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), Laboratório de Pesquisa Translacional.

E-mail para contato: lucasbiomedico@live.com

**RESUMO** – *O reposicionamento de fármacos representa uma estratégia inovadora para o tratamento de várias doenças, incluindo as desordens inflamatórias. Algumas moléculas presentes na membrana celular como os glicosfingolipídios possuem importante função na instalação e progressão destas doenças. Fármacos inibidores de glicosilação como o Zavesca® Miglustato, atua inibindo a glicosilceramida sintase, enzima que é o primeiro passo na síntese dos glicolipídios. Desta forma, o Miglustato que já é empregado na prática clínica para tratamento da doença de Gaucher possivelmente pode ser uma alternativa estratégica no combate às doenças inflamatórias. Para avaliação da atividade imunomoduladora, foi realizado teste de citotoxicidade em esplenócitos de camundongos BALB/c tratados com Miglustato nas doses de 5, 10, 50 e 100 µM através do ensaio de MTT. Posteriormente foi realizado o ensaio de ELISA sanduiche para dosagem das citocinas IFN-γ e IL-6 utilizando sobrenadante de cultura destes esplenócitos. O Miglustato não se mostrou tóxico aos esplenócitos em concentrações de até 100 µM. O efeito imunomodulador do fármaco foi observado com a diminuição significativa da expressão de IFN-γ (p = 0,0078) na dose de 100 µM e redução da expressão de IL-6 nas doses de 10 e 100 µM. O miglustato mostrou-se efetivo na inibição do IFN- γ, que é uma citocina pró-inflamatória encontrada em altos níveis em várias doenças inflamatórias.*

**Palavras-chave:** *Reposicionamento de fármaco, glicosfingolipídios, inflamação, N-butil-deoxinojirimicina*



**ABSTRACT** – *Drug repurposing is a novel strategy for the treatment of various diseases, including inflammatory disorders. Some molecules present on the cell membrane as glycosphingolipids have an important role in installation and progression of these diseases. Glycosylation inhibitors drugs like Zavesca® Miglustat, acts by inhibiting glucosylceramide synthase, the enzyme that is the first step in glycolipids synthesis. Thus, Miglustat which is already employed in the clinical practice to Gaucher disease treatment may possibly be an alternative strategy to combat inflammatory diseases. To evaluate immunomodulatory activity, cytotoxicity assay using the MTT assay was performed on spleen cells from BALB/c mice treated with Miglustat at 5, 10, 50 and 100  $\mu$ M. Thereafter the sandwich ELISA assay was performed to IFN- $\gamma$  and IL-6 cytokines titration using culture supernatant of these splenocytes. The Miglustat was not toxic to splenocytes at concentrations up to 100  $\mu$ M. The immunomodulatory effect of the drug was observed with a significant decrease in IFN- $\gamma$  expression ( $p = 0.0078$ ) at a dose of 100  $\mu$ M and reduction of IL-6 expression at doses of 10 and 100  $\mu$ M. Miglustat was effective in reduction of IFN- $\gamma$ , which is a pro-inflammatory cytokine found at high levels in various inflammatory diseases.*

**Keywords:** *Drug repositioning, glycosphingolipids, inflammation, n-butyl-deoxynojirimycin*

## 1. INTRODUÇÃO

A síntese de novos compostos a serem testados como candidatos a fármacos é um processo longo e dispendioso. Poucas são as substâncias que conseguem vencer as etapas clínicas e pré-clínicas dos estudos farmacocinéticos e toxicológicos (Viegas Jr & Bolzani, 2006). Devido ao longo tempo, ao alto custo para inserção de uma nova molécula o mercado, e a grande parte dos medicamentos atuais possuem elevados efeitos colaterais, novas abordagens são necessárias para combater as doenças da população (Chong & Sullivan Jr, 2007).

Nessa perspectiva, a academia e a indústria farmacêutica estão redirecionando seus esforços para o reposicionamento de fármacos que já são inseridos no mercado. Reciclar a utilização de um medicamento para tratar outra doença caracteriza uma alternativa inovadora e original, buscando em uma molécula conhecida, uma nova utilização com a segurança e a farmacocinética já conhecidos. O estudo com fármacos já descritos e implementados na clínica, permite uma redução no total do custo de um medicamento novo em 40%, devido à eliminação de grande parte dos estudos toxicológicos e farmacocinéticos (Chong & Sullivan Jr, 2007).

O já aprovado e utilizado na clínica para o tratamento da doença de Gaucher, Zavesca® Miglustato, é um inibidor de glicosilceramida sintase, enzima responsável pelo primeiro passo na síntese dos glicosfingilípidios (GSL). Os GSL encontram-se alterados em doenças inflamatórias como fibrose cística pulmonar, indicando ser possivelmente um alvo promissor para o combate a estas doenças (Helenius; Aebi, 2001; Shriver *et al.*, 2004; Aureli *et al.* 2016).



Citocinas pró-inflamatórias desempenham papéis fundamentais na defesa do organismo contra infecções e na vigilância, além de regular ciclo celular e apoptose, ativar células importantes do sistema imune, e recrutar através de quimiocinas células efetoras para sítios de inflamação. Além destas funções, algumas citocinas inflamatórias como a IL-6 e o IFN- $\gamma$  atuam de forma fundamental na progressão de doenças autoimunes como esclerose sistêmica, artrite reumatoide, entre outras (Irmiler *et al.*, 2007; Ostrand-Rosenberg *et al.*, 2009; Hasegawa, 2016).

Através da importância de se reposicionar os fármacos no tratamento de outras doenças, este trabalho visa encontrar novas estratégias no combate à inflamação avaliando a atividade imunomoduladora do já aprovado na clínica para doença de Gaucher, Zavesca® (Miglustato).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Inibidor de glicosilceramida

O miglustato foi obtido através da empresa Sigma-Aldrich - USA e testado nas concentrações de 5, 10, 50 e 100  $\mu$ M para a avaliação imunomoduladora.

### 2.2 Obtenção de camundongos para avaliação da atividade imunomoduladora

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram utilizados 11 camundongos albinos BALB/c (Mus musculus) fêmeas, com faixa etária de 40 dias e peso variando entre 25 e 30 g provenientes do biotério de procedimentos com animais foram iniciados após aprovação pelo Comitê de Ética Animal – Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (CB-UFPE) sob número de processo 23076.041556/2015-62 Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami – LIKA da Universidade Federal de Pernambuco.

### 2.3 Cultura de esplenócitos

Após sacrifício em câmara de CO<sub>2</sub> os camundongos tiveram seus baços retirados e transferidos para placa de Petri contendo Meio RPMI 1640 (Gibco). As células foram desagregadas com o auxílio de uma ponteira e em seguida realizada filtração em Cell Strainer 40 $\mu$ m (BD Bioscience) e centrifugação a 300 G durante 10 minutos, aceleração 6, freio 4. Quando necessário, o precipitado de células foi tratado com solução RBC Lysis Buffer 1x (eBioscience) para lisar os eritrócitos presentes. Os esplenócitos foram contados em Câmara de Neubauer utilizando Azul de Trypan para determinar a viabilidade, sendo usados apenas se a viabilidade fosse superior a 95%, em seguida plaqueadas a 1x10<sup>6</sup> células/poço para realização de cultura com o mitógeno concanavalina A (5 $\mu$ g/mL), e o metilprednisolona como fármaco referencia (100 $\mu$ g/mL). Um poço foi deixado apenas com células sem estímulo para controle do ensaio. Após adição dos controles, a cultura foi tratada com 5, 10, 50 e 100  $\mu$ M do miglustato para avaliação da atividade imunomoduladora, sendo cultivadas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após 48h o sobrenadante da cultura foi retirado e estocado a -30°C até a utilização para dosagem de citocinas.

### 2.4 Ensaio de citotoxicidade em esplenócitos: MTT

O ensaio foi realizado utilizando os esplenócitos dos BALB/c. O método MTT é uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O miglustato foi adicionado em diferentes concentrações 5, 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$ , e incubado por 48h em estufa a 5% de  $\text{CO}_2$  a 37°C. Em seguida foram adicionados 20  $\mu\text{l}$  da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com SDS em espectrofotômetro de placa a 570 nm.

## 2.5 Determinação de citocinas

As citocinas presentes no sobrenadante de cultura foram quantificadas por ELISA sanduíche (Enzyme-linked immunosorbent assay), seguindo as informações recomendadas pelos fornecedores. As citocinas avaliadas foram: IFN- $\gamma$  (máx: 2000/ min: 15,625), e IL-6 (máx: 1000/ min: 7,81). Para amostras que ficaram abaixo do limite de detecção do kit, foi utilizado o valor do ponto menos concentrado.

## 2.6 Análise estatística

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada utilizando o software GraphPad Prism® versão 6. O teste estatístico utilizado na análise da dosagem das citocinas no sobrenadante de cultura foi o teste t pareado não-paramétrico de Wilcoxon, pois inicialmente foi realizado o teste de normalidade e foi visto que as amostras não seguem distribuição normal. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## 3. RESULTADOS

### Avaliação da atividade imunomoduladora do miglustato

Para testar a toxicidade do miglustato nos esplenócitos, foi realizado o ensaio de MTT nas doses de 10, 50, 100 e 500  $\mu\text{M}$  em células de esplenócitos de BALB/c. Nas doses de 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$  não foi observado efeito citotóxico, enquanto na dose de 500  $\mu\text{M}$  foi observado uma citotoxicidade nos esplenócitos conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Tabela de viabilidade de esplenócitos de BALB/c. Os valores são as médias dos quatro experimentos independentes realizados.

Concentração ( $\mu\text{M}$ )	Viabilidade (%)	Desvio Padrão	Nº de experimentos
10	100,0	5,625460	4
50	100,0	10,064770	4
100	93,960750	4,708688	4
500	68,809300	12,745060	4

As doses escolhidas para tratar as culturas dos esplenócitos de BALB/c foram as doses de 5, 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$ , uma vez que não demonstraram citotoxicidade nas células de esplenócitos dos BALB/c. A dose de 500  $\mu\text{M}$ , por ter apresentado alto grau tóxico nas células dos esplenócitos, foi excluída do ensaio. Desta forma, a cultura destas células seguiu com as doses citadas acima, para avaliar o efeito imunomodulador do miglustato.

Após o tratamento com o Miglustato, foi avaliada a secreção das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-6. Na citocina IFN- $\gamma$  foi observada uma redução de sua expressão com perfil dose resposta a partir da dose de 10  $\mu\text{M}$  (Figura 1A). A dose de 5  $\mu\text{M}$  tem uma mediana [1965  $\mu\text{g/mL}$  (86,3 - 4736,5) ] menor que das doses de 10 e 50, apesar de não significativo. Já a dose de 100  $\mu\text{M}$  [1698,0  $\mu\text{g/mL}$  (1161,2 - 3530,8) ] reduziu significativamente ( $p = 0,0078$ ) os níveis de IFN- $\gamma$  quando comparado com a célula estimulada [2465,0  $\mu\text{g/mL}$  (1920,4 - 4988,0) ] (Figura 1A).

Outra citocina que foi dosada no sobrenadante de cultura dos esplenócitos dos BALB/c foi a IL-6. Apesar das medianas das doses de 10 e de 100  $\mu\text{M}$  serem menores do que a mediana da célula estimulada, não houve significância nos resultados. Curiosamente na dose de 50  $\mu\text{M}$  a mediana [185,1  $\mu\text{g/mL}$  (121,3 - 260,1) ] se mostrou maior que a da célula estimulada [150,4  $\mu\text{g/mL}$  (85,6 - 239,6) ] indicando um possível efeito estimulador do Miglustato na produção desta citocina na dose de 50  $\mu\text{M}$  (Figura 1B).

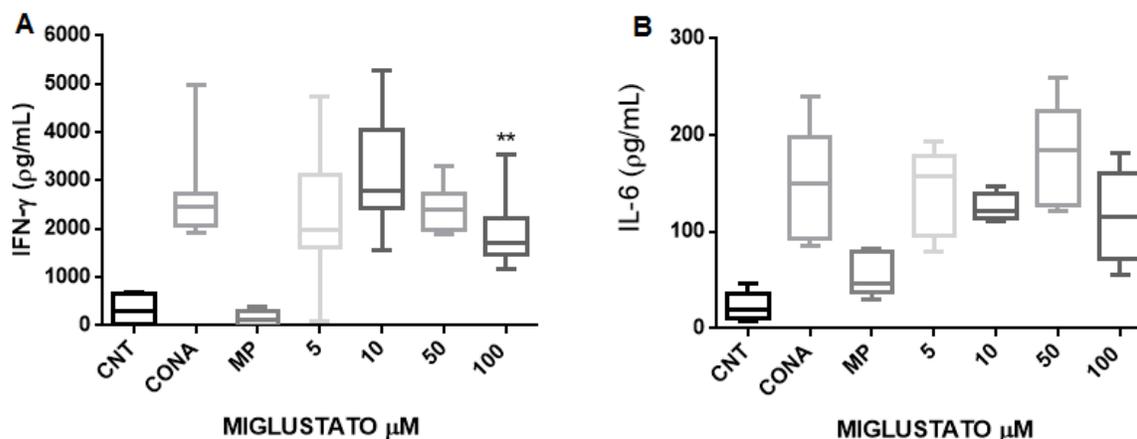


Figura 1 – Níveis de expressão de citocinas (A) IFN- $\gamma$  e (B) IL-6 em sobrenadante de cultura de esplenócitos tratados com miglustato (5, 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$ ) (IFN- $\gamma$  n = 11, IL-6 n = 6). Nos gráficos apresenta-se a comparação do miglustato com os controles (CNT = Controle não tratado, ConA = Concanalina A, MP = Metilprednisolona). A redução na expressão das citocinas foi avaliada em comparação com a condição de estímulo (ConA) e o grau de significância é apresentado pelos asteriscos (\*) e (\*\*).



## 4. DISCUSSÃO

O Miglustato não mostrou atividade citotóxica mesmo na concentração de 100  $\mu\text{M}$  em células normais de esplenócitos de BALB/c como mostra a Tabela 1, fato importantíssimo no que se refere a novas abordagens para tratamento de doenças.

Os nossos resultados mostram um efeito imunomodulador significativo frente a citocina IFN- $\gamma$ , e não significativo na interleucina-6 (Figura 1). Esses resultados concordam com uma atividade imunomoduladora quando Dehecchi, *et al.* (2008) afirmaram que o miglustato tem efeito imunomodulador em fibrose cística de células brônquicas por causa de *P. aeruginosa*, onde há redução dos níveis de mRNA da quimiocina IL-8.

O IFN- $\gamma$  e a IL-6 participam de eventos importantes da resposta imunológica como na comunicação entre a imunidade inata e adquirida, defesa contra infecções virais e bacterianas, regulação do ciclo celular e apoptose, ativação e maturação de células importantes como NKs, CTLs, participa na liberação de quimiocinas importantes para recrutamento de células efetoras para o local de inflamação, dentre outras funções (Schroder *et al.*, 2004; Seliger *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2008; Scheller *et al.*, 2011). A inibição destas citocinas pode ser interessante para o tratamento de muitas patologias de cunho inflamatório como a artrite reumatoide, colites, lúpus, asma entre outras. Mais estudos são necessários para esclarecer a ação do Miglustato em outras citocinas pro e anti-inflamatório bem como a avaliação desta atividade em pacientes portadores de doenças, afim de confirmar seu potencial efeito imunomodulador. A não significância da citocina IL-6 provavelmente está associada ao  $n = 6$ , enquanto o IFN-g teve um  $n = 11$ .

## 6. CONCLUSÃO

O miglustato não foi tóxico em células normais de esplenócitos de camundongos BALB/c. Ademais, foi possível observar que o composto conseguiu inibir de forma significativa a produção de IFN- $\gamma$  e não significativa na interleucina-6. Apesar de mais estudos serem necessários para elucidar melhor essas características, nossos resultados sugerem uma atividade imunomoduladora do miglustato, que mostrou ter potencial para ser uma ferramenta no tratamento de doenças inflamatórias.

## 7. REFERÊNCIAS

AURELI M, SCHIUMARINI D, LOBERTO N, BASSI R, TAMANINI A, MANCINI G, TIRONI M, MUNARI S, CABRINI G, DECHECCHI MC, SONNINO S. Unravelling the role of sphingolipids in cystic fibrosis lung disease. *Chem Phys Lipids.*, v. 200, p. 94-103, 2016.

BIEBERICH E, FREISCHÜTZ B, SUZUKI M, YU RK. Differential effects of glycolipid biosynthesis inhibitors on ceramide-induced cell death in neuroblastoma cells. *J Neurochem.*, p. 1040-1049, 1999.

CHONG, C.R; SULLIVAN, D.J. New uses for old drugs. *Nature.* v. 448, p. 645-646, 2007.



- CROFT SL, SEIFERT K, YARDLEY V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res.*, v. 123, p. 399-410, 2006.
- DECHECCHI MC, NICOLIS E, NOREZ C, BEZZERRI V, BORGATTI M, MANCINI I, RIZZOTTI P, RIBEIRO CM, GAMBARI R, BECQ F, CABRINI G. Anti-inflammatory effect of miglustat in bronchial epithelial cells. *J Cyst Fibros.*, v. 7, p. 555-565, 2008.
- FONTES, A.P.S.; CÉSAR, E.T.; BERVALDO, H. A química inorgânica na terapia do câncer. *Química nova*, 2014.
- HASEGAWA, M. Biomarkers in systemic sclerosis: Their potential to predict clinical courses. *J Dermatol.*, v. 43, p. 29-38, 2016.
- HELENIUS, A.; AEBI, M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science.*, v. 291, p. 2364-2369, 2001.
- HU X, CHAKRAVARTY SD, IVASHKIV LB. Regulation of interferon and Toll-like receptor signaling during macrophage activation by opposing feedforward and feedback inhibition mechanisms. *Immunol Rev.*, v. 226, p. 41-56, 2008.
- INCA, Instituto Nacional de Câncer. Estimativas 2016: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2015.
- IRMLER IM, GAJDA M, BRAUER R. Exacerbation of antigen-induced arthritis in IFN-gamma-deficient mice as a result of unrestricted IL-17 response. *J Immunol.*, v. 179, p. 6228-6236, 2007.
- OSTRAND-ROSENBERG S, SINHA P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol.*, v. 182, p. 4499-44506, 2009.
- SCHRODER K, HERTZOG PJ, RAVASI T, HUME DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.*, v. 75, p. 163-189, 2004.
- SELIGER B, RUIZ-CABELLO F, GARRIDO F. IFN inducibility of major histocompatibility antigens in tumors. *Adv Cancer Res.*, v. 101, p. 249-276.
- SHRIVER, Z.; RAGURAM, S.; SASISEKHARAN, R. Glycomics: a pathway to a class of new and improved therapeutics. *Nature Reviews: Drug Discovery.*, v. 3, p. 863, 2004.
- VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Qim. Nova*, v. 29, v. 2, p. 326-337, 2006.
- ZAIDI MR, MERLINO G. The two faces of interferon- $\gamma$  in cancer. *Clin Cancer Res.*, v. 17, p. 6118-6124, 2011.



## **8. AGRADECIMENTOS**

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Inovação Farmacêutica (INCT-IF). A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes). Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE).



ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOENSAIOS – B 10

## POTENCIAL EFEITO ANTITUMORAL DO EXTRATO DOS FRUTOS DA *LIBIDIBIA FERREA*

A.G. FONSECA<sup>1</sup>, C. N. N. C Dias <sup>1</sup>, H. H. G<sup>1</sup> Carvalho, T. R. A, Lopes<sup>1</sup>, H. A. O. ROCHA<sup>2</sup> e L. A. L. SOARES<sup>3</sup> e T. M. A. M. LEMOS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Norte Laboratório de Pesquisa em Bioquímica Clínica e Experimental – LPBCE, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas Universidade Federal do Rio Grande do Norte, discente, doutorando e Pesquisadora/Docente

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Norte Laboratório, Departamento, departamento de Bioquímica Pesquisador/Docente

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pernambuco Docente/pesquisador do Departamento de Farmácia

Email:telmaml@yahoo.com.br

**RESUMO:** *O objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade in vitro do extrato aquoso dos frutos de Libidibia férrea frente a linhagem celulares normais e tumorais. Foram realizados testes nas células 3T3 (fibroblasto de camundongo) foram tóxicas nas doses de 1 e 10 µg/mL e 10<sup>2</sup> a 10<sup>4</sup> µg/mL que variou de 3,70 a 41,26%. Nas linhagens 786-0 (carcinoma renal) apresentou uma razoável toxicidade que variou de 11,79 a 56% e na HepG2 nas doses de 10<sup>3</sup> e 10<sup>4</sup> µg/mL, de 42,73 e 38,83%, respectivamente. A linhagem B16, Hela e HepG2 demonstraram toxicidade nas concentrações 10<sup>3</sup> e 10<sup>4</sup> µg/mL, de 30,12 e 67,45%; 42,73 e 38,83%; respectivamente e a linhagem B16 também demonstrou comprometimento da viabilidade celular nas concentrações 10<sup>3</sup> e 10<sup>4</sup> µg/mL, de 30,12 e 67,45%, respectivamente. O extrato mostrou-se bastante promissor como extrato com potencial antitumoral e estudos posteriores que confirmem este achado de importante relevância.*

*Palavras chave: Jucá, Toxicidade, Ensaio não clínicos.*

**ABSTRACT:** *The objective of this study is to evaluate the cytotoxic effect of aqueous extract of fruit Libidibia iron against tumor cell line. 1 concentrations were used; 10; 10<sup>2</sup>; 10<sup>3</sup> and 10<sup>4</sup> ug / uL in normal cell lines 3T3 (mouse fibroblast) and tumor Hela (human cervical cancer line), HepG2 (human hepatocarcinoma), 786-0 (kidney carcinoma) and B16 (melanoma) for 24 h exposure to extract, by the MTT method. 3T3 cells showed no cytotoxicity of the extracts evaluated because there cell growth at doses of 1 and 10 ug / 100 ul, and dosage 10<sup>2</sup>-10<sup>4</sup> ug / 100*



*ul was no impairment in cell viability, cellular inhibition with 3.70 to 41.26 %. Hela cells, HepG2, 786-0 and B16 had impaired cell viability at concentrations 10<sup>3</sup> mg / 100 ul, reaching 90.36% cell inhibition. The extract *Libidibia ferrea* showed no cytotoxicity in normal cells (3T3) and showed great inhibitory activity for tumorias cells. The extract proved to be very promising for research on medicinal plants for the treatment of certain cancers.*

*Keywords: Juca, toxicity, non-clinical trials.*

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo. Por causa de tantos pobres prognóstico e muitos efeitos adversos causados pela atual terapêutica em oncologia é que a busca de novos agentes terapêuticos antitumorais está tomando cada vez mais espaço na pesquisa científica. Para isso, a importância de ter medicamentos seguros e eficazes é o principal ponto a ser abordado na pesquisa de novos agentes terapêuticos (Hosseini e Ghorbani, 2015).

Além das atividades popularmente conhecidas de plantas medicinais, tais como atividade anti-inflamatória, anti-bacteriana, analgésico e outros, a pesquisa da atividade anti-câncer em plantas medicinais tem crescido a partir da perspectiva de reduzir os efeitos secundários e uma maior eficiência. Alguns estudos experimentais de várias plantas medicinais têm demonstrado atividade antitumoral em experimentos *in vitro* e *in vivo* (Hosseini e Ghorbani, 2015).

O Brasil tem uma grande biodiversidade de plantas e um rico conhecimento popular sobre o uso de plantas medicinais. Esse conhecimento popular é essencial para desenvolver medicamentos com base em material vegetal (Leite e Cartaxo, 2010). Os estudos atuais sobre a pesquisa e descoberta de plantas medicinais como agentes anticancerígenos promissores têm sido cada vez mais desenvolvidos e observa claramente a necessidade de continuar mais estudos (Pinto et al, 2009; Karadeniz et al, 2015).

Nesta perspectiva, a espécie *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz, pertencente à família Fabaceae (Lorenzi, 2002; Ferreira e Soares, 2015), é conhecida por pau-ferro ou jucá (Ferreira e Soares, 2015). Entre as propriedades terapêuticas descritas para os frutos da espécie destacam-se: antidiarreica, cicatrizantes e têm sido usados para o tratamento de diabetes e prevenção do câncer (Ueda et al., 2002; Nakamura et al., 2002). Sampaio e colaboradores (2009), Cavalheiro e colaboradores (2009) demonstraram que os frutos apresentam atividade antimicrobiana e antifúngica. Também são relatadas atividade analgésica e anti-inflamatória (Ferreira e Soares, 2015, Pereira et al, 2012; Sawada et al, 2014). Além das atividades popularmente conhecidas de plantas medicinais, tais como atividade anti-inflamatória, anti-bacteriana, analgésico, antitumoral entre outros. A comunidade científica apontam estudos promissores principalmente da atividade antitumoral Alguns estudos experimentais de várias plantas medicinais têm demonstrado atividade antitumoral em experimentos *in vitro* e *in vivo* (Hosseini e Ghorbani, 2015). Nesta perspectiva, a espécie *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz, pertencente à família Fabaceae (Lorenzi, 2002; Ferreira e Soares, 2015), é conhecida por pau-ferro ou jucá (Ferreira e Soares, 2015). Entre as propriedades terapêuticas descritas para os frutos da espécie destacam-se: antidiarreica, cicatrizantes e têm sido usados para o tratamento de diabetes e prevenção do câncer (Ueda et al., 2002; Nakamura et al., 2002). Sampaio e colaboradores (2009), Cavalheiro e colaboradores (2009) demonstraram que os frutos apresentam



atividade antimicrobiana e antifúngica. Também são relatadas atividade analgésica e anti-inflamatória (Ferreira e Soares, 2015, Pereira et al, 2012; Sawada et al, 2014). Sendo assim o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito citotóxico do extrato aquoso dos frutos de *Libidibia férrea* frente a linhagem celulares normais e tumorais.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

O extrato foi cedido já pronto pelo professor Luiz Alberto Lira Soares Da UFPE

### Análise de Citotoxicidade

#### Ensaio do MTT / Curva dose resposta

As células das linhagens 3T3 (fibroblasto de camundongo), B16 (melanoma), 786-0 (carcinoma renal) e HepG2 (hepatocarcinoma) foram mantidas em garrafas de cultivo e repicadas para novas garrafas a cada 3 dias, a fim de permitir a expansão clonal e produzir o número de células necessários para as análises. As células 3T3, B16 e HepG2 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino 10% (SFB 10%). Já a linhagem 786-0 foi cultivada em meio RPMI suplementado com SFB 10%.

Para as análises de citotoxicidade, as células foram semeadas em microplacas de 96 cavidades em um volume de 100  $\mu\text{L}$  na concentração de  $1,0 \times 10^5$  células/mL em meio suplementado com 10 % soro fetal bovino (SFB) para manutenção e crescimento celular, e mantidas por 24 horas em estufa a 37°C com 5% de  $\text{CO}_2$ . Foi realizado uma etapa de carenciamento, no qual o meio sobrenadante dos poços foi substituído por meio sem SFB, 24 horas após o plaqueamento. Posteriormente, o meio foi trocado por 100 $\mu\text{L}$  de diluições pré-estabelecidas do extrato em meio suplementado (10% de SFB). Após 24 horas de incubação, todo o conteúdo de meio existente nas microplacas foi descartado e 100  $\mu\text{L}$  do reagente MTT a 10% foi adicionado a cada poço da placa, incluindo controles. 4 horas após, o sobrenadante foi descartado, adicionando-se então 100  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto, para dissolução dos cristais de formazan formados. A absorbância de cada placa foi medida a 570nm em leitor de Elisa.

A curva dose resposta foi obtida analisando-se 05 (cinco) concentrações de extrato diluído em meio de cultura (1000; 100; 10; 1; 0,1  $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ ). A concentração obtida nesta curva que promova a redução de 50% na absorbância quando comparado às células não-tratadas (controle) será considerada a concentração de efeito tóxico (IC50 ou concentração inibitória 50%).

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados no tempo de 24 horas de frente às linhagens de células normais (3T3) e tumorais (B16, 786-0 e HepG2). Todas as análises foram repetidas para confirmação dos resultados.

O perfil citotóxico do extrato bruto da *Libidibia férrea* foi analisado em culturas de células, em diferentes concentrações e tempo. Utilizando linhagem de células normais (3T3), de células de câncer do colo de útero (Hela), de carcinoma renal (786-0), carcinoma hepático (HepG2) e melanoma (B16), mantidas em meio de cultura DMEM-dulbecco's, suplementado com 10% de SFB, na concentração de  $2,5 \times 10^4/\text{ml}$ , em 10 ml de meio, em garrafa de cultura de 75

cm<sup>3</sup>. As células foram repicadas a cada 2 dias, utilizando tripsina 0,25% em PBS, por 2 minutos, centrifugadas e ressuspensas em meio de cultura fresco.

### Análise estatística

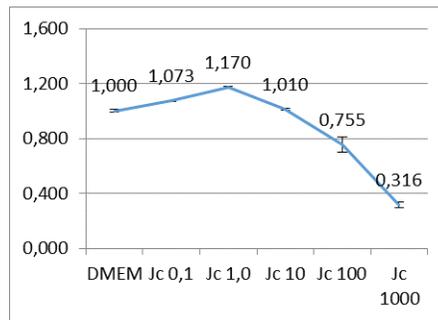
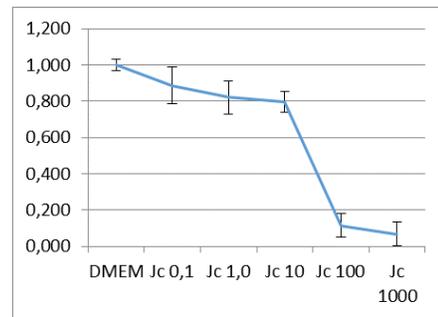
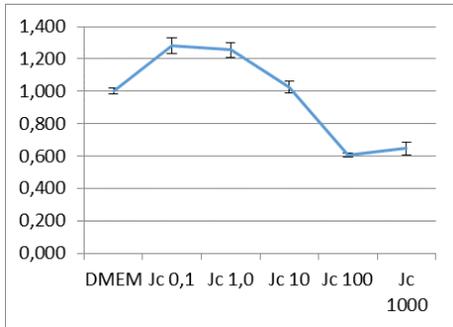
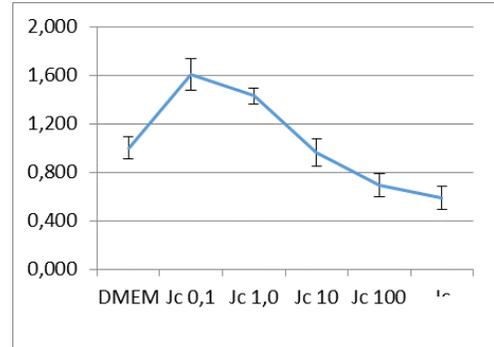
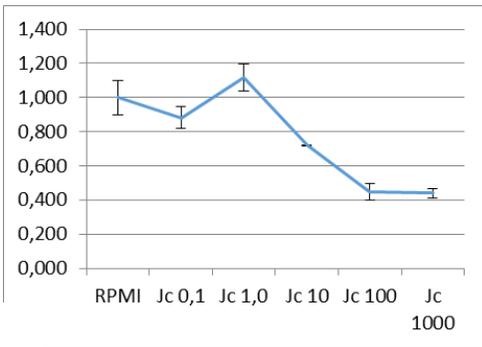
A análise estatística foi realizada usando SPSS v.20 para Windows (SPSS, Chicago, IL, EUA). Foi usada para amostras independentes ANOVA com pós teste de Tukey-Kramer ou Dunnett, com um nível de significância de 5%.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As células 3T3 destacaram viabilidade celular nas doses de 1 e 10 µg/mL, e da dose 10<sup>2</sup> a 10<sup>4</sup> µg/mL houve comprometimento da viabilidade celular que variou de 3,70 a 41,26%. Nas células 786-0 houve comprometimento da viabilidade celular variando de 11,79 a 56%. As células HepG2 demonstraram comprometimento da viabilidade celular nas concentrações de 10<sup>3</sup> e 10<sup>4</sup> µg/mL, de 42,73 e 38,83%, respectivamente. B16 também demonstrou comprometimento da viabilidade celular nas concentrações 10<sup>3</sup> e 10<sup>4</sup> µg/mL, de 30,12 e 67,45%, respectivamente. As células Hela tiveram sua viabilidade celular afetada em 88,74% e 93,37% nas concentrações de 10<sup>3</sup> e 10<sup>4</sup> µL/mL. O extrato da *Libidibia ferrea* não comprometeu fortemente as células normais (3T3) e demonstrou ótima atividade inibitória sob a viabilidade de células tumorais 786-0, B16 e Hela (Figura 1). A análise da atividade citotóxica nas linhagens celulares foi realizada como um estudo preliminar da toxicidade do extrato dos frutos da *Libidibia ferrea*. O extrato não causou morte celular nas doses de 1, 10 e 100 µg/mL, porém nas doses de 1000 e 10000 µg/mL foi citotóxico para a maioria dos tipos de células. A partir dos resultados obtidos, surge a possibilidade de investigar a atividade antitumoral do extrato, apesar do extrato não ter mostrado seletividade para linhagem tumoral.

A avaliação da citotoxicidade é importante porque permite compreender o mecanismo biológico que produz o efeito citotóxico e o mecanismo de ação de diferentes substâncias durante a sua interação com os tecidos. No entanto, reconhece-se que o teste tem suas limitações. A utilização de culturas de células em monocamadas não é fisiológica e não reproduz a real arquitetura do tecido vivo em que as células subjacentes poderiam reparar as agressões sofridas. Desta forma, a presença de um efeito citotóxico *in vitro* não garante que o material é tóxico quando aplicado *in vivo*. Por outro lado, a ausência de um efeito citotóxico garante uma boa resposta clínica. As análises realizadas nos permitem inferir que o extrato hidroetanólico tem potencial para maiores investigações na atividade citotóxica tendo em vista que o mesmo é um extrato bruto, e seus componentes ativos, após concentrados possam promover um percentual ainda maior de inibição do crescimento celular nessas linhagens.

**Figura 1 – Gráficos de viabilidade de células expostas a concentrações diferentes dos extratos aquosos da espécie *Libidibia ferrea*. Linhagens: 3T3 (A), 786-0 (B), HepG2 (C), B16 (D) e Hela (E). Método: MTT.**





#### 4. CONCLUSÕES

Os ensaios de citotoxicidade demonstraram o potencial do extrato hidroetanólico de frente a linhagens de células tumorais. Com os resultados obtidos, pode-se inferir que o extrato possui potencial para mais estudos voltados ao tratamento de células de câncer renal e melanoma.

#### 5. REFERÊNCIAS

AMARAL, A. C. F., SIMÕES, E. V., FERREIRA, J. L. P. **Coletânea científica de plantas de uso medicinal**. Fiocruz. Curitiba, 2005.

FERREIRA, M. R. A.; SOARES, L. A. L. **Libidibia férrea (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz: A review of the biological activities and phytochemical composition**. Journal of Medicinal Plants Research, vol. 9 (2), págs. 140- 150. Pernambuco/Brasil - 2015.

LEITTE e CARTAXO, Sarahbelle et al. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid north eastern Brazil. *Journal Of ethnopharmacology*, Pernambuco, n. 131, p.326-342, 2010.

LORENZI, H; Matos Fja. Plantas Mediciniais No Brasil: Nativas E Exóticas, 2 Nd Ed., *Nova Odessa: Instituto Plantarum*, P. 223-224. 2008.

MARREIRO, R.O.; BANDEIRA, M.F.C.L.; ALMEIDA, M.C.; COELHO, C.N.; VENÂNCIO, G.N.; CONDE, N.C.O. Cytotoxicity evaluation of a mouthwash containing extract of *Libidibia ferrea* *Brazilian Research in Pediatric Dentistry and Integrated Clinic*. V. 4(Supl.3), p.34-42; 2014.

MELLO, F. B; LANGELOH, A.; MELLO, J. R. B. Estudo de Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápico contendo *Pimpinella anisum*, *Foeniculum foeniculum*, *Sambucus australis* e *Cassia angustifolia*. *Latin American Journal Of Pharmacy*, Porto Alegre/rs, v. 2 (26), p.230-237, 2006.

NAKAMURA, E.S.; KUROSAKI, F.; Arisawa, M.; OKUDA, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, supl. 1, p. 45-61, 2002.

SANDHAR, H.K.; KUMAR, B.; PRASHER, S.; TIWARI, P.; SALHAN, M.; SHARMA. P. A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, [S.l.], v. 1, n.1, pp. 25 – 41, 2011.

TIWARY, B. K.; BIHANI, S.; KUMAR, A.; CHAKRABORTY, R.; GHOSH, R. The *in vitro* cytotoxic activity of ethno-pharmacological important plants of Darjeeling district of West Bengal against different human cancer cell lines. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, [S.l.], v. 15, n. 22, 2015.



UEDA, H.; KAWANISHI, K.; MORIYASU, M. **Effects of Ellagic Acid and 2-(2,3,6-Trihydroxy-4-carboxyphenyl) ellagic Acid on Sorbitol Accumulation in Vitro and in Vivo.** Biol. Pharm. Bull, vol. 27, n° 10, 2004.

## **6. AGRADECIMENTOS**

À Capes, CNPQ, à UFRN, à FAPERN, à equipe do Laboratório de Pesquisa em Bioquímica Clínica e Experimental, ao departamento de Histologia e Doutoranda Ana Celly Souza Santos (in memoriam).



**BIOLOGIA  
MOLECULAR**



ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOLOGIA MOLECULAR – BM 4

## DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO NO SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES SAUDÁVEIS E COM LESÕES CERVICAIS

K. C. G. NASCIMENTO<sup>1</sup>, A.P.D.GURGEL<sup>2</sup>, D.C.A.QUIXABEIRA,<sup>3</sup> B.S. CHAGAS<sup>1</sup>,  
R.C.O.SILVA<sup>1</sup>, P.R.DUQUE<sup>4</sup>, J.C.SILVANETO<sup>3</sup>, A.C.FREITAS<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Genética

<sup>2</sup> Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Aplicadas e Educação, Departamento de Engenharia e Meio Ambiente

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Histologia e Embriologia

<sup>4</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Ciências Veterinárias

E-mail para contato: kamylla\_conceicao@hotmail.com

**RESUMO** – Estudos tem demonstrado o envolvimento do HPV em epitélios e mucosas não cervicais, tais como vagina, pênis, mama, pulmão, cabeça e pescoço. Essas observações levantam questões sobre como o HPV poderia se estabelecer nestes tecidos. Especula-se que as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) infectadas podem se espalhar e infectar outros sítios corporais. Dessa maneira, o objetivo do presente estudo é detectar a presença, a genotipagem e a carga viral do DNA do HPV no sangue periférico de pacientes saudáveis, com lesões cervicais e câncer cervical. Um total de 152 amostras de raspagem cervical e sangue foram coletadas. A detecção do DNA do HPV foi realizada utilizando-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com iniciadores degenerados MY09/11 seguida de nested com os primers GP05/06. A quantificação da carga viral nas amostras HPV positivas será realizada pela técnica de PCR em tempo real (qPCR). Para tal, o primer E6, usado para a determinação da carga viral das amostras de sangue periférico. Setenta e duas amostras (47,3%) de sangue foram HPV positiva e oitenta amostras (52,7%) de sangue foram HPV negativas. Sessenta e cinco amostras (42,7%) cervicais foram positivas e oitenta e sete (57,3%) foram negativas. Das amostras positivas no sangue, quarenta e quatro (61,1%) não apresentaram lesões cervicais, oito (11,1%) tiveram CIN I, cinco (6,9%) apresentavam NIC II e quatro (5,5%) tinha câncer cervical. Foram detectados 5 tipos de HPVs no sangue periférico, nomeadamente os HPVs 16, 18, 33, 58 e 66. Os cinco genótipos virais mais frequentes foram os seguintes: HPV16 (48%), HPV18 (32%), HPV33 (13%), HPV58 (5,4%) e o HPV66 (1,8%). Através das qPCR, foi demonstrada a presença de carga viral do HPV16 em amostras de pacientes saudáveis, que não apresentavam lesão cervical. A carga viral variou nas amostras estudadas de

*1,63/10<sup>4</sup> células a 405,51/10<sup>4</sup> células. Esse estudo descreve a presença do DNA-HPV e os genótipos virais mais frequentes encontrado no plasma de pacientes sem lesões cervicais e com lesões cervicais, e também a carga viral no sangue periférico de pacientes saudáveis, no estado de Pernambuco, Brasil.*

*Palavras chaves: Papilomavírus Humano (HPV), Sangue, Carga viral*

*ABSTRACT - Studies have shown the involvement of HPV in non-cervical epithelial and mucous membranes such as the vagina, penis, breast, lung, head and neck. These observations raise questions about how HPV could be established in these tissues. It is speculated that infected peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) may spread and infect other body sites. Thus, the aim of this study is to detect the presence, genotyping and viral load of HPV DNA in the peripheral blood of healthy patients with cervical lesions and cervical cancer. A total of 152 samples of cervical scraping and blood were collected. The HPV DNA detection was performed using the polymerase chain reaction (PCR) with degenerate primers MY09 / 11 then nested with GP05 / 06 primers. Quantification of viral load in HPV positive samples was performed by PCR in real time (RT- qPCR), to this purpose, the E6 primer, was used to determine the viral load of the peripheral blood samples. Seventy-two samples (47.3%) of blood were HPV positive and eighty samples (52.7%) of blood were HPV negative. Sixty-five samples (42.7%) were positive cervical and eightyseven (57.3%) were negative. Of the positive samples in the blood, forty-four (61.1%) had cervical lesions, eight (11.1%) had CIN I, five (6.9%) had CIN II and four (5.5%) had cervical cancer. 5 were detected HPV types in the peripheral blood, in particular HPV 16, 18, 33, 58, and 66. The five most common viral genotypes were as follows: HPV16 (48%), HPV18 (32%), HPV33 (13%), HPV58 (5.4%) and HPV66 (1.8%). Through qPCR it has been demonstrated the presence of HPV16 viral load in samples of healthy patients who had no cervical lesion. The viral load in the studied samples varied from 1.63 / 10<sup>4</sup> 405.51 cells / 10<sup>4</sup> cells. This study describes the presence of HPV DNA and the most common viral genotypes found in the plasma of patients without cervical lesions and cervical lesions, and also the viral load in peripheral blood of healthy patients in the state of Pernambuco, Brazil.*

*Keywords: Human Papillomavirus (HPV), Blood, Viral load*

## **1. INTRODUÇÃO**

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que o câncer cervical representa a quarta neoplasia mais prevalente em mulheres em todo o mundo, com 527,600 casos e 265,700 mortes por ano (Torre *et al.*, 2015). No Brasil, estima-se que a prevalência do câncer cervical constitui também a terceira maior causa de câncer em mulheres, apenas suplantadas pelo câncer de mama e câncer de cólon e reto (INCA, 2015).



Diversos estudos epidemiológicos têm sugerido que a etiologia do câncer cervical é complexa, nos quais existem a interação dos fatores genéticos e ambientais na manifestação desse fenótipo (De Freitas *et al.*, 2012; Termini; Villa, 2008). Evidências mostram que infecções persistentes causadas pelo Papilomavírus humano (HPV) associadas ao comprometimento do sistema imunológico são fatores preponderantes para o desenvolvimento do câncer cervical (De Freitas *et al.*, 2012; Sichero; Villa, 2006; Zur Hausen, 1999, 2009).

Outros estudos tem demonstrado o envolvimento do HPV em epitélios e mucosas não cervicais, tais como mama, pulmão, pele, cabeça e pescoço (Lowy; Schiller, 2012). Essas observações levantam questões sobre como o HPV poderia se estabelecer nestes tecidos uma vez que não ocorre viremia. Em outras infecções virais, as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) infectadas podem se espalhar e infectar outros sítios. Assim, especula-se que PBMC possa executar esta função nas infecção pelo HPV em sítios não cervicais.

Evidências de Papilomavírus no sangue periférico já foi demonstrada em outros mamíferos e em humanos (Carvalho *et al.*, 2003; Freitas *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2014; Yagui *et al.*, 2008). Além disso, estudos tem demonstrado a presença de DNA do HPV na corrente sanguínea de pacientes infectados com HPV e também pacientes que não apresentaram queixas clínicas ou história de infecção HPV genital quando suas amostras de sangue foram coletadas (Alvarez-Rosero *et al.*, 2008; Bodaghi *et al.*, 2005; Kay *et al.*, 2005).

Uma vez que ainda não está bem estabelecido o papel do sangue periférico no processo de infecção pelo HPV, estudos relacionados à compreensão desses achados se tornam necessários. Assim, o presente projeto de pesquisa detectou a presença, a genotipagem e a carga viral do DNA do HPV no sangue periférico de pacientes saudáveis, com lesões cervicais e câncer cervical.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Amostras

No presente estudo, foram selecionadas amostras biológicas de pacientes oriundas da região metropolitana do Recife, PE. Foram incluídas neste estudo as pacientes que apresentarem histopatológico indicativo de lesões pré-neoplásicas NICI, NICII, NICIII e câncer cervical. Além disso, pacientes saudáveis e sem histórico de lesões cervicais foram incluídas no presente estudo, como grupo controle. As amostras biológicas obtidas da raspagem cervical e de plasma foram coletadas pela Dra. Maria Eugênia de Albuquerque, durante os exames de rotina realizados ambulatório de Ginecologia Oncológica do Hospital Universitário Oswaldo Cruz durante o período de Novembro de 2010 a Agosto de 2011.

### 2.2 Extração do DNA viral

Em todas as amostras do raspado cervical e de sangue periférico foram extraídos o DNA e, em seguida, armazenadas a -20°C. A extração do DNA genômico e viral foi efetuada utilizando o kit de extração *GenominPrepBlood DNA isolation* (AmeshanBioscience), obedecendo as instruções do fabricante.

### 2.3 Detecção do DNA do HPV

Para a detecção do DNA do HPV, foi utilizada a PCR com o conjunto de primers consenso e degenerado MY09/11 (MY09: CGTCCMARRGGAWACTG ATC e MY11: GCMCAGGGWCATAAYAATGG). Os primers MY09/11 foram utilizados no presente estudo pois



amplificam uma sequência parcial de 450pb altamente conservada do gene L1 de 47 Papilomavírus (Gravitt *et al.*, 2000). Para as amostras de sangue periférico, foram realizadas reações de PCR com primers MY09/11 seguidas de nested PCR, utilizando os primers GP5+/GP6+, conforme descrito por (QU *et al.*, 1997). Todas as amostras positivas foram sequenciadas, com a finalidade de comprovar a presença do DNA do HPV.

#### 2.4 Genotipagem do HPV

Todas as amostras positivas para o DNA do HPV foram submetidas ao sequenciamento com a finalidade de confirmar os resultados obtidos com as PCRs bem como tipificar os HPVs.

Para tal, todas as amostras positivas para o DNA do HPV foram purificadas, utilizando-se um protocolo *in house* com etanol/isopropanol (Sambrook, *et al.* 2000). Em seguida, as amostras positivas para o DNA do HPV foram sequenciadas. O sequenciamento das amostras foi realizado na Plataforma Multiusuária de Sequenciamento e Análise de Expressão Gênica do Laboratório Central, Universidade Federal de Pernambuco. Foi utilizado o sequenciador automático de DNA ABI Prism 3100 (Applied Biosystem®), de acordo com os padrões estabelecidos nesta unidade. As reações de sequenciamento foram realizadas com os mesmos pares de *primers* utilizados para a detecção do DNA do HPV.

As sequências resultantes foram analisadas utilizando o pacote Standen (Standen, 1996) com os programas Gap4 (versão 4.0) e Pregap4 (versão 1.5), os quais foram utilizados para a construção dos *contigs* das sequências obtidas de DNA dos HPV. Após a montagem dos *contigs*, foi utilizado o programa BLAST, disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, para a comparação com sequências HPV previamente conhecidas.

#### 2.5 Quantificação da carga viral do DNA do HPV em sangue periférico PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

A quantificação da carga viral do HPV16 foi realizada através de PCRs em tempo real (qPCR), utilizando o sistema Sybr Green. A amplificação foi realizada em um volume total de 20µl, contendo 2x Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®) e oligonucleotídeos que amplificam regiões de E6 do HPV16 (PEITSARO *et al.*, 2002). Nas reações, foram utilizadas o aparelho ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems®).

Como controle da reação, foram utilizadas diluições do genoma completo de HPV16 clonado no vetor pBR-322, que continha de 86 a 862 milhões de cópias por reação, servindo como um padrão para curvas de calibração para o gene E6. Como controle positivo das reações, foi utilizado o DNA extraído das linhagens celulares CaSki (400–600 cópias por célula) e SiHa (1-2 cópias de HPV16 integrado por célula), usadas para controlar a precisão e reprodutibilidade das curvas padrão estimadas para carga de HPV.

Além disso, foi utilizado um gene endógeno, β2-microglobulina, como normalizador para qPCR. O gene da β2-microglobulina foi utilizado para ajustar as diferenças na quantidade de DNA genômico de entrada entre as amostras. Carga viral normalizada foi calculada dividindo o número de cópias de HPV pelo o número de cópias β2-microglobulina (com base em 2 cópias de β2-microglobulina por célula) e foi expressa como cópias de vírus por célula de equivalentes, de acordo com a fórmula descrita (Carcopino *et al.* 2006):

$$\text{Carga viral HPV (cópias/célula)} = \frac{\text{Número de cópias HPV} \times 10^4}{\text{Nº de cópias de } \beta 2\text{-microglobulina}}$$

## 2.6 Considerações éticas

O protocolo do presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade de Pernambuco (CAAE: 0058.0.106.000-10, HUOC/PROCAPE 64/2010) e Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE sob o CAAE: 09307612.8.0000.5208).

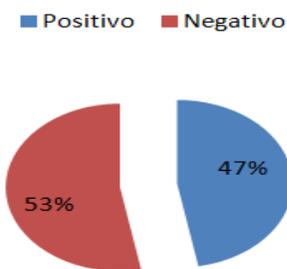
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Características da população estudada e prevalência do HPV na cérvix e sangue periférico

No presente estudo, foram incluídas 153 pacientes oriundas da região metropolitana do Recife, Estado de Pernambuco. A média etária das 153 pacientes foi de 39,91 anos (variando de 16 a 65 anos).

A presença do DNA do HPV na região cervical foi avaliada em 153 pacientes. Deste total, 43% foram positivas para o DNA do HPV (Figura 1). Com relação a presença do DNA do HPV em sangue periférico, foi observado uma percentagem de 47% das amostras positivas para o DNA do HPV (Figura 2).

**Figura 1. Prevalência do DNA do HPV na região da cérvix de 153 pacientes oriundas da região Nordeste do Brasil.** Em uma população de 153 pacientes, foi observado uma prevalência de 43% do DNA do HPV em amostras do raspado cervical.



**Figura 2: Prevalência do DNA do HPV em 153 amostras de sangue periférico de pacientes oriundas da região Nordeste do Brasil.** Em uma população de 153 pacientes, foi observado uma prevalência de 47% do DNA do HPV em amostras de sangue periférico.

### 3.2 Resultados da citologia oncótica

Dentre as amostras positivas para o DNA do HPV no sangue periférico, 61% das pacientes não apresentavam lesão cervical ou qualquer alteração na cérvix, enquanto 39% tinham alguma lesão ou câncer cervical. Dentre o total de pacientes, um percentual de 2,7% das pacientes apresentaram condiloma; cerca de 17% do total das pacientes tinham lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL) I; 8% apresentaram lesão intraepitelial de alto grau (HSIL); 10% tinham câncer cervical escamoso e; 1,3% apresentaram adenocarcinoma (Figura 3).

**Figura 3. Análise citológica da região cervical das pacientes positivas para o DNA do HPV em sangue periférico.** Em um total de 72 amostras cervicais foi realizada a análise citológica da região cervical. Foi observado pacientes sem lesão, com condiloma, LSIL, HSIL e câncer cervical invasivo.

### 3.3 Detecção dos tipos de HPV em sangue periférico

Foram detectados 5 tipos de HPVs no sangue periférico, nomeadamente os HPVs 16, 18, 33, 58 e 66 (Figura 4). Os cinco genótipos virais mais frequentes foram os seguintes: HPV16 (48%), HPV18 (32%), HPV33 (13%), HPV58 (5,4%) e o HPV66 (1,8%). Entretanto, como demonstrado anteriormente pelo nosso grupo, o HPV 16 e 31 são os mais frequentemente detectados na região cervical de mulheres do Nordeste do Brasil (Baldez da Silva *et al.*, 2009; Chagas *et al.*, 2015; Gurgel *et al.*, 2015).

**Figura 4. Distribuição dos HPVs detectados em amostras de sangue periférico de pacientes oriundas da Região Nordeste do Brasil.** Os HPVs 16, 18, 33, 58, e 66 foram os cinco genótipos detectados na população estudada.

### 3.4 Quantificação da carga viral e determinação do *status* físico

Após a confirmação da presença do DNA do HPV16 em sangue periférico, procedeu-se a determinação da carga viral do vírus neste tecido. Para tal, o primer E6, usado para a determinação da carga viral das amostras de sangue periférico das pacientes analisadas.

Através das RT-qPCR, foi demonstrada a presença de carga viral do HPV16 em amostras de pacientes saudáveis, que não apresentavam lesão cervical. A carga viral variou nas amostras estudadas de  $1,63/10^4$  células a  $405,51/10^4$  células. Além disso, a carga viral em sangue periférico de uma paciente saudável (sem lesões cervicais) apresentou valores semelhantes às de amostras cervicais de pacientes com câncer cervical (Tabela 1).

**Tabela 1. Resultado da PCR em tempo real para a quantificação do gene E6 do HPV16. (\*) Valor de carga viral no sangue semelhante ao encontrado em amostras de câncer cervical.**

Amostras	HPV16 E6/104 células
1	1,72
2	3,47
3	1,63
4	4,78
5	*405,51

Diversos cenários podem explicar a presença do DNA do HPV em sangue periférico de pacientes saudáveis, com lesões cervicais ou câncer cervical: 1) O DNA do HPV detectado pode ser originado de apoptose das células infectadas e, com isso, ocorre a liberação de fragmentos de DNA genômico e viral no sangue periférico, sem qualquer repercussão biológica nas pacientes; 2) O DNA do HPV detectado está sendo carregado por alguma célula (possivelmente linfócitos), mas é apenas um “*passageiro*”, sem repercussão biológica nas pacientes; 3) O DNA do HPV detectado está sendo carregado por alguma célula (possivelmente linfócitos), e possui atividade viral nesta célula; 4) O HPV encontrado no sangue pode, potencialmente, infectar outros tecidos.

A presença de carga viral em sangue periférico em pacientes saudáveis e sem histórico de lesões cervicais deve ser investigada, pois existe a possibilidade de que o sangue periférico seja uma fonte alternativa de contaminação para outros sítios corpóreos nos quais o vírus possa replicar-se e



subsequentemente intergrar-se. Vale salientar também que, nesta etapa do projeto, foi apenas quantificado o HPV16 nas amostras.

#### 4. CONCLUSÃO

1. Os resultados do presente estudo demonstraram a presença do DNA do HPV em sangue periférico de pacientes saudáveis, com lesão cervical e com câncer cervical;
2. Os HPVs mais frequentes em sangue periférico foram os genótipos 16 e 18, contrastando, em parte, com os genótipos encontrados na cérvix, que são os tipos 16 e 31;
3. Amostras de pacientes saudáveis, sem histórico de lesão cervical ou câncer cervical, apresentaram carga viral no sangue periférico.

#### 5. REFERÊNCIAS

- ALVAREZ-ROSETO, R. E. *et al.* Chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes of high-risk HPV-infected women with HGSIL. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 49, n. 9, p. 688–694, dez. 2008.
- CHAGAS, B. S. *et al.* Association Study between Cervical Lesions and Single or Multiple Vaccine-Target and Non-Vaccine Target Human Papillomavirus (HPV) Types in Women from Northeastern Brazil. *PLoS ONE*, v. 10, n. 7, p. e0132570, 15 jul. 2015.
- DE FREITAS, A. C. *et al.* Susceptibility to cervical cancer: An overview. *Gynecologic Oncology*, 4 abr. 2012.
- FREITAS, A. C. DE *et al.* Viral DNA sequences in peripheral blood and vertical transmission of the virus: a discussion about BPV-1. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 34, p. 76–78, nov. 2003.
- GRAVITT, P. E. *et al.* Improved Amplification of Genital Human Papillomaviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n. 1, p. 357–361, 1 jan. 2000.
- GURGEL, A. P. A. D. *et al.* Prevalence of Human Papillomavirus Variants and Genetic Diversity in the L1 Gene and Long Control Region of HPV16, HPV31, and HPV58 Found in North-East Brazil. *BioMed Research International*, v. 2015, p. e130828, 22 fev. 2015.
- KAY, P. *et al.* Detection of HPV 16 and HPV 18 DNA in the blood of patients with cervical cancer. *Journal of Medical Virology*, v. 75, n. 3, p. 435–439, mar. 2005.
- LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. Reducing HPV-associated Cancer Globally. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, v. 5, n. 1, p. 18–23, jan. 2012.
- PEITSARO, P.; JOHANSSON, B.; SYRJÄNEN, S. Integrated Human Papillomavirus Type 16 Is Frequently Found in Cervical Cancer Precursors as Demonstrated by a Novel Quantitative Real-Time PCR Technique. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 3, p. 886–891, 1 mar. 2002.
- QU, W. *et al.* PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 35, n. 6, p. 1304–1310, jun. 1997.
- Sambrook J *et al.* 2000. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Third Edition) - HUM-MOLGEN literature. Disponível em: <<http://hum-molgen.org/literature/12-2000/000001.html>>. Acesso em: 23 nov. 2012.
- SICHERO, L.; VILLA, L. L. Epidemiological and functional implications of molecular variants of human papillomavirus. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 39, p. 707–717, jun. 2006.
- SILVA, M. A. R. *et al.* The presence and gene expression of bovine papillomavirus in the peripheral blood and semen of healthy horses. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 61, n. 4, p. 329–333, ago. 2014.
- TERMINI, L.; VILLA, L. Biomarcadores na Triagem do Câncer do Colo Uterino. *Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis*, v. 20, n. 2, p. 125–131, 2008.



TORRE, L. A. *et al.* Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 65, n. 2, p. 87–108, 1 mar. 2015.

YAGUIU, A. *et al.* Simultaneous presence of bovine papillomavirus and bovine leukemia virus in different bovine tissues: in situ hybridization and cytogenetic analysis. *Genetics and Molecular Research: GMR*, v. 7, n. 2, p. 487–497, 2008.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in Human Cancers. *Proceedings of the Association of American Physicians*, v. 111, n. 6, p. 581–587, 15 nov. 1999.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*, v. 384, n. 2, p. 260–265, 20 fev. 2009.

## **6. AGRADECIMENTOS**

À FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco), ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).



**BIOTECNOLOGIA E  
NANOTECNOLOGIA EM SAÚDE**



ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOTECNOLOGIA E NANOTECNOLOGIA EM SAÚDE – BN 2

## BIOSENSOR PIEZOELÉTRICO BASEADO EM PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO PARA DETECÇÃO BACTERIANA

R. R. SILVA<sup>1</sup>, G. L. B. LOPES<sup>1</sup>, I. S. OLIVEIRA<sup>2</sup>, O. L. FRANCO, M. D. L. OLIVEIRA<sup>1</sup> e C. A. S. ANDRADE<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória

<sup>3</sup> Universidade Católica de Brasília, Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas

E-mail para contato: rafamos1987@gmail.com

**RESUMO** – *As bactérias são microrganismos unicelulares que podem ser diferenciados morfológicamente e classificadas entre gram-negativas e gram-positivas. Apesar da maioria destas bactérias serem inofensivas aos seres humanos, algumas espécies, principalmente gram-negativas, são responsáveis por causar diversas infecções através de alimentos contaminados ou sua proliferação em ambientes hospitalares. Neste contexto, o desenvolvimento de novas ferramentas diagnósticas pode contribuir para uma medida terapêutica precoce e a diminuição de agravamentos clínicos associados a estes microrganismos. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um biossensor piezoelétrico simples com a capacidade de identificar e diferenciar bactérias gram-negativas e gram-positivas. O dispositivo sensor foi desenvolvido através da interação de nanotubos de carbono e o peptídeo antimicrobiano, chamado Clavanina A (ClavA). Para comprovar a eficiência do biossensor comparamos as bactérias *Escherichia coli* (gram-negativa) e *Enterococcus faecalis* (gram-positiva). O sensor apresentou diferentes padrões de frequência entre as bactérias testadas. Os padrões de frequência emitidos pelo cristal de quartzo foram menores para *E.coli*, comparada aos da *E. faecalis*. Além disso demonstrou um limite de detecção de  $10^3$  UFC/mL. Portanto, o nosso sistema identificou de forma eficaz e permitiu diferenciar bactérias gram-positivas de gram-negativas e que pode potencialmente ser aplicada em análises microbiológicas.*

*Palavras-chave: biossensor, bactéria, piezoelétrico, clavanina.*

**ABSTRACT** – *Bacteria are unicellular microorganisms that can be morphologically differentiated and classified among gram-negative and gram-positive. Although most of these bacteria are harmless to humans, some species, especially gram-negative bacteria, are responsible for causing various infections through contaminated food or proliferation*



*in hospital environments. In this context, the development of new diagnostic tools may contribute to an early therapeutic measure and decrease of clinical exacerbations associated with these microorganisms. The objective of this study was to develop a simple piezoelectric biosensor with the ability to identify and differentiate gram-negative and gram-positive. The sensing device was developed through the interaction of carbon nanotubes and antimicrobial peptide, called Clavanin A. To prove the efficiency of the biosensor comparing the bacteria Escherichia coli (gram negative) and Enterococcus faecalis (gram-positive). The sensor showed different patterns of frequency among the tested bacteria. frequency standards issued by the quartz crystal were lower for E. coli compared to E. faecalis. In addition it showed low detection limit of  $10^3$  CFU/mL. Therefore, our system effectively identified and allowed to differentiate gram-positive and gram-negative bacteria, which can potentially be applied in microbiological analyses.*

*Keywords: Biosensor, bacteria, piezoelectric, clavanin.*

## 1. INTRODUÇÃO

As bactérias são microrganismos unicelulares capazes de viver em diversos ambientes e resistir a diversas condições ambientais. Estes seres apresentam diferente morfologias e podem ser classificados pela coloração de Gram. Embora estes microrganismos em sua maioria sejam inofensivos aos seres humanos, algumas espécies são responsáveis por causar infecções através de alimentos contaminados (Possan *et al.*, 2015) e por causar infecções nosocomiais. Algumas destas infecções são causadas devido à grande capacidade desses microrganismos de apresentar resistência a diversos antibióticos convencionais utilizados até hoje (Lautenbach *et al.*, 2001). Por isso é importante desenvolver novas ferramentas diagnósticas que possam contribuir para medidas terapêuticas mais eficazes.

Entre estas novas ferramentas, os biossensores, são dispositivos que apresentam diferentes métodos de mensuração que apresentam vantagens como alta sensibilidade, baixo custo e mensuração em tempo real. Uma das metodologias que caracterizam os biossensores é a técnica piezoelétrica que é aplicada através da utilização de uma microbalança de quartzo (QCM). O princípio desta técnica permite medir a oscilação da frequência emitida pelo cristal de quartzo, que ocorre quando há a deposição de massa sobre a sua superfície (Ferreira *et al.*, 2010). A QCM composta por duas partes: a parte de reconhecimento, que vai interagir com o analito usando moléculas biológicas e a segunda parte é o transdutor que irá realizar a conversão dos parâmetros gerados pela interação entre o analito e a parte de reconhecimento.

No desenvolvimento dos biossensores é possível integrar não somente moléculas biológicas (peptídeo, anticorpo, enzimas e etc.) mas também podem ser introduzidos nanomateriais como nanopartículas e nanotubos de carbono. Estes materiais são bastante utilizados devido a suas propriedades estruturais e estabilidade durante a utilização experimental.

Neste trabalho, foram usados nanotubos de carbono (NTC), um nanomaterial composto por carbono que quando ligados entre si formam estruturas hexagonais. Essas estruturas se ligam entre si

e resultam numa conformação tubular. Os NTC podem ser encontrados na forma de parede simples (NTCS) ou de paredes múltiplas (NTCM) (Laschi *et al.*, 2007) e apresentam grande capacidade de condução elétrica (Eguílaz *et al.*, 2015). Utilizamos neste biossensor também um peptídeo extraído do tunicato marinho *Styela clava*, clavanina A (ClavA). Esta molécula apresenta ampla atividade antimicrobiana e propriedades catiônicas que permitem uma interação facilitada com bactérias gram-negativas devido a suas propriedades estruturais de membrana (Lee *et al.*, 1997). Desta forma, um componente versátil e inovador para o desenvolvimento de um novo biossensor.

Portanto visto a importância do diagnóstico precoce, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um biossensor capaz de identificar e diferenciar bactéria gram-negativa de gram-positivas através do uso da interação de nanotubos de carbono e clavA por meio da técnica de QCM.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

**Materiais** - Clorofórmio, cisteína (Cys), EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil), NHS(N-hidroxisuccinamida) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO. USA). A clavA foi cedido pelo Centro de Protômica de de Brasília (UnB). A água deionizada foi obtida através de um sistema de filtração Milipore (Billerica, MA, EUA).

**Linhagens bacterianas** – As bactérias a seguir foram obtidas da ATCC: *E. coli* (ATCC 25922) e *E. faecalis* (29212) em suspensão de  $3 \times 10^3$  à  $3 \times 10^7$  UFC/mL, de acordo com a escala de McFarland.

**Preparo da plataforma sensora** - Inicialmente, a superfície de ouro do cristal de quartzo foi lavada em clorofórmio e foi acoplado posteriormente na célula que constitui o QCM para realização das medidas. Em seguida, a Cys foi adicionada através de um sistema de fluxo de água à 2 ml/min para formação da camada automontada na superfície metálica do eletrodo (contido no cristal quartzo). Posteriormente, neste sistema, adicionamos uma solução de EDC:NHS (1:1 v/v) para ligar quimicamente os NTCs à camada de Cys. Finalmente, adicionamos a ClavA como elemento sensor para finalização da montagem da plataforma sensora (Figura 1).

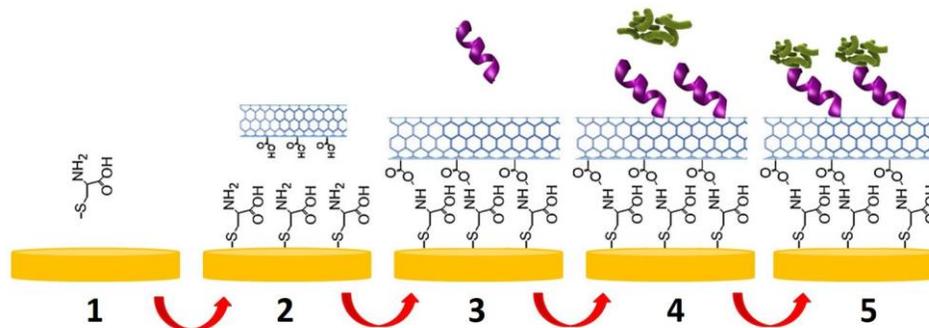


Figura 1 – Esquema de montagem da plataforma sensora Cys-EDC:NHS-NTCs-ClavA. 1) adsorção da Cys na superfície de ouro, 2) ativação da Cys e NTCs por EDC:NHS, 3) adsorção de ClavA, 4)

inserção das bactérias testadas e 5) interação da ClavA com as bactérias testadas.

### Análise Estatística

A análise de variância One-Way ANOVA foi utilizada para comparar a diferença estatística em relação aos valores de frequência encontrados em todos os grupos analisados: eletrodo limpo, Cys, EDC:NHS, NTCs e ClavA. A significância estatística foi considerada em valores com  $p < 0.05$ .

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica piezoelétrica compõe uma das metodologias mais utilizadas na área de estudo de biossensores. Além disso, esta técnica apresenta simplicidade, baixo custo e uma alta sensibilidade em relação às mudanças de massa que ocorrem na superfície do disco de quartzo. A figura 2 apresenta um sensorgrama que caracteriza toda a plataforma sensora, constituída por monocamadas automontadas, desde a aplicação da Cys até a adsorção da ClavA.

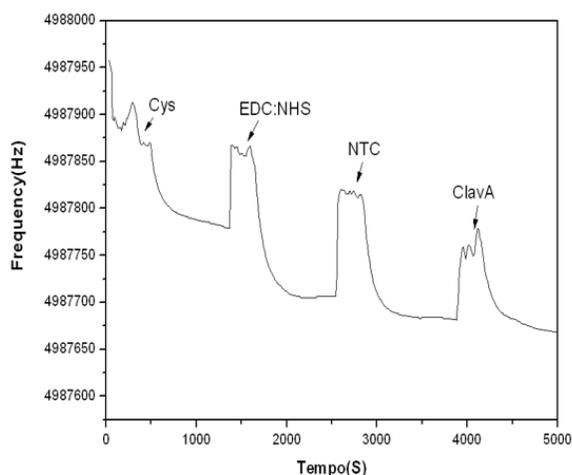


Figura 2 – Sensorgrama da frequência ressonante no disco de quartzo em função da adição de cada camada na plataforma sensora: Cys, EDC:NHS, NTC e ClavA.

Vale ressaltar que a redução da frequência oscilatória após a aplicação de cada monocamada em função do tempo foi possível observar que após desligar o fluxo de água a frequência apresenta uma estabilidade, mostrando que houve a deposição definitiva de massa na superfície do cristal.

A superfície metálica limpa apresentou um valor de 4.987.953 Hz. Após a adição da Cys, os valores diminuíram para 4.987.789 Hz ( $\Delta f = 172 \text{ Hz}$ ). A utilização da Cys foi útil devido à presença em sua cadeia lateral um grupo SH livre que apresenta grande afinidade com a circunferência de ouro na superfície do cristal de quartzo.

Em seguida, com a adição da solução de EDC:NHS a frequência diminuiu para 4.987.710 Hz.

Isso resultou numa diferença de 71.1 Hz em relação a camada de Cys. Esta solução permitiu a ativação dos grupos amina e grupos carboxílicos para permitir uma ligação covalente entre a Cys e os NTC. Com a adição dos NTCs a frequência oscilou para 4.987.685 Hz e  $\Delta f=24\text{Hz}$  em relação a cada anterior. Por último, com a adição da ClavA, por interação eletrostática aos NTCs, os padrões a frequência diminuíram em 15.5 Hz (4.987.670 Hz).

As médias das frequências oscilatórias apresentaram significância estatística com  $p<0.05$  em relação a análise de variância One-Way ANOVA entre todos os grupos analisados entre si: eletrodo limpo, Cys, EDC:NHS, NTCs e ClavA.

As figuras 3A e 3B apresentam um gráfico de pontos demonstrando a queda da frequência oscilatória em função das suspensões bacterianas aplicadas de *E. coli* e com a *E. faecalis* respectivamente nas seguintes concentrações:  $3 \times 10^3$ ,  $3 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^6$  e  $3 \times 10^7$  UFC/mL.

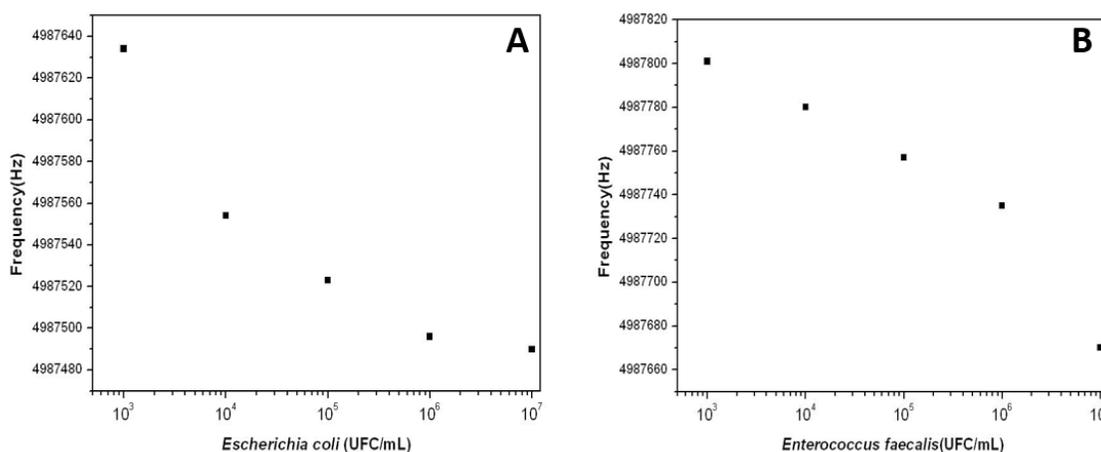


Figura 3 – Gráfico de frequências em função das suspensões bacterianas aplicadas na plataforma sensora: A) *E. coli*. B) *E. faecalis*.

Após a interação das bactérias com a plataforma nanoestruturada, na concentração inicial aplicada ( $1 \times 10^3$  UFC/mL), os valores de frequência foram bem distintas e apresentaram um  $\Delta f = 164\text{Hz}$  entre *E. coli* e *E. faecalis*. Estas mesmas diferenças foram percebidas em relação as outras concentrações na Tabela 1.

Tabela 1 – Frequências oscilatórias nas diferentes concentrações bacterianas testadas

Conc.	<i>E. coli</i> (Hz)	<i>E. faecalis</i> (Hz)	$\Delta f$ (Hz)
$10^3$	4.987.632±2,82	4.987.796,5±6,36	164
$10^4$	4.987.551±4,24	4.987.782,5±3,53	231,5
$10^5$	4.987.530±9,89	4.987.759,5±3,53	229,5
$10^6$	4.987.493±4,24	4.987.733,5± 2,12	240,5
$10^7$	4.897.480±7,07	4.987.673±0,10	90193,0

Estes resultados demonstraram que foi possível identificar e diferenciar as diferentes concentrações utilizadas bem como, diferenciar entre uma bactéria gram-positiva de uma gram-negativa. Além disso as diferenças entre as bactérias apresentaram significância estatística ( $p < 0.05$ ) na maioria das medidas. Destaca-se também que em  $10^7$  a diferença foi maior. Estes dados sugerem que a partir desta concentração, o sistema fique saturado tendo em vista que as outras concentrações utilizadas.

Os valores de frequência menores de *E. coli* em comparação com a *E. faecalis* deve-se a maior interação entre o peptídeo antimicrobiano e os componentes presentes nas bactérias gram-negativas. A *clavA* é um peptídeo antimicrobiano catiônico que interage mais fortemente com os lipídios que constituem a membrana externa, principalmente com os lipopolissacarídeos (LPS), presentes em grande quantidade em bactérias gram-negativas (MATSUZAKI *et al.*, 1997). Diferentemente das bactérias gram-positivas que apresentam uma camada fina de peptidoglicanos e uma parede celular contendo ácido teóico e lipotecóico. Este fator sugere a diferença significativa entre os valores observados entre a *E. coli* e a *E. faecalis*. A análise de variância demonstrou que as frequências oscilatórias foram estatisticamente significantes entre elas com  $p < 0.05$ .

É importante destacar também que o nosso sistema apresentou um limite de detecção de  $10^3$  UFC/mL, semelhante a outros sistemas sensores (MANNOR *et al.*, 2010; GAMELLA *et al.*, 2009).

#### 4. CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos foi possível concluir que as adsorções das camadas sobre a superfície metálica do cristal de quartzo foram bem-sucedidas, visto que houve uma diferença significativa em relação a diminuição da frequência oscilatória em cada camada e pela estabilidade após as modificações propostas em nossa plataforma sensora.

Além disso, foi possível concluir que o nosso biossensor apresentou sensibilidade e especificidade estatisticamente significantes. Isso reflete o potencial de nosso sistema como uma nova ferramenta para detecção e diferenciação entre bactérias gram-negativas de gram-positivas.

#### 5. REFERÊNCIAS

EGUÍLAZ, M; VILLALONGA, R; PINGARRÓN, J. M; FERREYRA, N. F E RIVAS, G. A. Functionalization of bamboo-like carbon nanotubes with 3-mercaptophenylboronic acid-modified gold nanoparticles for the development of a hybrid glucose enzyme electrochemical biosensor. 30 de março de 2015.

FERREIRA, E. S. DOS; SILVA, M. L. P. DA. Sistema eletrônico de precisão para a medida de frequências em micro-balanças de cristal de quartzo. pag 38 a 41. 28 de abril de 2010.

GAMELLA, M.; CAMPUZANO, S.; PARRADO, C.; REVIEJO, A.J.; PINGARRON, J.M. Microorganisms recognition and quantification by lectin adsorptive affinity impedance. Talanta 2009, 78, 1303–1309.

LASCHI, S; BULUKIN, E; PALCHETTI, I; CRISTEA, C AND MASCINI, M. Disposable electrodes modified with multi-wall carbon nanotubes for biosensor applications. 2007.



- LAUTENBACH, E; PATEL, J. B; BILKER, W. B; EDELSTEIN P. H AND FISHMAN, N. O. Extended-Spectrum b-Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Risk Factors for infection and impact of Resistance on Outcomes. 26 de março de 2001.
- LEE, IN H; CHO, Y AND LEHRER, R. I. Styelins, Broad-Spectrum Antimicrobial peptides from the Solitary Tunicate, *Styela clava*. 24 de abril de 1997.
- MANNOOR, MS; ZHANG, S; LINK, AJ; MCALPINE, MC. Electrical detection of pathogenic bacteria via immobilized antimicrobial peptides. PNAS 2010 107 (45) 19207-19212.
- MATSUZAKI, K; SUGISHITA, KI; HARADA, M; FUJII, N; MIYAJIMA, K. Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-Biomembranes*. 1997jul 5; 1327(1):119-30.
- POSSAN, A. L; MENTI, C; BELTRAMI, M; SANTOS, A. D; ROESCH-ELY, M; MISSELL, F. P. Effect of surface roughness on performance of magneto elastic biosensors for the detection of *Escherichia coli*. 2015.
- WANG Y, YE Z, YING Y. New Trends in Impedimetric Biosensors for the Detection of Foodborne Pathogenic Bacteria. *Sensors* 2012;12(3):3449-3471.

## 6. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, CAPES e FACEPE.



ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOTECNOLOGIA E NANOTECNOLOGIA EM SAÚDE – BN 3

## DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMAS NANOESTRUTURADAS PARA A BIODETECÇÃO DE SHISTOSOMA MANSONI

G.S. dos SANTOS<sup>1</sup>, R.G.S.C. CALDAS<sup>2</sup>, F.L de MELO<sup>3</sup>, C.A S de ANDRADE<sup>4</sup>, M.D.L de OLIVEIRA<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Graduação em Ciências Biológicas.

<sup>3</sup> Laboratório de Doenças Transmissíveis, Aggeu Magalhães Recife- PE, Brasil.

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Bioquímica.

E-mail para contato: giselless84@yahoo.com.br

**RESUMO** – *A esquistossomose é uma doença negligenciada, estreitamente relacionada com os baixos níveis de desenvolvimento social e um grave problema de saúde pública. Neste trabalho, foi desenvolvido um sistema de camadas auto-montadas de silano na superfície de um eletrodo de ouro e nanopartículas de ouro eletroquimicamente depositadas para a detecção do Schistosoma mansoni utilizando uma sonda tiolada de DNA de Schistosoma mansoni como elemento de bioreconhecimento. Técnicas eletroquímicas como a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e voltametria cíclica (VC) são ferramentas úteis 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 de DNA. A plataforma desenvolvida apresentou um limite de detecção de DNA de  $2.6 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ .*

*Palavras chave: Esquistossomose, eletrodeposição, genossensor.*

**ABSTRACT** – *Schistosomiasis is a neglected disease closely related to the low levels of social development and a serious public health problem. In this work, we developed a system based on self-assembled layer of silane compounds and gold nanoparticles deposited electrochemically on the gold electrode surface to detect Schistosoma mansoni using DNA thiolated probe as biorecognition element. Electrochemical techniques such as electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry (CV) are useful tools for the development of these devices. Based on the analysis of the results we found that the nanocomposite has retained the ability to establish a stable immobilization of DNA. The developed platform showed a DNA detection limit of  $2.6 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ .*

*Keywords: Schistosomiasis, electroplating, genossensor*



## 1. INTRODUÇÃO

A esquistossomose mansônica (EM) é uma parasitose causada pelo helminto *Schistosoma mansoni*, é considerada um problema de saúde pública (Sousa *et al.*, 2011). Sua confirmação diagnóstica é tomada principalmente pela análise de amostras fecais (Palmeira *et al.*, 2010). Testes diagnósticos, como ELISA, imunoenensaio de fluorescência indireta e radioimunoensaio são também utilizados. Mas, geralmente necessitam de longos períodos para a análise e apresentam baixa sensibilidade (Wu *et al.*, 2006). Desta forma, há a necessidade do desenvolvimento de métodos sensíveis, rápidos e seletivos para a detecção do *Schistosoma*. Os recentes avanços em biossensores baseados na hibridização de ácidos nucleicos têm levado ao desenvolvimento da tecnologia em genossensores para as análises da sequência de DNA (Xu *et al.*, 2011). Especificamente, os biossensores baseados em hibridização eletroquímica, demonstram grande promessa para a identificação de patógenos, detecção de mutação, e determinação de sequência genômica. Os genossensores são dispositivos eletroanalíticos que incorporam uma camada genética imobilizada na superfície de um transdutor, como elemento de reconhecimento, e convertem sinais de interação entre bases nitrogenadas específicas, em sinais analíticos mensuráveis (Campuzano *et al.*, 2014).

As nanopartículas de ouro (AuNPs) são usadas para imobilizar sondas de DNA tiolada na superfície do eletrodo, devido às suas propriedades, tais como reter a atividade biológica, condução eficiente do sinal eletroquímico entre transdutor e a interface o que permite amplificar a resposta elétrica. O organossilano 3-mercaptopropiltrimetoxissilano (MPTS) oferece uma monocamada auto-montada em ouro e age de forma eficiente entre a superfície do eletrodo e filmes derivados de sol-gel (Bonanni *et al.*, 2011). A determinação eletroquímica tem atraído bastante atenção, pois os métodos eletroquímicos têm as vantagens de baixo custo, alta sensibilidade e ser de fácil manuseio desta forma, a voltametria Cíclica (VC) e a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foram utilizadas como ferramentas para os estudos da caracterização da interação Sonda-genoma. Como objetivo, este trabalho visa à síntese eletroquímica de nanopartículas sobre a superfície do eletrodo para produção de um genossensor eletroquímico para detecção do *S. mansoni*.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

3-mercaptopropiltrimetoxissilano (MPTS) e Ácido Cloroaurico ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) foram adquiridos da Sigma Chemical (St. Louis, MO, EUA) e o ferro- ferrocianeto de potássio foi adquirido da VETEC (Brasil). As soluções de DNA foram preparadas em tampão de fosfato, pH 7.4, todos os outros reagentes e solventes foram de grau analítico. As nanopartículas de ouro foram diretamente depositadas sobre o eletrodo de trabalho previamente modificado com o MPTS. Foi utilizada uma faixa de potencial de -0,2 a 1,3 V vs Ag / AgCl ciclado 30 vezes a uma velocidade de varredura de 50 mV.s<sup>-1</sup>, numa solução a 1mM de  $\text{HAuCl}_4$  contendo 0,5M de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

Os experimentos de EIE e VC foram realizados utilizando um potenciostato / galvanostato PGSTAT 128N (Autolab, Holanda) em uma célula convencional de três eletrodos sendo um de trabalho, um auxiliar e um de referência. O eletrodo de trabalho utilizado foi o de ouro, o de platina como contra eletrodo e o de referência foi o Ag/AgCl saturado com KCl. Foi utilizada uma solução de 10 mM de ferro-ferricianeto de potássio como par redox. As análises voltamétricas foram analisadas a um potencial de -0,2 a 0,7 V. Os espectros de impedância foram registrados na faixa de frequências de 100 mHz a 100\_kHz

A modificação da superfície do eletrodo teve a seguinte sequência: adição de 4  $\mu\text{L}$  de MPTS por 1 minuto, em seguida as nanopartículas foram eletrodepositadas. Posteriormente, incubou-se a sonda *schistosoma* por 10 min e por fim o sistema sensor foi exposto a diferentes concentrações do DNA genômico. As análises de adsorção ao eletrodo foram realizadas após cada etapa de modificação da superfície.

### 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 voltametria cíclica das etapas de montagem do genossensor onde podemos observar que antes da modificação as correntes de pico redox encontram-se bem definidas. Depois da modificação do eletrodo com o MPTS houve uma diminuição desses picos comprovando a formação da camada de MPTS na superfície do eletrodo dificultando assim a transferência de elétrons entre a superfície do ouro e a solução redox. O grupamento tiol expostos pelo MPTS é importante para a posterior ancoragem das nanopartículas de ouro (AuNPs) via eletrodeposição. Seguida da eletrodeposição das AuNPs houve um acréscimo nas correntes de pico. Este comportamento indica que as AuNPs foram eficientemente ancoradas pelo grupamento tiol expostos pelo MPTS levando ao aumento da área de superfície eletroativa do eletrodo. Com a imobilização da sonda de DNA tiolada, ocorreu nova diminuição da corrente, em decorrência à repulsão eletrostática entre o par redox e a sonda de DNA na superfície do eletrodo. Por fim após adição de amostra com DNA complementar, nova redução foi observada indicando a ocorrência do processo de hibridação.

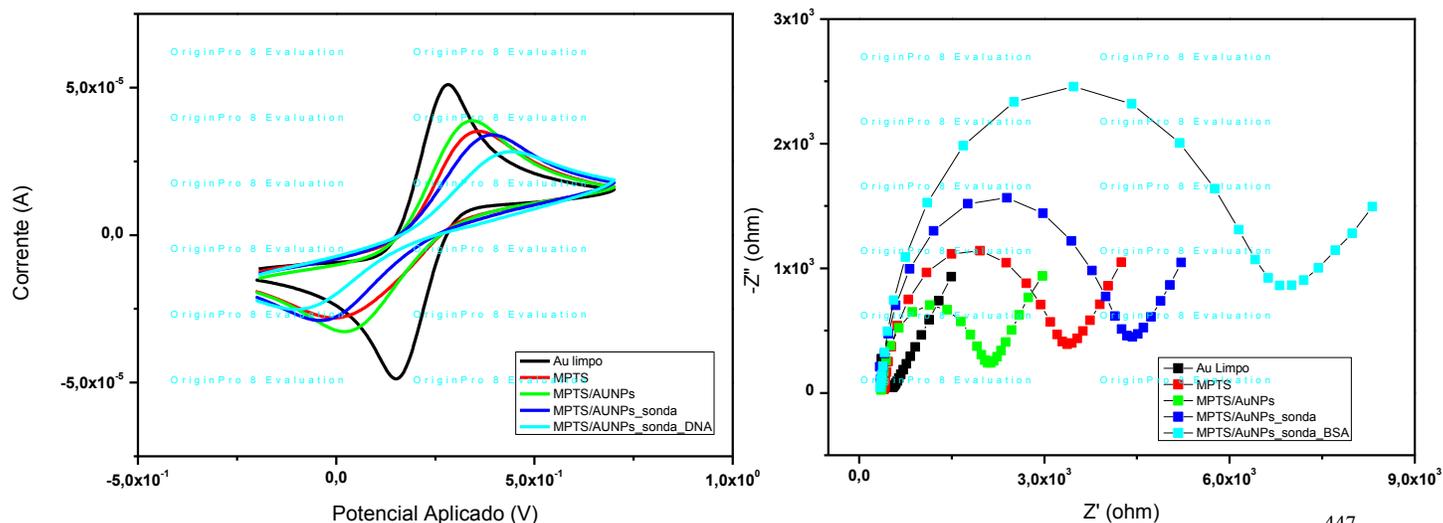


Figura 1. a) – Voltamograma cíclico das etapas de montagem do genossensor em meio ferroferricianeto de potássio pH 7.4 entre -0,2 e 0,7 V. b) – Diagramas de Nyquist das etapas de montagem do genossensor em ferroferricianeto de potássio.

Todas as etapas de construção do genossensor foram também caracterizadas por EIE. Desta forma, o diâmetro do semicírculo no diagrama de Nyquist representa a resistência à transferência de carga ( $R_{tc}$ ), que controla a cinética de transferência eletrônica do processo redox na superfície do eletrodo (WANG et al., 2011; KANG et al., 2009). A Figura 1b apresenta os diagramas de Nyquist das etapas de desenvolvimento do genossensor.

Com o objetivo de analisar a sensibilidade do sensor desenvolvido a plataforma sensora foi exposta a amostras contendo DNA de *Schistosoma* em diferentes concentrações. A Figura 2 mostra o comportamento do sistema sensor frente a diferentes concentrações de DNA genômico de *S. mansoni*.

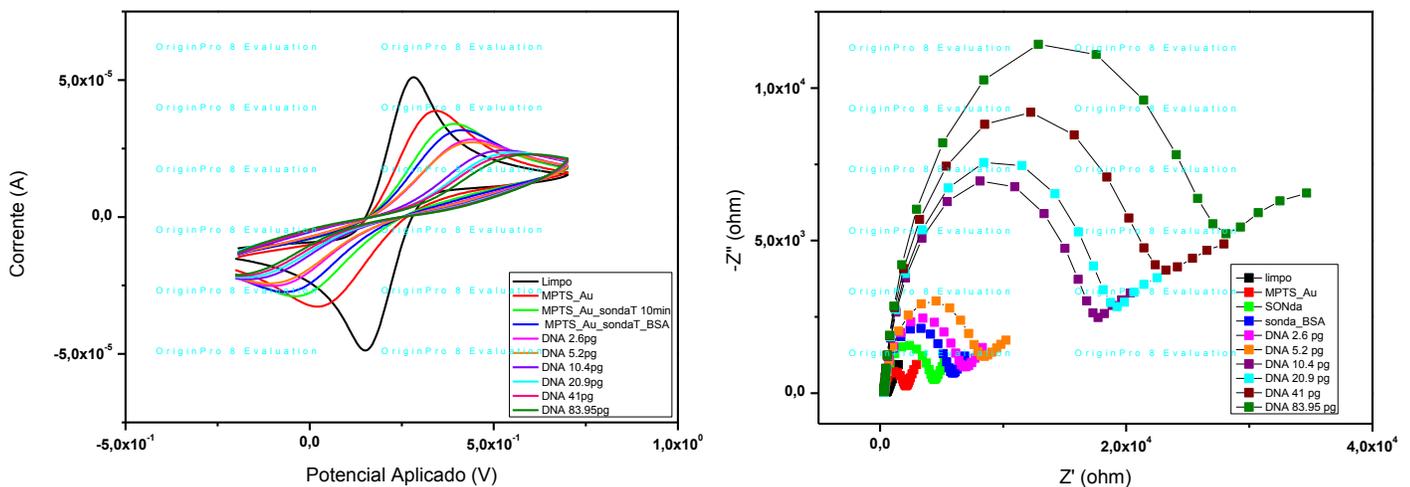


Figura 2 – Resposta voltamétrica e impedimétrica do genossensor frente a diferentes concentrações de DNA de *Schistosoma mansoni*

## 4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que o sistema desenvolvido manteve a capacidade de estabelecer uma imobilização estável da sonda específica para a o *S mansoni*, sendo assim a plataforma sensora obtida mostrou-se eficiente na detecção do genoma do *Schistosoma* frente a diferentes concentrações do DNA, desta forma, o genossensor desenvolvido mostra-se como uma ferramenta importante para a construção de um método diagnóstico mais sensível, rápido e com baixo para a esquistossomose.



## 5. REFERÊNCIAS

- BONANNI, A.; PUMERA, M.; MIYAHARA, Y. Influence of gold nanoparticle size (2–50 nm) upon its electrochemical behavior: an electrochemical impedance spectroscopic and voltammetric study *Phys. Chem. Chem. Phys.* v. 13, p. 4980–4986, 2011.
- CAMPUZANO, S., PEDRERO, M., PINGARRÓN, J.M. Electrochemical genosensors for the detection of cancer-related miRNAs. *Anal Bioanal Chem.* v. 406, p. 27-33, 2014.
- KANG, X.; WANG, J.; WU, H.; AKSAY, I. A.; LIU, J.; LIN, Y. Glucose oxidase-graphene-chitosan modified electrode for direct electrochemistry and glucose sensing. *Biosens. Bioelectron.* v. 25, p. 901, 2009.
- 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.* v. 156, p. 141, 2008.
- PALMEIRA, D.C.C.; CARVALHO, A.G.; RODRIGUES, K.; COUTO, J.L.A. Prevalência da infecção pelo *Schistosoma mansoni* em dois municípios do Estado de Alagoas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v. 43(3), p. 313-317, 2010.
- SOUZA, F.P.C.; VITORINO, R.R.; COSTA, A.P. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. *Rev Bras Clin Med.* v. 9(4), p. 300-7, 2011.
- WANG, K.; LIU, Q.; DAI, L.; YAN, J.; JU, C.; QIU, B.; WU, X. A highly sensitive and rapid organophosphate biosensor based on enhancement of CdS-decorated graphene nanocomposite. *Anal. Chim. Acta.* v. 695, p. 84, 2011.
- WU, W.; HE, Q.; JIANG, C. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies, *Nanoscale Res. Lett.* v. 3, p. 397–415, 2008.
- XU, Z.; HU, C.; HU, G. Layer-by-layer self-assembly of multilayer films based on humic acid, *Thin Solid Films.* v. 519, p. 4324–4328, 2011.

## 6. AGRADECIMENTOS

CAPES, FACEPE, CNPq e Rede Nanobiotecnologia-CAPES.

ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOTECNOLOGIA E NANOTECNOLOGIA EM SAÚDE – BN 4

## A ELEVAÇÃO DOS NÍVEIS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO DESENCADEADA POR ANTIFÚNGICOS E SUA CONTRIBUIÇÃO TERAPÊUTICA

E. R. de SOUZA<sup>1,2</sup>, D. B. G. do NASCIMENTO<sup>1</sup>, R. R. D. ALVES<sup>1</sup>, L. N. de ARAÚJO NETO<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro Universitário Maurício de Nassau, Departamento de Saúde

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Antibióticos

E-mail para contato: edsonrubhens@hotmail.com.br

**RESUMO** – *As espécies reativas de oxigênio (EROs) estão presentes em inúmeros reações biológicas fundamentais, entretanto quando o sistema enzimático não é capaz de controlar os níveis dessas moléculas é gerado o estresse oxidativo. Esse estresse tem papel importante na defesa contra infecções fúngicas e a estimulação por fármacos já direcionados ao tratamento micológico pode contribuir na eficácia do esquema terapêutico. Este trabalho tem o objetivo de verificar a formação de EROs, induzida por antifúngicos, bem como sua relação com o sucesso terapêutico. Foi realizado uma revisão de literatura contemplando apenas artigos científicos publicados entre 2012 e 2017. Foram identificados cinco antifúngicos estimuladores da produção de EROs, e a investigação deste efeito, bem como a influencia que exerce sobre o poder antifúngico foi descrito. O aumento nos níveis de EROs leva desequilíbrio redox intracelular do fungo e é fundamental para ação terapêutica.*

*Palavras chave: produção EROs; estresse oxidativo fúngico; atividade antifúngica.*

**ABSTRACT** – *Reactive oxygen species are present in many fundamental biological reactions, but when the enzyme system is not able to control the levels of these molecules is generated oxidative stress. This stress plays an important role in defense against fungal infections and stimulation by drugs already directed the mycological treatment may contribute to the efficacy of the treatment regimen. This work aims to verify the formation of ROS induced by antifungals, as well as their relation to therapeutic success. a literature review was conducted considering only scientific articles published between 2012 and 2017. We identified five antifungal stimulators of ROS production, and the investigation of this effect and the influence it exerts on the antifungal power was described. The increased levels of ROS leads intracellular redox imbalance of the fungus and is essential to therapeutic action.*

*Keywords: ROS production; oxidative stress fungal; antifungal activity*



## 1. INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas têm importância epidemiológica significativa considerando o número de casos em todo o globo, as problemáticas que estão envolvidas no tratamento e o fato de incidirem de forma invasiva sobre grupos de pacientes imunodeprimidos, podendo resultar na ineficácia da terapia ou até no óbito destes indivíduos (Pemán e Quindós, 2016). Historicamente, espécies do gênero *Candida* são os agentes etiológicos mais comuns de infecções fúngicas invasivas (IFI), sendo a principal *C. albicans*, entretanto nos últimos anos foram relatados vários casos de IFI causados por outros fungos como *Cryptococcus* spp., *Trichosporon* spp., *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. entre outros, estes apontados como emergentes (Oliveira *et al.*, 2016; Pemán e Quindós, 2016).

O organismo possui vários mecanismos de defesa contra patógenos e neles estão envolvidos os compostos chamados espécies reativas de oxigênio (EROs), que incluem radicais livres ou substâncias oxigenadas de alto potencial reativo como os peróxidos ( $O_2^-$ ), hidróxido ( $^{\cdot}OH$ ), carbonato ( $CO_3^-$ ), hidroperóxido ( $HO_2$ ), óxido nítrico (NO), nitrito ( $NO_2^-$ ), entre outros. As EROs estão presentes em inúmeros reações biológicas fundamentais como a respiração celular e defesa imunológica, entretanto quando o sistema enzimático não é capaz de controlar os níveis dessas moléculas é gerado o estresse oxidativo, desequilíbrio redox (Graves, 2012).

O estresse oxidativo tem papel importante na defesa contra infecções fúngicas e a estimulação por fármacos já direcionados ao tratamento micológico pode contribuir na eficácia do esquema terapêutico (Mesa-Arango *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2016). Dessa forma, com necessidade de estudar terapias antifúngicas mais eficientes, este trabalho tem o objetivo de verificar a formação de EROs, induzidos por antifúngicos usuais e também por moléculas em fase pré-clínica, levando ao desequilíbrio redox do fungo, bem como sua relação com o sucesso terapêutico.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo baseou-se em uma revisão de literatura cuja pesquisa bibliográfica foi realizada mediante a busca eletrônica de artigos científicos indexados nas bases dados ScienceDirect, National Library of Medicine (Medline) e National Center for Biotechnology Information - U.S. National Library of Medicine (PubMed). Após consulta aos Descritores em Ciências da Saúde (DeCS), identificaram-se as palavras-chaves: *ROS production*, *oxidative stress*, *antifungal effect* e *antifungal activity*. A pesquisa considerou os artigos publicados entre os anos de 2012 a 2016 (também foram utilizados artigos com publicação prevista para 2017 já divulgados eletronicamente em 2016), incluindo-se apenas publicações no idioma inglês.

Foram lidos previamente os resumos dos artigos identificados nas bases de dados citadas acima, de forma a reconhecer os métodos propostos, utilizados e discutidos por cada autor, para avaliar abrangência. Quando a leitura dos resumos não era suficiente para o entendimento do contexto, acessava-se o artigo completo e consultava-se o texto na íntegra para uma boa compreensão e interpretação. Utilizaram-se as referências que se identificaram com o objetivo do estudo.

Uma vez escolhidos os artigos, iniciou-se a análise e síntese dos mesmos com uma leitura exploratória para reconhecimento dos artigos que interessavam à pesquisa de forma geral; uma leitura seletiva para selecionar os que seriam usados no estudo; uma leitura analítica dos selecionados e por último a leitura interpretativa com o intuito de conferir um significado mais amplo aos resultados escolhidos para uma melhor elaboração textual.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificados cinco antifúngicos com ação estimuladora da produção de EROs, sendo quatro já utilizados na clínica e um em desenvolvimento. Os antifúngicos estão descritos na tabela 1, bem como a classe, situação e as respectivas referências de suas publicações. Nos estudos, a maioria faz uso de espécies do gênero *Cândida* para os ensaios, isso pode ser explicado pelo fato deste gênero ser o responsável pela maioria das infecções fúngicas de alto risco em todo planeta (Pemán e Quindós, 2016).

Tabela 1 – Antifúngicos que induzem a elevação dos níveis de EROs em espécies fúngicas

ANTIFÚNGICO*	CLASSE	SITUAÇÃO	REFERÊNCIA
Anfotericina B	Polienos	Uso clínico	Mesa-Arango <i>et al.</i> , 2014
Casposfungina	Lipo-hexapeptídeos	Uso clínico	Yu <i>et al.</i> , 2016
Fluconazol	Triazóis	Uso clínico	Silva <i>et al.</i> , 2013; Mahl <i>et al.</i> , 2015
Miconazol	Imidazóis	Uso clínico	Cremer <i>et al.</i> , 2015; Cremer <i>et al.</i> , 2016
Ebselen	Organoselênios	Pré-clínico	Thangamani <i>et al.</i> , 2017

\*Os antifúngicos descritos são aqueles utilizados nos ensaios publicados, porém isso não exclui a possibilidade do potencial estimulador de EROs se estender aos demais fármacos da classe.

Acredita-se que o mecanismo de ação da Anfotericina B (AnfB) seja a clássica ligação com o ergosterol e consequente formação de poros na membrana plasmática (Gray *et al.*, 2012), entretanto a ação da AnfB foi observada levemente menor em cepas de *C. tropicalis*, isoladas de pacientes submetidos a tratamento antifúngico, que não possuíam quantidade de ergosterol detectável, essa depleção era compensada pela existência exacerbada de outros esteróis, sugerindo que a ligação com ergosterol não seja exclusivamente o mecanismo da AnfB (Forasteiro *et al.*, 2013). Na procura por esclarecimento quanto aos efeitos causados pela AnfB, Mesa-Arango e colaboradores (2014) analisaram o acúmulo de EROs em diversas *Candida* spp. quando submetidas a esse polieno. Através de sondas fluorescentes e fazendo uso de dihidrofluoresceína, que produz fluorescência após reagir com EROs, foi notado o alto acúmulo de EROs pela maioria das cepas. Nos fungos resistentes a AnfB o acúmulo foi significativamente menor, confirmando que a AnfB induz o estresse oxidativo e que ele contribui no seu poder fungicida.



A caspofungina (Casp) é um inibidor da síntese  $\beta$ -1,3-*D*-glucano, um componente essencial da parede celular dos fungos, bastante utilizado na clínica contra diversas IFI. Yu e colaboradores (2016) analisaram a estimulação da produção de EROs pela Casp em estirpes de *C. albicans* utilizando captadores de EROs e, assim, perceberam que houve alta diminuição da ação antifúngica. No ensaio, foram utilizadas espécies selvagens e mutantes e todas se demonstraram sensíveis a Casp em concentrações entre 40  $\mu$ g/ml e 0,1  $\mu$ g/ml, entretanto quando o ensaio foi realizado com adição de 5 mM de *N*-acetil-L-cisteína ou de vitamina C o crescimento observado foi próximo da estabilidade vista no controle. No estudo, o estresse causado pela Casp provocou aumento na síntese proteica, mau funcionamento do retículo endoplasmático e oxidação da RE oxirredutase 1, como consequência, notou-se a elevação da formação de EROs. Estes resultados indicam que as EROs tem ação importante no potencial letal da Casp contra células fúngicas.

O fluconazol (Fluc), triazol muito utilizado na profilaxia e tratamento de inúmeras infecções fúngicas (Musiol e Kowalczyk, 2012), também teve seu potencial indutor da produção de EROs relatada na literatura (Silva *et al.*, 2013). No estudo as leveduras *C. tropicalis* submetidas ao Fluc foram tratadas com substâncias que em contato com EROs emitem fluorescência e assim sua concentração pôde ser quantificada por citometria de fluxo, cepas sensíveis e resistentes ao Fluc fizeram parte da análise. Como resultado as células sensíveis ao Fluc apresentaram aproximadamente 20% de EROs a mais em comparação com o controle, o que não foi observado nas células resistentes que demonstraram quantidade de EROs muito similar ao controle (Silva *et al.*, 2013). Em contra partida outro estudo com cepas de *C. glabrata* sensíveis e resistentes ao Fluc revelou que os níveis de EROs foram elevados tanto em fungos resistentes quanto aos sensíveis, esse fato pode está ligado ao tipo do mecanismo de resistência dos fungos de cada estudo (Mahl *et al.*, 2015).

Entre a classe dos imidazóis os estudos recentes investigaram o poder que o miconazol (Micz) tem sobre biofilmes de *C. albicans* para influenciar o acúmulo de EROs, utilizando 2,7-diacetato de diclorodihidrofluoresceína, para emissão de fluorescência quando em contato com EROs, foi possível confirmar essa capacidade (Cremer *et al.*, 2015). Em outra análise, Cremer e colaboradores (2016) avaliaram a estimulação da produção específica de superóxido e o consequente aumento da ação fungicida frente a biofilmes de *C. albicans* (cepas mutantes e selvagens) por Micz e combinações com sinvastatina (reductor do colesterol com ação antifúngica), piritiona de zinco (usado no tratamento da dermatite seborreica), antimicina A, *m*-Cl-CCP e azida de sódio (inibidores da fosforilação oxidativa). Em comparação com o controle, a estimulação pelo Micz isolado foi observada em todas as estirpes, entretanto branda, em contra partida essa estimulação foi significativa em todas as combinações exceto quando combinado com piritiona de zinco, cujo resultado foi semelhante ao expresso pelo Micz isolado.

O potencial de indução do estresse oxidativo em fungos também é investigado em antifúngicos que ainda estão em fase de desenvolvimento. Thangamani e colaboradores (2017) estudaram a ação do Ebselen (composto com ação antimicótica recentemente investigada) contra 20 cepas de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*) e 17 cepas de *Cryptococcus* (*C. neoformans* e *C. gatti*) e observaram resultados de potente ação fungicida entre 0,5 a 2  $\mu$ g/ml para as leveduras de *Candida* spp. e 0,5 a 1  $\mu$ g/ml para as leveduras de *Cryptococcus* spp. No mesmo estudo, foi estimado o nível de EROs produzidos pelos fungos expostos ao Ebselen, nesta avaliação os níveis de EROs registrados



foram significativamente altos em comparação com controle. Este resultado foi atribuído à redução que o Ebselen exercer sobre os níveis de glutatona, um metabolito essencial para proteger as leveduras do estresse oxidativo, confirmado pelo ensaio da glutatona também presente na publicação.

#### 4. CONCLUSÃO

Embora a quantidade de estudo publicados que avaliem o poder estimulador de EROs por antifúngicos em micoses patogênicas seja relativamente pequeno, já se pode concluir que essa estimulação é significativa e exerce influência fundamental no objetivo terapêutico. Dessa forma, mais estudos que tenham a finalidade encontrar esse potencial em outros fármacos, e que possam avaliar frente a outros gêneros de fungos, são importantes para entender a relação que as EROs têm com o sucesso do tratamento, bem como, podem contribuir no desenvolvimento de novas moléculas que possam somar ao arsenal médico-micológico.

#### 5. REFERÊNCIAS

- CREMER, K.; DE BRUCKER, K.; STAES, I.; PEETERS, A.; VAN DEN DRIESSCHE, F.; COENYE, T.; THEVISSSEN, K. Stimulation of superoxide production increases fungicidal action of miconazole against *Candida albicans* biofilms. *Sci. Rep.*, v. 6, p. 27463, 2016.
- CREMER, K.; LANCKACKER, E.; COOLS, T. L.; BAX, M.; DE BRUCKER, K.; COS, P.; THEVISSSEN, K. Artemisinins, new miconazole potentiators resulting in increased activity against *Candida albicans* biofilms. *Ant. Age. Chem.*, v. 59, n. 1, p. 421-426, 2015.
- FORASTIERO, A.; MESA-ARANGO, A. C.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; ALCAZAR-FUOLI, L.; BERNAL-MARTINEZ, L.; PELAEZ, T.; ZARAGOZA, O. *Candida tropicalis* antifungal cross-resistance is related to different azole target (Erg11p) modifications. *Ant. Agn. Che.*, v. 57, n. 10, p. 4769-4781, 2013.
- GRAVES, D. B. The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology. *App. Phy. J.*, v. 45, n. 26, p. 263001, 2012.
- GRAY, K. C.; PALACIOS, D. S.; DAILEY, I.; ENDO, M. M.; UNO, B. E.; WILCOCK, B. C.; BURKE, M. D. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v 109, n. 7, p. 2234-2239, 2012.
- MAHL, C. D.; BEHLING, C. S.; HACKENHAAR, F. S.; E SILVA, M. N. D. C.; PUTTI, J.; SALOMON, T. B.; BENFATO, M. S. Induction of ROS generation by fluconazole in *Candida glabrata*: activation of antioxidant enzymes and oxidative DNA damage. *Diag. Micr. Inf. Dis.*, v. 82, n. 3, p. 203-208, 2015.
- MESA-ARANGO, A. C.; TREVIJANO-CONTADOR, N.; ROMÁN, E.; SÁNCHEZ-FRESNEDA, R.; CASAS, C.; HERRERO, E.; ZARAGOZA, O. The production of reactive oxygen species is a universal action mechanism of amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug. *Ant. Agn. Chem.*, v. 58, n. 11, p. 6627-6638. 2014.
- MUSIOL, R.; KOWALCZYK, W. Azole Antimycotics-A Highway to New Drugs or a Dead End?. *Cur. Med. Chem.*, v. 19, n. 9, p. 1378-1388. 2012.
- OLIVEIRA, T. G. L. D.; CAMBUIM, I. I. F. N.; MENDES, G. P.; MOTTA, C. M. D. S. Study of the



incidence of fungi isolated from samples of bronchoalveolar lavage, transbronchial biopsy and sputum. *Rev. Ciê. Sau.*, v. 6, n. 1, p. 14-24, 2016.

PEMÁN, J.; QUINDÓS, G. Aspectos actuales de las enfermedades invasoras causadas por *Candida* y otros hongos levaduriformes. *Rev. Ibero. Mic.*, v. 33, n. 3, p. 133-139, 2016

SILVA, C. R.; DE ANDRADE NETO, J. B.; SIDRIM, J. J. C.; ÂNGELO, M. R. F.; MAGALHÃES, H. I. F.; CAVALCANTI, B. C.; GRANGEIRO, T. B. Synergistic effects of amiodarone and fluconazole on *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. *Ant. Age. Chem.*, v. 57, n. 4, p. 1691-1700. 2013.

YU, Q.; ZHANG, B.; LI, J.; ZHANG, B.; WANG, H.; LI, M. Endoplasmic reticulum-derived reactive oxygen species (ROS) is involved in toxicity of cell wall stress to *Candida albicans*. *F. Rad. Bio. Med.*, v. 99, p. 572-583, 2016.



ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOTECNOLOGIA E NANOTECNOLOGIA EM SAÚDE – BN 5

## PLANEJAMENTO FATORIAL PARA EXTRAÇÃO DE ENZIMA FIBRINOLÍTICA DE *MUCOR SUBTILISSIMUS* UCP1262 MEDIANTE SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS (PEG/FOSFATO)

T. P. NASCIMENTO<sup>1</sup>, J. M. SILVA<sup>2</sup>, A. E. SALES<sup>2</sup>, V. M. OLIVEIRA<sup>2</sup>, R. M. P. B. COSTA<sup>2</sup>, G. M. CAMPOS-TAKAKI<sup>3</sup>, C. S. PORTO<sup>4</sup>, T. S. PORTO<sup>5</sup>, A. L. F. PORTO<sup>2</sup> e A. CONVERTI<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

<sup>2</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal

<sup>3</sup> Universidade Católica de Pernambuco, Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais

<sup>4</sup> Universidade Federal de Alagoas, Campos Arapiraca, Penedo

<sup>5</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns

<sup>6</sup> Universidade de Genova, Departamento de Engenharia Civil, Química e Ambiental

E-mail para contato: thiago\_pajeu@hotmail.com

**RESUMO** – *O acúmulo de fibrina nos vasos sanguíneos pode dificultar o fluxo sanguíneo e promover o desenvolvimento de trombos, para cuja degradação pode-se recorrer a enzimas fibrinolíticas. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi selecionar as condições de extração de enzima fibrinolítica produzida por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 mediante Sistema de Duas Fases Aquosas (S DFA) de PEG/fosfato. O extrato bruto contendo a enzima fibrinolítica obtida por fermentação do farelo de trigo por este microrganismo foi tratado em S DFA de acordo com um planejamento fatorial 2<sup>4</sup> através do qual foi possível avaliar a influência da concentração e da massa molar do PEG, da concentração de fosfato de sódio e do pH no coeficiente de partição, na recuperação e no fator de purificação da enzima. O sistema que proporcionou as melhores condições de purificação foi aquele constituído por PEG 8000 g/mol, concentração de PEG de 17,5% (m/m), concentração de fosfato de 15,0% (m/m) e pH 6. Nessas condições foi obtido um fator de purificação de 2,48, um coeficiente de partição de 3,13 e uma recuperação da enzima fibrinolítica de 122,08% na fase superior do sistema, ou seja, a fase rica em PEG. Os resultados apresentados sugerem a utilização do sistema de duas fases aquosas de PEG/fosfato como método de extração e pré-purificação de enzimas fibrinolíticas produzidas por fungos.*

*Palavras chaves: protease, trombose, fungos.*



**ABSTRACT:** *Accumulation of fibrin in the blood vessels usually results in interruption of blood flow promoting the development of thrombosis. Fibrinolytic enzymes are thus necessary for the thrombus degradation. In this sense, it seems crucial to study the extraction conditions of fibrinolytic enzyme produced by *Mucor subtilissimus* UCP 1262 using Aqueous two-phase systems. The fraction of crude extract containing the fibrinolytic enzyme produced by the fermentation of wheat bran by *M. subtilissimus* was used in a factorial design (24). The experimental design was used to evaluate the influence of variables: PEG molar mass and concentration, phosphate concentration and the influence of pH on the enzyme purification. Three-variable responses were assessed (partition coefficient, enzyme recovery and purification factor). The achieved results were: partition coefficient ranging between 0.5 and 3.13. The system that provided the best purification conditions was: PEG 8000 (g / mol) and concentration of 17.5% (w / w), 15% phosphate concentration (w/w) and pH 6. In these conditions was obtained (2.48) purification factor and recovery of the fibrinolytic enzyme (122.08%) in the top phase (PEG rich phase). The results suggest that using aqueous two-phase system (PEG / phosphate) as the extraction method may promote the pre-purification of fibrinolytic enzymes produced by fungi.*

*Key-words:* Protease, thromboses, fungi.

## 1. INTRODUÇÃO (FONTE 14)

Proteases fibrinolíticas são enzimas capazes de degradar a fibrina, principal componente protéico dos coágulos sanguíneos formados a partir da ativação do fibrinogênio pela trombina (EC 3.4.21.5) (Jin *et al.*, 2013). O bloqueio causado pelo acúmulo de fibrina nos vasos sanguíneos pode ocasionar a trombose, dificultar o fluxo sanguíneo, levando a graves conseqüências. Nesse sentido tem-se buscado novas fontes de enzimas fibrinolíticas que sejam mais eficazes, seguras, economicamente viáveis (Naveena *et al.*, 2012) e principalmente do tipo *plasma-like* (que degradam diretamente a fibrina, sem precisão da ativação do plasminogênio em plasmina), ou seja, fármacos trombolíticos que atuem apenas no local necessário e exerçam menos efeitos colaterais em comparação aos fármacos existentes no mercado (Uesugi *et al.*, 2010; Naveena *et al.*, 2012).

Dentre as possíveis fontes de produção dessas enzimas, os fungos filamentosos têm-se mostrado, nos últimos anos, uma boa alternativa, por excretarem extracelularmente, o que facilita a etapa no processo de recuperação, a partir do caldo de fermentação, e por não necessitarem de etapas de rompimentos celulares, o que torna mais fácil a sua recuperação, e o processo em larga escala (Wonganu *et al.*, 2008).

Como as enzimas de interesse farmacêutico necessitam de um alto grau de pureza e especificidade para evitar reações imunológicas e é estável em condições fisiológicas (Mussatto *et al.*, 2007), o desenvolvimento de bioprocessos eficientes para a recuperação e purificação dessas enzimas representa uma das principais preocupações para a indústria biotecnológica (Yegin *et al.*, 2012). Nesse sentido, o Sistema de Duas Fases Aquosas vem sendo utilizado como um bom método alternativo para a pré-purificação, sobretudo de biomoléculas, sendo amplamente

usado para a biosseparação de enzimas e proteínas graças a seu baixo custo em relação a outros processos de separação (Jara & Pilosof, 2011; Elbert, D.L., 2011). Com isso, o objetivo deste trabalho foi estudar as condições ótimas e os parâmetros para extração de uma protease fibrinolítica produzida por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 utilizando sistema de duas fases aquosas (PEG/Fosfato).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

A seleção de *Mucor subtilissimus* UCP1262, das condições para a produção da enzima fibrinolítica e de seu processo de extração foi feita de acordo com os estudos de Nascimento *et al.* (2015). A atividade fibrinolítica foi determinada utilizando o método de Wang *et al.* (2011) e o conteúdo de proteína total de acordo com o método de Bradford (1976). Para a preparação do Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA) foram utilizados tubos cônicos graduados de 15 mL com massas iguais de fosfato de sódio e soluções de polietilenoglicol (PEG) com diferentes concentrações, de acordo com o planejamento fatorial descrito na Tabela 1.

Tabela 1- Níveis das variáveis do planejamento fatorial completo ( $2^4$ ) utilizados na extração por SDFA (PEG/fosfato) da enzima fibrinolítica produzida por *Mucor subtilissimus* UCP1262

Adicionaram-se água e 2,0 g de extrato fermentado até um peso final de 10 g. Após as adições

Variáveis	Níveis		
	Superior(+1)	Central (0)	Inferior (-1)
Massa molar do PEG (g/mol)	1500	4000	8000
Concentração do PEG % (m/m)	12,5	15	17,5
Concentração do Fosfato % (m/m)	10,0	12,5	15,0
pH	6	7	8

de todos os componentes do SDFA, os tubos foram agitados durante 1,0 min, e as fases superiores e inferiores foram separadas por sedimentação após 60 min. Ambas as fases tiveram seus volumes medidos e foram utilizadas para determinação das atividades bioquímicas. O coeficiente de partição da enzima fibrinolítica ( $K_{AF}$ ) foi definido como a razão das atividades fibrinolíticas ( $AF$ ), expressas

em U/mL, da fase superior (PEG), sobre a inferior (SAL). O rendimento de atividade fibrinolítica ( $Y_{AF}$ ) foi determinado como a razão entre  $AF$  na fase superior ou inferior, multiplicado pelo volume da respectiva fase ( $V_{PEG/SAL}$ ), e  $AF$  do extrato bruto multiplicado pelo respectivo volume e expresso em porcentagem. O fator de purificação ( $FP$ ) na fase superior ou inferior foi calculado como a razão entre a atividade específica respectiva ( $AE_{PEG}$  ou  $AE_{SAL}$ ) e aquela do extrato bruto ( $AE_{BRUTO}$ ), todas expressas em U/mg:

$$K_{AF} = \frac{AF_{PEG}}{AF_{SAL}} \quad Y_{AF} = \left( \frac{AF_{PEG/SAL} \cdot V_{PEG/SAL}}{AF_{BRUTO} \cdot V_{BRUTO}} \right) \times 100 \quad FP = \frac{AE_{PEG/SAL}}{AE_{BRUTO}}$$

A influência das variáveis independentes, ou seja, a massa molar do PEG ( $M_{PEG}$ ), a concentração do PEG ( $C_{PEG}$ ), a concentração de fosfato de sódio ( $C_{phos}$ ) e o pH, sobre as respostas, ou seja,  $K_{AF}$ ,  $Y_{AF}$  e  $FP$ , foi investigada de acordo com um planejamento fatorial  $2^4$  com quatro repetições no ponto central para possibilitar o cálculo do erro experimental.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade fibrinolítica da enzima presente no extrato fermentado após 72 horas de fermentação foi de 166,62 U/mL apresentando um alto potencial de degradação da fibrina, como pode ser mostrado na Figura 1.

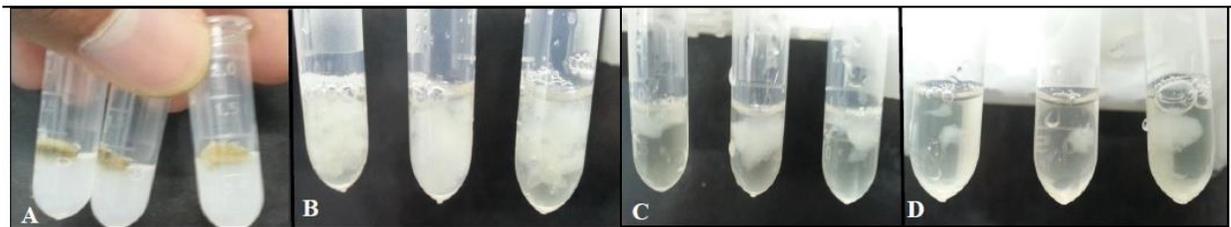


Figura 1 - Degradação do coagulo de fibrina pelo extrato bruto contendo a protease fibrinolítica produzida por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 mediante fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo como substrato, após 72 horas de fermentação. Tempo de extração (min): A = 0, B = 20, C = 40, D = 60.

Apartir desse extrato bruto contendo a enzima fibrinolítica foi realizado o planejamento fatorial, para estudar as variáveis que mais influenciam no SDEFA. Essas variáveis independentes, nomeadamente a massa molar ( $M_{PEG}$ ) e a concentração ( $C_{PEG}$ ) do PEG, a concentração de fosfato ( $C_{phos}$ ) e o pH, foram estudadas e avaliadas quanto aos seus efeitos sobre o coeficiente de partição ( $K_{FA}$ ), o rendimento ( $Y_{AF}$ ) e o fator de purificação da enzima ( $FP$ ).

A atividade fibrinolítica da enzima extraída de acordo com o planejamento fatorial variou de 25,93 a 88,44 U/mL. Quanto ao  $K_{FA}$ , este variou entre 0,5 e 3,13. Em particular, um valor de  $K_{FA} > 1$  indica uma migração da molécula para a fase superior (geralmente a fase rica em PEG), enquanto

$K_{FA} < 1$  uma migração da molécula preferencialmente para a fase inferior (geralmente a fase rica em sal). Os maiores valores de coeficiente de partição foram obtidos nos ensaios que continham a maior concentração de fosfato (15%). Diferentemente dos estudos realizados por Sales *et al.* (2013) e Nascimento *et al.* (2016), não houve nenhuma preferência de migração da enzima fibrinolítica para a fase rica em sal, mas sim para a fase rica em PEG, corroborando os resultados de Ashipala & He (2008) que usaram um SDFA de PEG/sulfato de sódio para a extração de uma enzima fibrinolítica produzida por *Bacillus subtilis* DC-2.

Observando a Figura 2A, a concentração de fosfato foi a variável que mais influenciou positivamente na partição da enzima fibrinolítica para a fase rica em PEG, seguida pela concentração e pela massa molar do PEG. Embora o pH tenha sido a segunda variável que mais influenciou na partição, ele teve uma influência negativa, o que significa que quanto maior  $C_{phos}$  e menor o pH, maior a partição da enzima para a fase rica em PEG. Yang *et al.* (2008) sugeriram que este efeito da alta concentração de fosfato sobre a partição da enzima por SDFA é devido às cargas das proteínas presentes, fenômeno conhecido como “salting out”, onde a enzima é particionada para a outra fase devido a um elevado teor de sal na fase inferior. A interação positiva  $M_{PEG} \times C_{phos}$  entre os seus efeitos indica que o aumento de  $C_{phos}$  juntamente com o aumento simultâneo da  $M_{PEG}$ , favorece o rendimento da enzima fibrinolítica.

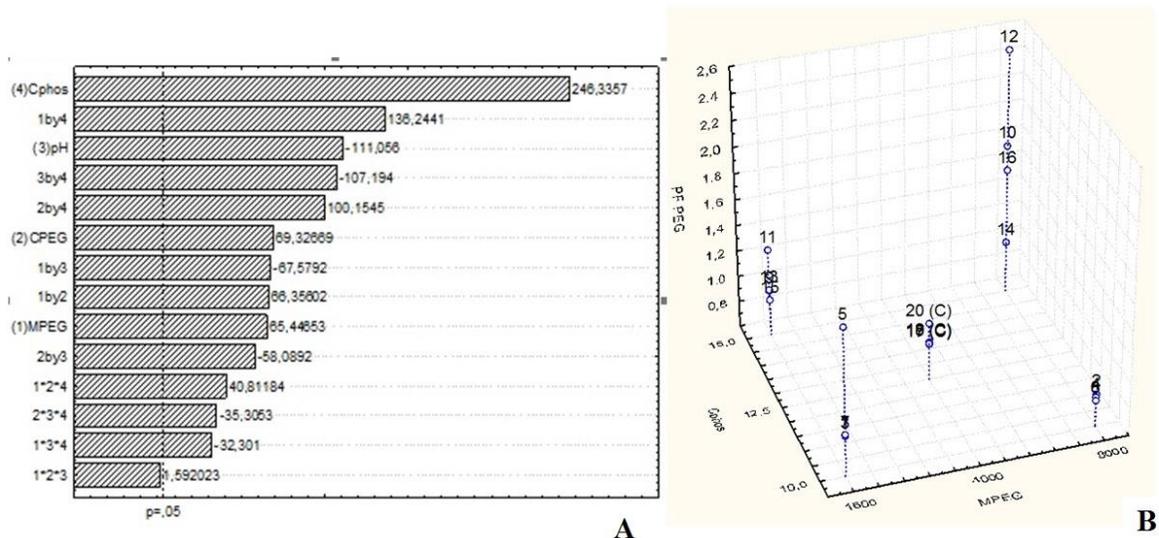


Figura 2 – A) Gráfico de Pareto dos efeitos principais tendo como variável de resposta o coeficiente de partição da enzima fibrinolítica, utilizando 4 variáveis em dois níveis. (1)  $M_{PEG}$  - massa molar do PEG, (2)  $C_{PEG}$  - concentração do PEG, (3) pH - valor de pH, (4)  $C_{phos}$  - concentração de fosfato. B) Representação gráfica tridimensional da relação entre as respostas: fator de purificação ( $FP$ ), concentração de fosfato ( $C_{phos}$ ) e massa molar do PEG ( $M_{PEG}$ ) na fase superior do sistema.

A influência do pH pode induzir mudanças conformacionais na estrutura das proteínas, causando mudanças em seus comportamentos de separação. Em condições extremas de pH é possível que ocorra a desnaturação das proteínas (Albertson *et al.*, 1986), fato que não ocorreu no presente

estudo. Como pode ser observado na Figura 2B, o ensaio 12 utilizando 17,5% de PEG 8000 g/mol, 15,0% de  $C_{\text{phos}}$  e pH 6 foi o que garantiu melhor extração da enzima fibrinolítica na fase rica em PEG com valores de  $Y_{AF}$  e  $FP$  de 122,08 % e 2,48 respectivamente. Valores de  $Y_{AF}$  acima de 100% são frequentemente relatados para extração de enzimas por SDFA (Maciel *et al.*, 2014; Nascimento *et al.*, 2016), como provável resultado da eliminação de contaminantes e inibidores da atividade enzimática, no decorrer da extração pelo SDFA (Mayerhoff *et al.*, 2004).

Esses valores de  $Y_{AF}$  e  $FP$  são superiores aos relatados por Mukherjee *et al.* (2008) que, mesmo utilizando métodos cromatográficos (Sephadex G-50) para a purificação de uma enzima fibrinolítica extraída do veneno de *Daboia russelli russelli*, obtiveram  $Y_{AF}$  de 2,8 e  $FP$  de 2,2. Agrebi *et al.* (2009) também utilizando cromatografia obtiveram  $Y_{AF}$  e  $FP$  de 14,3% e 1,83 respectivamente. Estes resultados demonstram que o SDFA utilizando PEG/sal vem sendo uma boa alternativa para processos de extração de biomoléculas, com resultados muito satisfatórios a um custo muito baixo (Grilo *et al.*, 2016). Após a extração utilizando a melhor condição do planejamento do SDFA, a atividade fibrinolítica específica passou de 46,93 U/mg no extrato bruto para 116,40 U/mg.

#### 4. CONCLUSÃO

O SDFA mostrou-se eficiente para a extração de uma enzima fibrinolítica a partir de caldo fermentado de *Mucor subtilissimus* UCP 1262. A enzima particionou preferencialmente para a fase rica em PEG (fase superior). As condições ótimas de purificação mostraram ser pH 6, PEG 8000 g/mol na concentração de 17,5% (m/m) e concentração de fosfato de 15,0% (m/m). Sendo assim, a utilização de SDFA apresenta-se como uma boa alternativa para a extração de enzimas fibrinolíticas, com propriedades interessantes para a indústria farmacêutica. Estudos futuros serão realizados para que essas enzimas possam ser utilizadas em aplicações terapêuticas.

#### 5. REFERÊNCIAS

- AGREBI, R.; HADDAR, A., HMIDET, N., JELLOULI, K., MANNI, L., NASRI, M. BSF1 fibrinolytic enzyme from a marine bacterium *Bacillus subtilis* A26: Purification, biochemical and molecular characterization. *Process Biochem.* v.44, p.1252–1259, 2009.
- ALBERTSSON, P. A. Partition of cell particles and macromolecules. Wiley-Interscience, New York, p.346, 1986.
- ASHIPALA, O.K.; HE, Q. Optimization of fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* DC-2 in aqueous two-phase system (poly-ethylene glycol4000 and sodium sulfate), *Bioresour. Technol.* v. 99, p. 4112–4119, 2008.
- 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.
- ELBERT, D. L. Liquid-liquid two-phase systems for the production of porous hydrogels and hydrogel microspheres for biomedical applications: A tutorial review. *Acta Biomat.* v. 7, p. 31–56, 2011.
- JARA, F., PILOSOFF, A.M.R. Partitioning of a-lactalbumin and b-lactoglobulin in whey protein concentrate/hydroxypropylmethylcellulose aqueous two-phase systems. *Food Hydrocolloid.* v. 25, p.

374-380, 2011.

JIN, M.; CHEN, W.; HUANG, W.; RONG, L.; GAO, Z. Preparation of pegylated lumbrokinase and an evaluation of its thrombolytic activity both in vitro and in vivo. *Acta Pharm Sinic B*. v.3, p. 123–129, 2013.

MACIEL, M.H.C.; OTTONI, C. A.; HERCULANO, P. N.; PORTO, T. S. PORTO, A.L.F.; SANTOS, C.; LIMA, N.; MOREIRA, K.A.; SOUZA-MOTTA. C. Purification of polygalacturonases produced by *Aspergillus niger* using an aqueous two-phase system. *Fluid Phase Equilibr*. v. 371, p. 125–130, 2014.

MAYERHOFF, Z.D.V.L.; ROBERTO, I.C.; FRANCO, T.T. Purification of xylose reductase from *Candida mogii* in aqueous two-phase systems. *Biochem Eng J*. v.18, p.217-223, 2004.

MUKHERJEE, ASHIS K. Characterization of a novel pro-coagulant metalloprotease (RVBCMP) possessing a-fibrinogenase and tissue haemorrhagic activity from venom of *Daboia russelli russelli* (Russell's viper): Evidence of distinct coagulant and haemorrhagic sites in RVBCMP. *Toxicon*. v. 51, p. 923–933, 2008.

MUSSATTO, S.I., FERNANDES, M., MILAGRES, A.M.F. Enzimas poderosa ferramenta na indústria. BIOTECNOLOGIA. *Rev Ciên Hoje*.v.41, n.242, p.27 – 33, 2007.

NASCIMENTO, T.P., SALES, A.E., PORTO, C.S., BRANDÃO, R.M.P., CAMPOS-TAKAKI, G.M., TEIXEIRA, J.A.C., PORTO, T.S., PORTO, A.L.F. Production and Characterization of New Fibrinolytic Protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 in Solid-State Fermentation. *Adv Enz Res*, v. 3, p. 81-91, 2015.

NASCIMENTO, T.P.; SALES, A.E.; PORTO, C.S.; BRANDÃO, R.M.P.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; TEIXEIRA, J.A.C.; PORTO, T.S.; PORTO, A.L.F.; CONVERTI, A. Purification of a fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP1262 by aqueous two-phase systems (PEG/sulfate). *J Chrom B*. v. 1025, p. 16–24, 2016.

NAVEENA, B.; SAKTHISELVAN, P.; ELAIYARAJU, P.; PARTHA, N. Ultrasound induced production of thrombinase by marine actinomycetes: Kinetic and optimization studies. *Biochem Eng J*. v. 61, p. 34–42, 2012.

SALES, A.E.; SOUZA, F.A.S.D.; TEIXEIRA, J.A.; PORTO, T.S.; PORTO, A.L.F. Integrated process production and extraction of the fibrinolytic protease from *Bacillus* sp. UFPEDA 485, *Appl. Biochem. Biotechnol*. v. 170, p. 1676–1688, 2013.

UESUGI, Y.; KAWATA, H.J.O.J.; SAITO, Y.; TABATA, Y. An ultrasound-responsive nano delivery system of tissue-type plasminogen activator for thrombolytic therapy. *J Control Release*. v. 147, p. 269–277, 2010.

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, 2011.

YANG, S.; HUANG, Z.; JIANG, Z.; LI, L. Partition and purification of a thermostable xylanase produced by *Paecilomyces thermophila* in solid-state fermentation using aqueous two-phase systems. *Process Biochem*. v. 43, p. 56 – 61, 2008.

YEGIN, S.; GOKSUNGUR, Y.; FERNANDEZ-LAHOURE, M. Purification, structural characterization, and technological properties of an aspartyl proteinase from submerged cultures of *Mucor mucedo* DSM 809. *Food Chem*, v. 133, n.4, p.1312–1319, 2012.



## **6. AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Os autores agradecem também o projeto aprovado na rede RENNORFUN (MCT/CNPq/MMA/MEC/CAPES/FNDCT, Ação Transversal/FAPs, No.47/2010, Sistema Nacional de Pesquisa em Biodiversidade - SISBIOTA/Brasil).



ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOTECNOLOGIA E NANOTECNOLOGIA EM SAÚDE – BN 10

## NANOBIOSENSOR BASEADO EM POLIANILINA E CLAVANINA A PARA IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS

A. G. SILVA JUNIOR<sup>1</sup>, M.D.L. OLIVEIRA<sup>2</sup>, I.S. OLIVEIRA<sup>3</sup>, O. L. FRANCO<sup>4</sup>, C.A.S ANDRADE<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, UFPE, Recife/PE, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica, UFPE, Recife/PE, Brasil.

<sup>3</sup> Centro Acadêmico de Vitória, UFPE, Recife/PE, Brasil.

<sup>4</sup> Centro de Análise Proteômicas e Bioquímicas de Brasília, UCB, Brasília/DF, Brasil.

E-mail para contato: albertogaldino16@gmail.com

**RESUMO** – Diante de diversas técnicas de detecção presuntiva de microrganismos, o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos têm se destacado devido às suas características como sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e reduzido tempo para as bioanálises. Biossensores são constituídos de uma molécula biológica ativa como elemento sensor e de um transdutor físico-químico, o qual converterá a detecção bioquímica para um sinal detectável. Neste trabalho foi utilizado a clavanina A (ClavA), que é um peptídeo antimicrobiano que atua nas membranas de microrganismos devido a estrutura catiônica anfipática como estratégia para detecção de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. ClavA foi imobilizada em filme de polianilina depositado eletroquimicamente e glutaraldeído foi utilizado como agente ativador dos grupos amino funcionais. As técnicas de voltametria cíclica e impedância eletroquímica foram utilizadas para a avaliação do processo de adsorção de PANi, ClavA e o processo de biointeração. A plataforma biossensora obtida, PANi-ClavA proporcionou a detecção eletroquímica de duas diferentes bactérias Gram positivas, presentes em muitos casos de infecção hospitalar, o qual foram obtidos resultados satisfatórios por meio da avaliação voltamétrica e impedimétrica do sistema.

**Palavras-chave:** Biossensor, voltametria, impedância, clavanina, bactéria.

**ABSTRACT:** With several presumptive detection of microorganisms techniques, the development of electrochemical biosensors have been highlighted due to its characteristics such as sensitivity, specificity and reproducibility, in addition to the short response time. Biosensors are formed by an active biological molecule as a sensor element and a physicochemical transducer, which converts the biochemical detection for a detectable signal. In this study, we used the clavanin A (ClavA), which is an antimicrobial peptide that acts in the membranes of microorganisms due to the



*amphiphatic cationic structure as strategy to detect Staphylococcus aureus and Streptococcus pyogenes. ClavA was immobilized on electrodeposited polyaniline film and glutaraldehyde was used as amine activation agent. Cyclic voltammetry and electrochemical impedance were used to evaluate the adsorption process of PANi, ClavA and biointeraction process. The biosensor platform aimed an effective electrochemical detection of two different Gram positive bacteria, present in many cases of hospital infection. The proposed biosensor showed satisfactory voltammetric and impedimetric results.*

*Keywords: Biosensor, voltammetry, impedance, clavanin, bacteria.*

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo o Ministério da Saúde (MS), na Portaria nº 2.616 de 12/05/1998, a infecção hospitalar (IH) tem como definição a infecção adquirida após a admissão do paciente na unidade hospitalar e que se manifesta durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares (Ministério da Saúde, 1998). Infecções que ocorrem mais de 48 horas após a admissão são geralmente consideradas nosocomiais (Garner *et al.*, 1988). Muitas destas infecções têm diversos microrganismos como agentes responsáveis, dentre eles, bactérias Gram positivas, Gram negativas e diversas espécies de fungos.

As bactérias Gram positivas, como as do gênero *Staphylococcus* e *Streptococcus* tem recebido elevada atenção devido aos diferentes tipos de infecções que ocasionam, dentre eles o impetigo, fascite necrosante, febre reumática, endocardite, síndrome do choque tóxico, entre outros exemplos (Seshadri e Sethuraman, 2016). Existem diversos meios de detecção presuntiva para essas bactérias, nos quais o crescimento em meios de cultura líquidos e sólidos, o uso da técnica ELISA e técnicas moleculares tem destaque. No entanto, tais meios podem apresentar diversos vieses devido ao tempo de crescimento do microrganismo no meio de cultura entre 24-72 horas, problemas de reações cruzadas nos métodos enzimáticos e o alto custo dos equipamentos e de reagentes dos testes moleculares.

Biossensores eletroquímicos constituem-se uma alternativa sensível e rápida para detecção desses microrganismos. São constituídos de um elemento sensor biológico ativo, que pode variar de: anticorpos, enzimas, fragmentos de DNA, proteínas e células, o qual será responsável pela especificidade ao analito, o qual nesse presente trabalho foi utilizado o peptídeo antimicrobiano Clavanina A (ClavA), cujo uso já vem sendo trabalhado no campo de biossensores (Andrade *et al.*, 2015). Também possuem um transdutor físico-químico, que converterá a detecção bioquímica para um sinal elétrico detectável para ser lido em um princípio de detecção impedimétrico, por exemplo (Turner, 2013).

O glutaraldeído (Glut), em função de suas propriedades bifuncionais em decorrência de sua estrutura (Oliveira e Vieira, 2006), foi empregado na reticulação dos grupamentos amina presentes na superfície livre da polianilina (Pani), o qual em meio a diversos tipos de polímeros condutores, ela

apresenta diversas propriedades eletroquímicas e ópticas, além de uma excelente condutividade elétrica, associadas à estabilidade química em condições ambientais e facilidade de síntese (Dhand *et al.*, 2011). No presente trabalho, foi utilizada a técnica da eletrodeposição, levando à polimerização de monômeros de anilina. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo a avaliação da plataforma nanoestruturada formada por Pani-ClavA, frente à diferentes concentrações de *S. aureus* e *S. pyogenes*, por meio da voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

**Materiais** – Anilina, HCl 0,2 mM, glutaraldeído 2,5% foram obtidos pela Sigma Chemical Co. (St Louis, USA). O ferri ( $K_3[Fe(CN)_6]$ ) e ferrocianeto de potássio ( $K_4[Fe(CN)_6]$ ) foram obtidos pela VETEC (Brasil) e utilizados como par redox. A Clavanina A foi obtida pela Peptide 2.0 (EUA), utilizando a técnica de fase sólida com o N-9-fluorenilmetiloxicarbonila (Fmoc) e purificado por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). As bactérias Gram positivas do estudo foram retiradas de uma suspensão que variava de  $3 \times 10^3$  a  $3 \times 10^7$  UFC/mL, de acordo com a escala de McFarland.

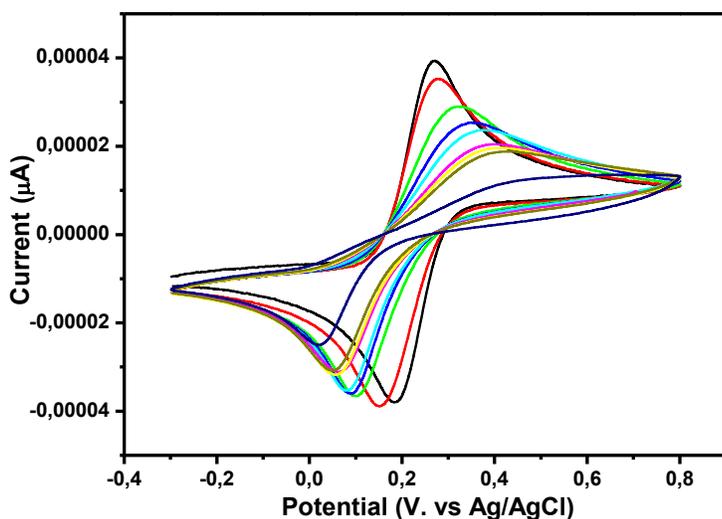
**Preparo do sistema biossensível nanoestruturado** – Inicialmente, o eletrodo de trabalho com superfície de ouro foi limpo através de polimento em lixa polidora contendo alumina ( $Al_2O_3$ ). A modificação de superfície do eletrodo se deu inicialmente por meio da Pani, o qual formou um filme polimérico em toda superfície de ouro do eletrodo através da eletrodeposição, realizada utilizando uma solução de anilina em HCl 0,2 mM aplicando-se potencial entre 0,8 e -0,3 V ciclado por três vezes por meio de VC. Após a formação desse filme, foi utilizado o Glut a 2,5% como agente ligante entre a Pani e o peptídeo ClavA, finalizando assim o sistema biossensor.

**Medidas eletroquímicas** - As análises de VC e EIE foram realizadas por meio de um potenciostato/galvanostato  $\mu$ AUTOLAB (Metrohm, Holanda) em uma célula eletroquímica contendo três eletrodos imersos em 20 mL de 10 mM ferro-ferricianeto de potássio,  $K_4[Fe(CN)_6]^{4-}/K_3[Fe(CN)_6]^{3-}$  [1:1] em tampão fosfato salina (PBS, pH 7.4), a qual atua como sonda redox. Eletrodos de platina e de disco de ouro ( $\phi = 2$  mm) foram usados como contra-eletrodo e eletrodo de trabalho, respectivamente, tendo como eletrodo de referência Ag/AgCl (saturado em KCl 3 M). A voltametria cíclica (VC) foi realizada com um potencial de varredura entre 0,8 e -0,3 V a uma taxa de varredura de 50 mV/s. Os espectros de impedância (EIE) foram

registrados numa faixa de frequência de 100 mHz a 100 kHz em uma amplitude do potencial de onda senoidal aplicado de 10 mV.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A VC (Fig. 1a e 1b) é uma técnica



utilizada em estudos bioeletroquímicos por caracterizar processos analíticos interfaciais (Tanimoto e Ichimura, 2013). Desta forma, a VC é considerada uma ferramenta tecnológica para o desenvolvimento de biossensores. A EIE (Fig. 2a e 2b) teve como objetivo analisar a resistência elétrica do sistema em desenvolvimento e avaliar sua superfície e propriedades elétricas.

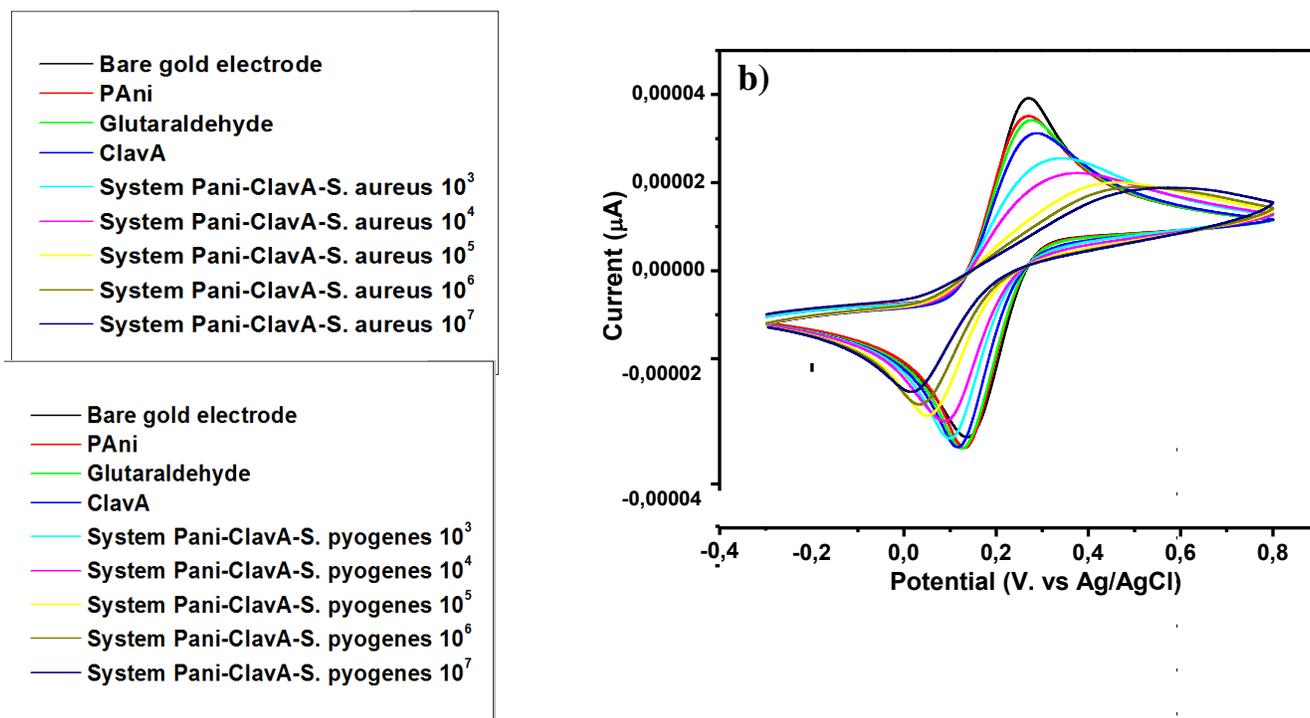


Figura 1 - Voltamograma cíclico do processo de montagem do sistema Pani-ClavA frente à diferentes concentrações de *S. aureus* (a) e *S. pyogenes* (b) de entre 10<sup>3</sup> a 10<sup>7</sup> UFC/mL, de acordo com a escala de McFarland.

Os voltamogramas cíclicos correspondentes às etapas da montagem da plataforma biossensora nanoestruturada, bem como sua resposta frente às diferentes concentrações das bactérias do estudo, com os picos catódicos (ipc) e anódicos (ipa) bem definidos são apresentados na Fig. 1a e 1b. Uma diminuição na resposta amperométrica foi observada após a deposição da Pani no eletrodo, o qual apresenta em sua superfície livre diversos grupamentos amina passíveis de modificação via Glut. Pani foi adsorvida no eletrodo durante o tempo de três minutos, e após eletrodeposição foi observado uma queda da resposta amperométrica do sistema. Em adição, a Figura 1a e 1b, revelaram um adicional decremento das ipa e ipc após imobilização de ClavA. Embora os mecanismos antibacterianos de ClavA não sejam totalmente claros, estudos anteriores indicam que a atração eletrostática é o pré-requisito da ligação de peptídeos antimicrobianos catiônicos seletivos da membrana bacteriana (Li *et al.*, 2014).

O sistema Pani-ClavA foi submetido a diferentes concentrações de suspensão bacteriana de *S. aureus* e *S. pyogenes* em PBS de pH 7. Pode-se observar uma redução contínua das áreas dos voltamogramas cíclicos, sendo obtida diminuição dos picos catódicos e anódicos, evidenciando assim a sensibilidade do sistema sensor. As paredes celulares de bactérias gram-positivas têm uma camada de peptidoglicano mais espessa e ácidos teicóico, apresentando uma carga negativa em sua superfície, agindo de modo a interagir com a ClavA eletronegativamente carregada (Beveridge, 1999).

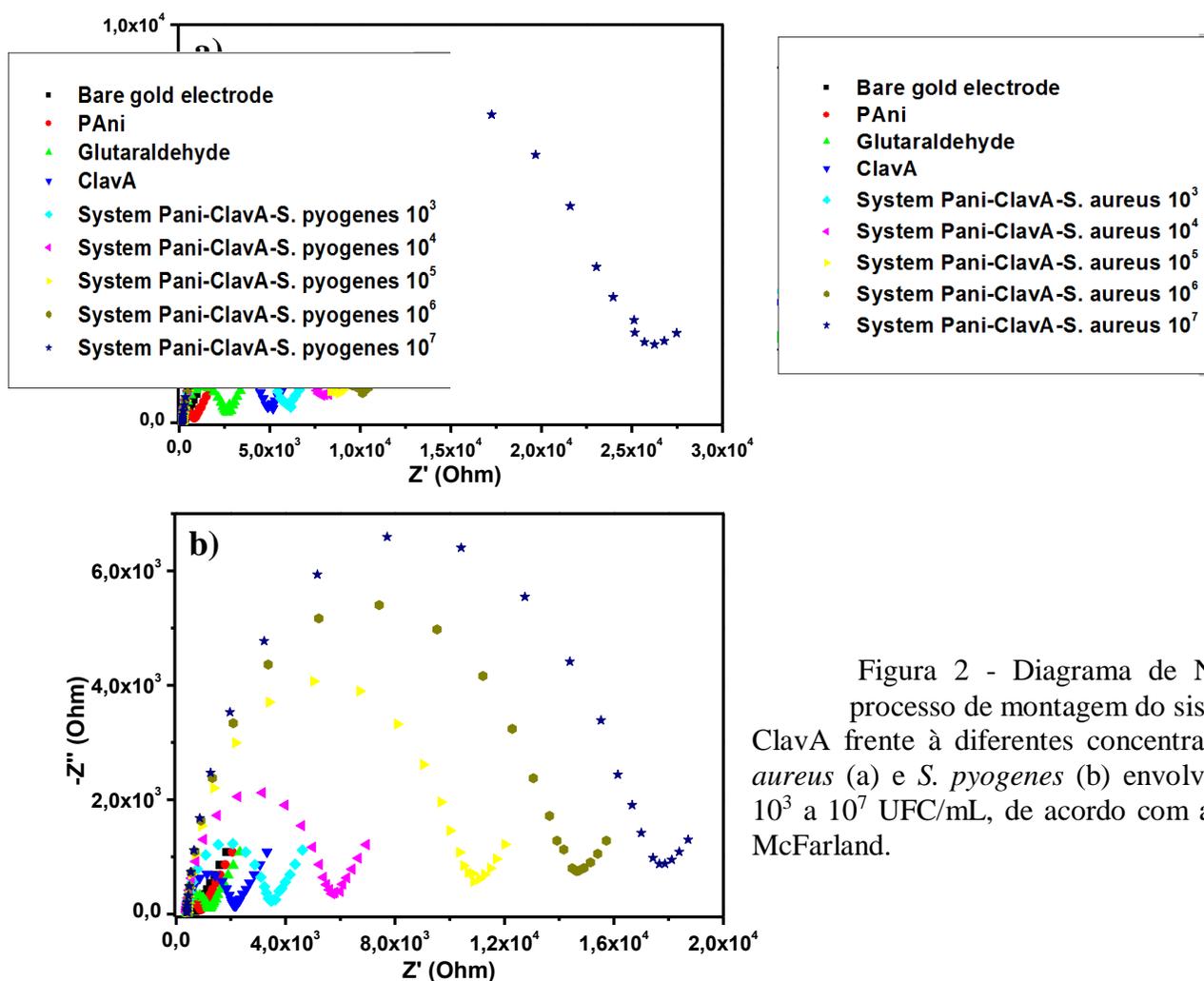


Figura 2 - Diagrama de Nyquist do processo de montagem do sistema Pani-ClavA frente às diferentes concentrações de *S. aureus* (a) e *S. pyogenes* (b) envolvendo faixa  $10^3$  a  $10^7$  UFC/mL, de acordo com a escala de McFarland.

Em relação às respostas da EIE por meio do Diagrama de Nyquist, pode-se observar que os resultados estão de acordo com os dados de VC para as etapas de montagem da plataforma biossensora, bem como a detecção frente às diferentes concentrações de bactérias (Fig. 2a e 2b). A caracterização eletroquímica da superfície do eletrodo de ouro limpo demonstrou um aumento da resposta impedimétrica. O semicírculo de Cole-Cole é composto por duas regiões bem definidas em altas e baixas frequências, que correspondem aos processos de transferência e difusão limitada de

elétrons, respectivamente (Cole e Cole, 1941).

A resposta impedimétrica da ClavA apresentou maior resistência da interface à transferência de elétrons em relação às etapas anteriores da montagem do sistema sensor, demonstrando um amplo semicírculo, indicando que a camada adsorvida diminuiu a transferência de elétrons na superfície eletroquímica, concluindo-se assim, a formação adequada do sistema Pani-ClavA (Cole e Cole, 1941). Quando os microrganismos são reconhecidos pela ClavA, a ligação ocorrerá por meio de interações eletrostáticas. Esta observação suporta a hipótese de que a interação inicial dos PAMs que são  $\alpha$ -hélice com as membranas dos microrganismos alvo ocorre através de atração eletrostática de aminoácidos carregados positivamente dos PAMs com os fosfolipídios carregados negativamente na membrana bacteriana (Matsuzaki, 1997).

A detecção das bactérias por meio da EIE também foi efetiva, demonstrando excelente sensibilidade com o aumento subsequente dos semicírculos após a adição de cada diferente concentração da suspensão bacteriana de *S. aureus* (Fig. 2a) e *S. pyogenes* (Fig. 2b).

#### 4. CONCLUSÃO

A plataforma biossensora nanoestruturada formada por Pani-ClavA mostrou-se estável e sensível frente as diferentes concentrações das bactérias alvo do estudo, o qual foram avaliados por meio da VC e EIE, indicando o presente biossensor como uma alternativa excelente de biodispositivo rápido e eficiente para detecção de microrganismos de interesse clínico.

#### 5. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, César AS *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.
- BEVERIDGE, Terry J. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. **Journal of bacteriology**, v. 181, n. 16, p. 4725-4733, 1999.
- COLE, Kenneth S.; COLE, Robert H. Dispersion and absorption in dielectrics I. Alternating current characteristics. **The Journal of chemical physics**, v. 9, n. 4, p. 341-351, 1941.
- DHAND, Chetna *et al.* Recent advances in polyaniline based biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 6, p. 2811-2821, 2011.
- GARNER, Julia S. *et al.* CDC definitions for nosocomial infections, 1988. **American journal of infection control**, v. 16, n. 3, p. 128-140, 1988.
- LI, Yongxin *et al.* Impedance based detection of pathogenic E. coli O157: H7 using a ferrocene-antimicrobial peptide modified biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 58, p. 193-199, 2014.



MATSUZAKI, Katsumi *et al.* Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes**, v. 1327, n. 1, p. 119-130, 1997.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Portaria nº 2.616, de 12 de maio de 1998: Expede na forma de anexos as diretrizes e normas para a prevenção e controle das infecções hospitalares. Diário Oficial da União. 1998.

OLIVEIRA, Inês Rosane Welter Zwirter de; VIEIRA, Iolanda Cruz. Construction and analytical applications of biosensors using different immobilization procedures of vegetable peroxidase on chitosan matrix. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 932-939, 2006.

SESHADRI, Divya; SETHURAMAN, Gomathy. Gram Positive Bacterial Infections. **Comprehensive Approach to Infections in Dermatology**, p. 15, 2016.

TANIMOTO, Sachiko; ICHIMURA, Akio. Discrimination of inner-and outer-sphere electrode reactions by cyclic voltammetry experiments. **Journal of Chemical Education**, v. 90, n. 6, p. 778-781, 2013.

TURNER, Anthony PF. Biosensors: sense and sensibility. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 8, p. 3184-3196, 2013.

## 6. AGRADECIMENTOS

A FACEPE pela bolsa concedida.



ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOTECNOLOGIA E NANOTECNOLOGIA EM SAÚDE – BN 12

## AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE *Aspergillus fumigatus* S7 CONTRA MICRO-ORGANISMOS DE INTERESSE CLÍNICO

P. H. do B. NASCIMENTO<sup>1</sup>, S. E. F. MACHADO<sup>1</sup>, H. K. L. FERREIRA<sup>1</sup>, G. R. da SILVA-LACERDA<sup>1,4</sup>, R. M. F. da SILVA<sup>2</sup>, R. F. R. MELO<sup>3</sup>, H. da S. ALVES<sup>5</sup>, G. M. de S. LIMA<sup>1</sup>, M. do C. A. de LIMA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Antibióticos

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento Farmácia

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Micologia

<sup>4</sup> Faculdade Maurício de Nassau, Unidade Caruaru- PE

<sup>5</sup> Universidade Estadual da Paraíba, Departamento de Farmácia

E-mail para contato: bomfim.pedroh@gmail.com

**RESUMO** - *Este trabalho objetivou investigar o potencial antimicrobiano de Aspergillus fumigatus S7. A identificação do micro-organismo se deu por microcultivo em lâmina e identificação molecular. O potencial antimicrobiano foi investigado pelas técnicas de bloco de gelose e difusão em disco. Para ambas, o fungo foi incubado em BDA/30°C/120h. Para bloco de gelose, blocos medindo 6x6mm foram colocados sobre os meios semeados com os micro-organismos teste. Para a difusão em disco, blocos de 6x6mm foram inoculados em caldo batata/30°C/150rpm/120h. Após filtração, discos de papel de 6x6mm foram embebidos com 50µL do líquido extrativo e colocados sobre os meios inoculados com os micro-organismos teste. As suspensões microbianas de Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa e Candida. albicans foram padronizadas: 1,2x10<sup>8</sup> (bactérias) e 5x10<sup>5</sup> UFC/mL (levedura) e plaqueadas em Ágar Mueller-Hinton (bactérias) e Ágar Sabouraud (levedura). As placas foram incubadas a 37°C/24h (bactérias) e 30°C/24-48h (levedura). Os halos de inibição foram medidos. Os testes foram realizados em duplicata. Verificou-se halos contra S. aureus (16,5 e 14mm, em bloco e disco, respectivamente) e K. pneumoniae (12,5mm em bloco). Não houve inibição contra K. pneumoniae (disco) nem contra P. aeruginosa e C. albicans em nenhuma das técnicas. A. fumigatus possui atividade antimicrobiana contra S. aureus e K. pneumoniae, demonstrando perspectivas sobre o potencial biotecnológico deste micro-organismo.*

**Palavras-chave:** *Aspergillus fumigatus; Potencial biotecnológico; Metabólitos secundários; Atividade antimicrobiana*

**ABSTRACT** - *This study aimed to investigate the antimicrobial potential of *Aspergillus fumigatus* S7. The identification of the microorganism occurred by microculture in plate and molecular identification. The antimicrobial potential was investigated by agar block and disc diffusion techniques. For both, the fungus was incubated on PDA/30°C/120h. For agar block, blocks measuring 6x6mm were placed on the seeded media with the test micro-organisms. For disk diffusion, 6x6mm blocks were inoculated in potato broth/30°C/150rpm/120h. After filtration, 6x6mm discs were soaked with 50µL of liquid extractive and placed on the media inoculated with test micro-organisms. The microbial suspensions of *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* were standardized:  $1,2 \times 10^8$  (bacteria) and  $5 \times 10^5$  CFU/mL (yeast) and plated on Mueller-Hinton agar (bacteria) and Sabouraud agar (yeast). The plates were incubated at 37°C/24h (bacteria) and 30°C/24-48h (yeasts). The inhibition zones were measured. Tests were performed in duplicate. It appeared halos against *S. aureus* (16,5 and 14mm, block and disk, respectively) and *K. pneumoniae* (12.5mm block). There was no inhibition against *K. pneumoniae* (disk) or against *P. aeruginosa* and *C. albicans* at no technique. *A. fumigatus* has antimicrobial activity against *S. aureus* and *K. pneumoniae*, demonstrating perspectives on the biotechnological potential of this micro-organism.*

**Keywords:** *Aspergillus fumigatus; Biotechnological potential; Secondary metabolites; Antimicrobial activity.*

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Aspergillus* é bastante diversificado, com mais de 250 espécies já catalogadas. Contudo, este número tem aumentado à medida que novas espécies são descobertas. As espécies que compõem este gênero podem ser encontradas em todo o mundo, sendo consideradas as mais abundantes e amplamente distribuídas, pois estão presentes nos mais diversos habitats como solo, água, ar, sementes e alimentos (Geiser *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2013; Diba *et al.*, 2014; Samson *et al.*, 2014).

Apesar de serem reconhecidas por crescer em alimentos, produzir micotoxinas e desencadear patologias em animais e vegetais, muitas espécies de *Aspergillus* são utilizadas em biotecnologia para a produção de vários tipos de metabólitos, como antibióticos, ácidos orgânicos, medicamentos ou enzimas, bem como agentes em muitas fermentações de alimentos (Samson *et al.*, 2014). Por exemplo, *A. fumigatus* é comprovadamente produtor de lacases (Jin e Ning, 2013); *A. oryzae* produz proteases (Salihi *et al.*, 2016); *A. protuberus* produz metabólitos com atividades anticâncer e antimicrobiana (Mathan *et al.*, 2011); *A. terreus* é produtor de lovastatina, um redutor de colesterol (Kamath *et al.*, 2015) e *A. niger* produz ácido cítrico (Adeoye *et al.*, 2015).

Diversos fatores, como o uso indiscriminado de agentes antimicrobianos, promoveram o surgimento do fenômeno de resistência dos micro-organismos a tais substâncias, o que representa um dos obstáculos mais significativos para a saúde pública (Senthil-Rajan *et al.*, 2013). Apesar da



capacidade de desenvolver resistência ser uma característica observada em micro-organismos de uma maneira geral (Calcagnotto *et al.*, 2011), uma forma de combater tal problema consiste na realização de pesquisas objetivando descobrir novos agentes com potencial atividade antimicrobiana, afim de promover a substituição dos ineficazes. Neste sentido, os micro-organismos surgem como uma alternativa, visto que são comprovadamente produtores de substâncias com este potencial.

Este trabalho teve como objetivo investigar o potencial antimicrobiano da cepa *Aspergillus fumigatus* S7 frente aos seguintes micro-organismos de interesse clínico: *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Micro-organismo

O micro-organismo foi previamente isolado de uma amostra de solo de um coqueiral localizado na região das Várzeas de Sousa, Paraíba, Brasil (Latitude: 6°45'17.57" S; Longitude: 38°7'23.31") e encontra-se armazenado tanto em água destilada esterilizada, segundo a metodologia proposta por Castellani (1939), como em tubos inclinados contendo BDA (Batata Dextrose Ágar. Composição: 200 g.L<sup>-1</sup> de infusão de batatas, 20 g.L<sup>-1</sup> de glicose e 15 g.L<sup>-1</sup> de ágar; pH = 5.6 ± 0.2), a 4 °C.

### 2.2 Reativação

Alçadas do micro-organismo foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de Caldo Batata (Composição: 200 g.L<sup>-1</sup> de infusão de batatas, 20 g.L<sup>-1</sup> de glicose; pH = 5.1 ± 0.2), a 150 rpm, a 30 °C, durante 72 horas. Após esse período, uma alíquota deste meio foi retirada com o auxílio de uma alça esterilizada, semeada em meio BDA e incubada por 120 horas, a 30 °C.

### 2.3 Identificação do micro-organismo

#### 2.3.1 Microcultivo em lâmina

O microcultivo em lâmina foi realizado segundo o protocolo proposto por Ridell (1950), utilizando o meio CYA ("Czapek Yeast Extract". Composição: 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 5,0 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 1,0 g.L<sup>-1</sup> de fosfato de potássio dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 0,3 g.L<sup>-1</sup> de nitrato de sódio (NaNO<sub>3</sub>), 0,05 g.L<sup>-1</sup> de cloreto de potássio (KCl), 0,05 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>), 0,001 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de ferro (FeSO<sub>4</sub>), 0,001 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de zinco (ZnSO<sub>4</sub>), 0,0005 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>) e 15,0 g.L<sup>-1</sup> de ágar) para cultivo do micro-organismo. Após 168 horas de incubação, examinou-se os órgãos vegetativos e reprodutores do micro-organismo em um microscópio óptico. Comparou-se as estruturas observadas com atlas de referência para identificação de fungos do gênero *Aspergillus* (Klinch e Pitt, 1988).

### 2.3.2 Identificação molecular

#### 2.3.2.1 Extração do DNA

Para obtenção do micélio, o fungo foi cultivado em BDA e incubado a 30 °C, durante 120 horas. Cinco discos de micélio medindo 8x8 mm foram inoculados em Caldo Batata, nas mesmas condições descritas no item 2.2. Após o cultivo, o micélio foi separado do sobrenadante por filtração a vácuo, congelado em nitrogênio líquido e macerado até obter-se um pó fino. A biomassa macerada foi encaminhada à extração de DNA, utilizando o HiPurA™ Fungal DNA Purification Kit (Himedia) e seguindo as recomendações propostas pelo fabricante.

#### 2.3.2.2 Amplificação - PCR

Os iniciadores ITS1 (5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G – 3') e ITS4 (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC – 3') foram utilizados para amplificação da região ITS do rDNA. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada em um volume final de 25 µL contendo 50 ng.µL<sup>-1</sup> DNA, 1 x PCR Buffer (20 mM Tris-HCL; pH 8.0), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTP, 0,4 mM de cada primer e 0,04 U de Taq DNA polimerase. O volume final foi completado com água esterilizada. As reações de PCR foram realizadas em termociclador. O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 95° C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 95° C, 1 minuto de anelamento a 62° C e 2 minutos de extensão a 72° C, e uma extensão final por 5 minutos a 72 °C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em tampão TBE 0,5 X. Os géis foram corados com 0,1 µL.mL<sup>-1</sup> de Sybr Safe e visualizados sob luz ultravioleta. A amostra foi sequenciada pela empresa Macrogen (Coreia do Sul) e as sequências comparadas no *GenBank* utilizando o *software* BLAST do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). As sequências foram alinhadas com *software* Clustal e a árvore filogenética foi construída utilizando o Programa Mega versão 6.0. A topologia foi avaliada pela análise *bootstrap* (1000 *resampling*).

### 2.4 Determinação da atividade antimicrobiana

#### 2.4.1 Ensaio primário:

Para avaliação da atividade antimicrobiana, foi realizada uma seleção primária segundo a metodologia proposta por Ichikawa et al. (1971), conhecida como “Método do Bloco de Gelose”. Inicialmente, o micro-organismo foi cultivado em BDA, a 30 °C, por 120 horas. Verificando crescimento satisfatório, foram retirados blocos circulares medindo 8x8 mm, utilizando um perfurador de colônias previamente esterilizado. Estes blocos foram colocados sob os micro-organismos teste anteriormente plaqueados, os quais são relatados no tópico a seguir.

#### 2.4.1.1 Micro-organismos teste

Para os testes de atividade antimicrobiana, foram utilizadas uma bactéria Gram-positiva, duas Gram-negativas e uma levedura. Estes micro-organismos foram cedidos pela Coleção de

Microorganismos-UFPEDA, do Departamento de Antibióticos, da Universidade Federal de Pernambuco e são descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Micro-organismos utilizados nos testes de atividade antimicrobiana de *A. fumigatus* S7

Micro-organismos-teste	
<b>Bactérias Gram-positivas</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> (UFPEDA-02)
<b>Bactérias Gram-negativas</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA-416)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (UFPEDA-396)
<b>Levedura</b>	<i>Candida albicans</i> (UFPEDA-1007)

Para a atividade antimicrobiana, as suspensões padronizadas nas concentrações de  $1,2 \times 10^8$  para as bactérias e  $5 \times 10^5$  UFC/mL para a levedura foram plaqueadas nos meios Ágar Mueller-Hinton e Ágar Sabouraud para as bactérias e levedura, respectivamente. Sobre a superfície do meio inoculado, foram colocados os blocos do micro-organismo. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas para bactérias e a 30 °C por 24 a 48 horas para a levedura. Os testes foram realizados em duplicata. Após o período de incubação, o diâmetro dos halos foi medido e os resultados foram obtidos pela média aritmética das duplicatas.

#### 2.4.2 Cultivo submerso

O micro-organismo foi cultivado em BDA, a 30 °C e, após 120 horas de incubação, blocos circulares medindo 6x6 mm foram encaminhados à fermentação submersa em Caldo Batata, a 30 °C, 150 rpm, durante 120 horas, utilizando frascos Erlenmeyer de 125 mL, com 25 mL de meio. Em cada frasco, foram colocados 3 blocos do micro-organismo. Decorrido este tempo de cultivo, o líquido extrativo foi obtido por filtração a vácuo. A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo teste de difusão em ágar, utilizando discos de papel medindo 8x8 mm, previamente esterilizados e impregnados com 50 µL do extrato. Para esta etapa, foram utilizados os mesmos micro-organismos teste e procedimentos citados no item 2.4.1.1.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A identificação do micro-organismo em nível de espécie foi possível ao associar os resultados obtidos nas técnicas de identificação utilizadas. Sendo assim, o micro-organismo foi identificado como *Aspergillus fumigatus*.

*A. fumigatus* S7 apresentou atividade antimicrobiana contra dois micro-organismos usando os blocos de gelose e um micro-organismo usando o líquido extrativo, conforme descrito a seguir na Tabela 2. Como é possível observar, os maiores halos de inibição foram formados contra *S. aureus*. Nas condições testadas, não houve inibição do crescimento de *P. aeruginosa* e *C. albicans*.

**Tabela 2.** Média aritmética dos halos de inibição (mm) de *A. fumigatus* S7 frente a micro-organismos de interesse clínico

Micro-organismo-teste	Halos (mm)	
	Bloco de gelose	Difusão em disco
<i>Staphylococcus aureus</i>	16,5	14,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12,5	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-

(-): não houve halo de inibição

O gênero *Aspergillus* é mais comumente encontrado no solo (Kang *et al.*, 2013), visto que os fungos são componentes importantes da microbiota deste habitat de tal modo que são mais abundantes que as bactérias, dependendo da profundidade e das condições nutricionais. De acordo com Karaoglu e Ulker (2006), os fungos são responsáveis por uma parte considerável da atividade microbiana no solo, o que justifica a inibição do crescimento dos micro-organismos citados na Tabela 2.

O fungo *A. fumigatus* apresenta considerável potencial biotecnológico, pois é reconhecidamente produtor de: substâncias anti-inflamatórias (Yao *et al.*, 2015); celulases (Saqib *et al.*, 2010); lacases (Jin e Ning, 2013); poligalacturonases (Sandri *et al.*, 2015) etc. O seu potencial antimicrobiano também já foi comprovado. Furtado *et al.* (2002) afirmaram que *A. fumigatus* produz os metabólitos Fumifungina e Sinerazol, ambos com atividade antifúngica. Os mesmos autores avaliaram a atividade antimicrobiana do referido fungo, cultivado juntamente com uma bactéria, frente a diversos micro-organismos e obtiveram resultados promissores. Kang *et al.* (2013) avaliaram as atividades antimicrobianas várias cepas de *Aspergillus* frente a *Malassezia furfur* e concluíram que, dentre as espécies testadas, *A. fumigatus* obteve o melhor potencial antifúngico. Logo, os resultados encontrados neste trabalho confirmam que *A. fumigatus* constitui uma fonte útil para a obtenção de novos antibióticos.

De acordo com o resultado apresentado na Tabela 2, podemos observar que *S. aureus* foi o micro-organismo mais sensível, quando comparado com a inibição do crescimento de *K. pneumoniae* no ensaio bloco de gelose. Segundo Madigan (2010), este fenômeno pode ser explicado pelo fato de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* serem bactérias Gram-negativas que, além da estrutura de peptidoglicano na parede celular, apresentam uma membrana externa que lhes confere uma efetiva barreira de permeabilidade, restringindo a penetração de alguns compostos antimicrobianos.

Ademais, ainda observando a Tabela 2, nota-se que o potencial de inibição de *A. fumigatus* foi diferente nas duas metodologias utilizadas, visto que o crescimento de *K. pneumoniae* só foi inibido com o bloco de gelose e o halo de inibição para *S. aureus* foi menor no teste de difusão em disco. De acordo com Ferreira *et al.* (2016), no ensaio de bloco de gelose, o micro-organismo avaliado como produtor de substâncias antimicrobianas é desafiado contra um micro-organismo-



teste, de modo que começa a produzir uma substância biologicamente ativa após estabelecerem um contato. Já no cultivo submerso, o que estimula a produção de substâncias ativas não é o contato com outros micro-organismos; os componentes nutricionais, em conjunto com as condições de cultivo (pH, temperatura e agitação) influenciam nesta produção, o que pode justificar a diferença encontrada nos resultados obtidos.

Portanto, confirma-se que *A. fumigatus* é capaz de inibir o crescimento de outros micro-organismos por produzir metabólitos secundários com potencial antimicrobiano e esta produção poderá ser otimizada variando as condições de cultivo.

#### 4. CONCLUSÃO

A busca por novos agentes antimicrobianos é recorrente em virtude do constante surgimento de micro-organismos resistentes. Sendo assim, os resultados aqui apresentados em forma de halos de inibição do crescimento dos micro-organismos de interesse clínico afirmam que o fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus* S7 aparece como uma possível fonte de compostos naturais bioativos. Contudo, outros estudos deverão ser executados aprimorar as condições de produção do metabólito secundário, bem como para extrair e purificá-lo.

#### 5. REFERÊNCIAS

- ADEOYE, A. O; LATEEF, A.; GUEGUIM-KANA, E. B. Optimization of citric acid production using a mutant strain of *Aspergillus niger* on cassava peel substrate. *Biocatal. Agric. Biotech.*, v. 4, p. 568–574, 2015.
- DIBA, K.; MIRHENDI, K.; KORBACHEH, P.; REZAIE, S. Development of RFLP-PCR method for the identification of medically important *Aspergillus* species using single restriction enzyme *Mwo*I. *Braz. J. Microbiol.*, v. 45, n. 2, p. 503-507, 2014.
- CALCAGNOTTO, L.; NESPOLO, C. R.; STEDILE, N. L. R. Resistência antimicrobiana em microrganismos isolados do trato respiratório de pacientes internados em unidade de terapia intensiva. *Arq. Catar. de Med.*, v. 40, n. 3, p. 77-83, 2011.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *J. Trop. Med. Hyg.*, v. 24, p. 270-276, 1939.
- FERREIRA, H. K. L.; MACHADO, S. E. F.; SANTANA, R. C. F.; ALBUQUERQUE, L. E. F.; SILVA, I. D. G.; SILVA-LACERDA, G. R.; ARAÚJO, J. M.; LIMA, G. M. S. Avaliação in vitro do potencial antimicrobiano de *Streptomyces* sp G-27 (Actinomycetales: Streptomycetaceae) contra microrganismos de interesse clínico. *Rev. Bras. Gest. Amb. Susten.*, v. 3, n. 6, 2016.
- FURTADO, N. A. J. C.; FONSECA, M. J. V.; BASTOS, J.K. The potential of an *Aspergillus fumigatus* Brazilian strain to produce Antimicrobial secondary metabolites. *Braz. J. Microbiol.*, v. 36, p. 357-362, 2005.
- GEISER, D. M.; KLICH, M.A.; FRISVAD, J.C.; PETERSON, S.W.; VARGA, J.; SAMSON, R.A. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Stud. Mycol.*, v. 59, p. 1-10, 2007.
- ICHIKAWA, T; ISHIKURA, T; OZAKI, A. A improvement of kasugamycin: producing strain by the agar piece method and prototroph method. *Folia Microbiol.*, v. 16, n. 3, p. 218-224, 1971.
- JIN, X.; NING, Y. Laccase production optimization by response surface methodology with *Aspergillus*



- fumigatus* AF1 in unique inexpensive medium and decolorization of different dyes with the crude enzyme or fungal pellets. *J. Hazard. Mater.*, v. 262, p. 870–877, 2013.
- KAMATH, P. V.; DWARAKANATH, B. S.; CHAUDHARY, A.; JANAKIRAMAN, S. Optimization of Culture Conditions for Maximal Lovastatin Production by *Aspergillus terreus* (KM017963) under Solid State Fermentation. *HAYATI J. Biosci.*, v. 22, p. 174-180, 2015.
- KLINCH, M. A.; PITT, J. I. *A laboratory guide to common Aspergillus species and their teleomorphs*. North Ryde: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, 1988.
- KANG, D.; SON, G. H.; PARK, H. M.; KIM, J.; CHOI, J. N.; KIM, H. Y.; LEE, S.; HONG, S.-B.; EE, C. H. Culture condition-dependent metabolite profiling of *Aspergillus fumigatus* with antifungal activity. *Fungal Biol.*, v. 117, p. 211-219, 2013.
- KARAOGLU, S. A.; ULKER, S. Isolation, identification and seasonal distribution of soilborne fungi in tea growing areas of Iyidere-Ikizdere vicinity (Rize-Turkey). *J. Basic Microbiol.*, v. 46, p. 208–218, 2006.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V. CLARK, D. P. *Microbiologia de Brock*. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- MATHAN, S.; SMITH, A. A.; KUMARAN, J.; PRAKASH, S. Anticancer and Antimicrobial Activity of *Aspergillus protuberus* SP1 Isolated from Marine Sediments of South Indian Coast. *Chin. J. Nat. Med.*, v. 9, n. 4, p. 286-292, 2011.
- RIDELL, R.W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycol.*, v. 42, p. 265-270, 1950.
- SALIHI, A.; ASOODEHA, A.; ALIABADIAN, M. Production and biochemical characterization of an alkaline protease from *Aspergillus oryzae* CH93. *Int. J. Biol Macromol.*, 2016.
- SAMSON, R. A.; VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; HONG, S.-B.; HUBKA, V.; KLAASSEN, C. H. W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K. A.; SUSCA, A.; TANNEY, J. B.; VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; SZIGETI, G.; YAGUCHI, T.; FRISVAD, J. C. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud. Mycol.*, v. 78, p. 141–173, 2014.
- SANDRI, I. G.; FONTANA, R. C.; SILVEIRA, M. M. Influence of pH and temperature on the production of polygalacturonases by *Aspergillus fumigatus*. *LWT-Food Sci. Technol.*, v. 61, p. 430-436, 2015.
- SAQIB, A. A. N.; HASSAN, M.; KHAN, N. F.; BAIG, S. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). *Process Biochem.*, v. 45, p. 641–646, 2010.
- SENTHIL-RAJAN, D.; RAJKUMAR, M.; SRINIVASAN, R.; KUMARAPPAN, C.; ARUNKUMAR, K.; SENTHILKUMAR, K. L.; SRIKANTH, M. V. Investigation on antimicrobial activity of root extracts of *Thespesia populnea* Linn. *Trop. Biomed.*, v. 30, n. 4, p. 570-578, 2013.
- YAO, L. Y.; ZHUA, Y. X.; LIUA, C. Q.; JIAO, R. H.; LUA, Y. H.; TANB, R. X. Preparative separation and purification of fumigaclavine C from fermented mycelia of *Aspergillus fumigatus* CY018 by microporous adsorption resin. *J. Chromatogr. B*, v. 989, p. 122–128, 2015.

## 6. AGRADECIMENTOS

Ao órgão de fomento “Fundação de Amparo à Pesquisa e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE)” pelos recursos disponibilizados para a realização deste trabalho.



**ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOTECNOLOGIA E NANOTECNOLOGIA EM  
SAÚDE – BN 13**

## **AVALIAÇÃO E DETERMINAÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DA PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE POR *Streptomyces xanthocidicus* UFPEDA 3418**

J.M.F. VIEIRA<sup>1</sup>, N.C.B. QUEIROZ<sup>1</sup>, G.R.S. LACERDA<sup>1</sup>, L.A.O. SILVA<sup>1</sup>, J.M. ARAÚJO<sup>1</sup>, G.M.S.  
LIMA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Antibióticos  
E-mail para contato: jessicamfontes@gmail.com

**RESUMO** – *As actinobactérias possuem grande importância econômica, pois sintetizam diversos metabólitos bioativos, entre eles estão os antibióticos, agentes antitumorais e enzimas, como L-asparaginase. Esta enzima é de grande interesse biotecnológico por participar do tratamento de doenças tumorais, principalmente no tratamento de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA). O objetivo deste trabalho foi avaliar e determinar as melhores condições da produção de L-asparaginase por actinobactérias pertencentes a Coleção de Microrganismo UFPEDA. Inicialmente, foi realizado um screening primário e a linhagem Streptomyces xanthocidicus UFPEDA 3418 foi selecionada como melhor produtora de L-asparaginase. As melhores condições de produção de L-asparaginase por esta linhagem foram determinadas e os resultados mais expressivos desta enzima foram obtidos quando cultivada em Meio M-9, pH 9, temperatura 35°C por 72 horas, apresentando uma atividade enzimática de 3.995,37 U/mL. Diante desses resultados, Streptomyces xanthocidus UFPEDA 3418 é considerado um bom produtor de L-asparaginase sendo este o primeiro relato da produção desta enzima por este microrganismo.*

*Palavras-chave: Metabólitos secundários, Enzima, Actinobactéria.*

**ABSTRACT** - *The actinomycetes have great economic importance because synthesise various bioactive metabolites, which include antibiotics, anti-tumor agents and enzymes, such as L-asparaginase. This enzyme has a great biotechnological interest to participate in the treatment of tumor diseases, especially in the treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). The aim of this study was to evaluate and determine the best conditions of the L-asparaginase production by actinomycetes belonging to UFPEDA Microorganism Collection. Initially, there was a primary screening and Streptomyces xanthocidicus UFPEDA 3418 strain was selected as the best producer of L-asparaginase. The best*



conditions for *L*-asparaginase production were determined and the most significant results of this enzyme were obtained using M-9 medium, pH 9 and 35 ° C for 72 hours, with an enzymatic activity of 3995.37 U / ml. Given these results, *Streptomyces xanthocidus* UFPEDA 3418 is considered a good producer of *L*-asparaginase and this is the first report of this enzyme produced by *S. xanthocidus*.

**Keywords:** Secondary metabolites, enzyme, Actinomycetes.

## 1. INTRODUÇÃO

*L*-asparaginase é uma enzima de grande interesse biotecnológico por ser considerada um importante agente antitumoral utilizado principalmente no tratamento de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), como também em doença de Hodgkin's, tumores de NK (Natural Killer), linfomas de célula T e alguns subtipos de leucemias mielóides. (DESHPANDE *et al*, 2014; EL-NAGGAR *et al.*, 2015).

*L*-asparaginase é responsável por catalisar a hidrólise do aminoácido *L*-asparagina em ácido aspártico e amônia. Este aminoácido é essencial para a sobrevivência das células normais e das células cancerígenas. Nas células normais esse aminoácido é sintetizado em quantidades suficientes para sua sobrevivência, essa síntese ocorre no citoplasma por meio da ação da enzima intracelular asparagina sintetase. Já nas células tumorais, devido a um silenciamento gênico essas células não possuem a capacidade de regular positivamente o gene da asparagina sintetase, obrigando a célula a captar o aminoácido na corrente sanguínea (NARTA *et al.*, 2007; DESHPANDE *et al.*, 2014; ALI *et al*, 2016). Deste modo, a depleção de asparagina da corrente sanguínea leva à destruição das células tumorais, por serem incapazes de completar a síntese proteica e, conseqüentemente, sintetizar suas próprias proteínas. (BASHA *et al*, 2009; KUMAR & SELVAM, 2011).

No mercado atual estão disponíveis preparações de asparaginase derivadas de *Escherichia coli* (Asparaginase® e Elspar®) e de *Erwinia chrysanthemi* (Erwinase®), porém, a administração prolongada dessas preparações de *L*-asparaginase tem levado a produção de anticorpos provocando um choque anafilático ou neutralização do efeito do fármaco. Diante disto, é indispensável a busca de *L*-asparaginase de outras fontes naturais, como micro-organismos de locais inexplorados, visando o tratamento dessas doenças com minimização desses efeitos. (ALI *et al.*, 2016; SALIMATH *et al.*, 2016).

O filo das Actinobactérias possui grande aplicação biotecnológica, capazes de sintetizar diversos metabólitos secundários de importância econômica, podendo ser aplicado na área de saúde, agricultura e/ou meio ambiente, entre eles estão: antibióticos, enzimas e agentes antitumorais. Este grupo de bactérias é considerado como boa fonte para produção de *L*-asparaginase (ASN). Entre as actinobactérias algumas linhagens têm se destacado como produtoras, tais como *Streptomyces* sp. PDK 2, *S. karnatakensis*, *S. longsporusflavus* e *S. gulbargensis* (MEENA *et al*, 2015).

Visando contribuir com o tratamento de doenças tumorais, nosso grupo de pesquisa busca por

novos micro-organismos de locais inexplorados, como a Caatinga, que apresente uma boa produção de L-asparaginase e que possa ser um importante promissor à agente antitumoral a ingressar no mercado.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

**2.1. Reativação dos micro-organismos:** Foram utilizadas três actinobactérias isoladas da rizosfera da Caatinga e depositadas na Coleção de Microrganismos UFPEDA – *Streptomyces xathocidicus* UFPEDA 3418, *Kribbella swartbergensis* UFPEDA 3417 e *Streptomyces fimbriatus* UFPEDA 3419. As Linhagens estavam preservadas em óleo mineral e foram reativadas em Caldo ISP-2 (Extrato de Levedura – 4 g/L; Extrato de Malte – 10 g/L; Dextrose – 4 g/L; pH 7,2) a 37°C durante 48 h (SHIRLING & GOTTLIEB 1966). Em seguida, as culturas foram transferidas para placas contendo meio ágar ISP-3 (Farinha de aveia – 20 g/L; Solução de traços de sais – 1 mL/L [FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O – 0,1 mg/L; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O 0,1 mg/L; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O – 0,1 mg/L]; Ágar – 15 g/L; pH – 7,2) a 37 °C durante 48h a 120 h, para obtenção de cultivos recentes para realização dos experimentos.

**2.2. Produção de L-Asparaginase:** Inicialmente, foi realizado um screening primário de três actinobactérias para avaliar a capacidade em produzir L-asparaginase.

**2.2.1 Ensaio Qualitativo da L-asparaginase:** As actinobactérias foram inoculadas em placas de Petri contendo 20mL do meio de cultura M-9 modificado (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O – 6 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 3 g/L; NaCl – 0,5 g/L; L-asparagina – 5 g/L; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O – 0,5g; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O – 0,014 g/L; Glicose – 2 g/L; Sol. etOH Vermelho de Fenol (0,25%) – 15mL; Ágar – 15 g/L; pH – 6,2) de acordo com o método em placa de GULATI et al. (1997) Após o período de cultivo foi observada a presença de uma zona rosa ao redor da colônia a qual indica a presença da produção da L-asparaginase, configurando dessa forma o ensaio qualitativo.

**2.2.2 Ensaio Quantitativo da L-asparaginase:** Foi realizado pré-inóculo em meio ISP-3 (Farinha de aveia – 20 g/L; Solução de traços de sais – 1 mL/L [FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O – 0,1 mg/L; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O 0,1 mg/L; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O – 0,1 mg/L]; pH – 7,2) e após 48h foi transferida uma alíquota de 1mL de cada linhagem para o meio de cultura M9 líquido (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O – 6 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 3 g/L; NaCl – 0,5 g/L; L-asparagina – 5 g/L; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O – 0,5g; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O – 0,014 g/L; Glicose – 2 g/L; pH – 6,2) em tubos de ensaio contendo 10 mL, onde foram cultivadas sob agitação de 150 rpm por 120 horas. Após o cultivo, foi determinada a atividade enzimática da L-asparaginase.

**2.2.3 Determinação das melhores condições de fermentação:** Após a determinação da melhor linhagem produtora de L-asparaginase, foram avaliados os seguintes parâmetros: Meio de Cultura (M-9 e TGY), Tempo de crescimento (24h – 120h), diferentes níveis de pH (5.0 – 9.0) e variações de temperatura (25°C – 50°C). (DESHPANDE et al., 2014).

**2.3 Ensaio L-asparaginase:** A atividade da L-asparaginase foi determinada pela quantidade de amônia formada por Nesslerização (IMADA et al, 1973). Uma mistura de 0,5 mL do extrato da enzima e 0,5 mL de Tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) contendo L-asparagina a 16 mM foi incubada durante 30 min a 37 °C. A reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de ácido tricloroacético 1,5 M,

centrifugada a 6.160 g por 3 min e 0,5 mL do sobrenadante foi diluído em 2,25 mL de água destilada e adicionado 0,25 mL do Reagente de Nessler. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm. Uma solução de sulfato de Amônia foi usada para a preparação da curva padrão. Uma unidade internacional (UI) de L-asparaginase foi definida como a quantidade de enzima requerida para liberar 1  $\mu$ M de amônia por minuto a 37 °C.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Produção de L-asparaginase

Diante dos experimentos realizados para avaliação da produção de L-asparaginase, as linhagens de actinobactérias testadas em placa apresentaram uma coloração rosa ao redor da colônia indicando a capacidade dessas bactérias produzirem a enzima L-asparaginase. Após o ensaio quantitativo, dentre as três actinobactérias testadas, a linhagem *Streptomyces xanthocidicus* UFPEDA 3418 se destacou na produção desta enzima apresentando atividade enzimática de 4.397,22 U/mL conforme a Figura 1. Após a seleção da actinobactéria foram determinadas as melhores condições de fermentação para produção da enzima.

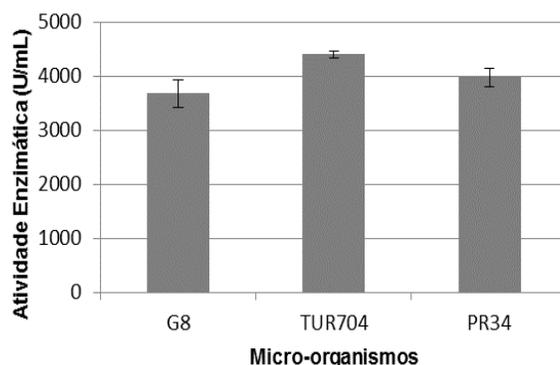


Figura 1 – Determinação da produção de L-asparaginase em Meio M-9 por três actinobactérias.

#### 3.2 Determinação das condições ideais para produção da enzima:

Ao avaliar os parâmetros em diferentes meios de cultura foi possível observar uma melhor produção da enzima por *S. xanthocidicus* UFPEDA 3418 quando cultivado no meio de cultura M-9 apresentando atividade enzimática de 4.405,56 U/mL e quando cultivado em meio TGY foi observado uma menor produção obtendo uma atividade enzimática de 3.755,56 U/mL como mostra na Figura 2. Possivelmente a melhor atividade no meio M-9 é devido ao número reduzido de fontes de carbono presentes neste meio de cultura, que durante o crescimento exponencial do micro-organismo não é disponibilizada em quantidades suficientes para o seu crescimento, induzindo o micro-organismo a

atingir rapidamente o final da fase log e início da fase estacionária, gerando uma condição de estresse, permitindo o início da produção de metabólitos secundários, como forma de sobrevivência, devido à escassez de nutrientes. Já o meio TGY oferece grande quantidade de glicose entre outros componentes, proporcionando o crescimento do micro-organismo em uma “zona de conforto” e consequentemente apresentando uma menor produção do metabólito.

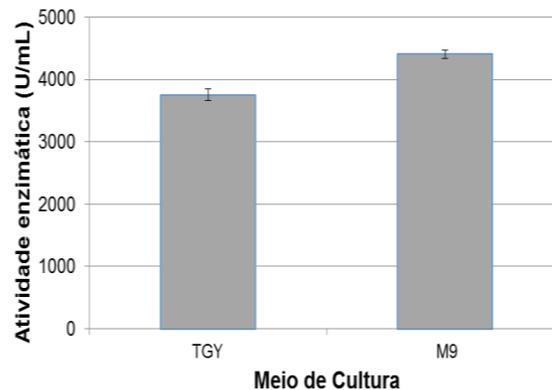


Figura 2 – Determinação do meio de cultura ideal de fermentação para produção de L-asparaginase por *Streptomyces xanthocidicus* UFPEDA 3418.

O tempo de produção da enzima também foi avaliado, obtendo a melhor produção em 72h de fermentação atingindo uma atividade enzimática de 4.411,11 U/mL (Figura 3). De acordo com Khalilzadeh et al (2004), a busca por melhores condições para produção de proteínas avaliando diferentes parâmetros relacionados a fatores nutricionais e metabólicos do micro-organismo tem sido uma importante estratégia para uma maior produção de proteínas, pois estabelecendo os melhores parâmetros de produção é possível determinar o pico exato de produção da enzima pelo micro-organismo, podendo obter uma proteína mais robusta.

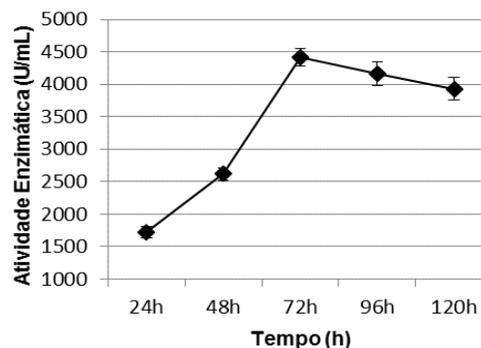


Figura 3 – Determinação do tempo ideal de fermentação para produção de L-asparaginase por *Streptomyces xanthocidicus* UFPEDA 3418.

Avaliando os níveis de pH para uma melhor produção de L-asparaginase por *S. xanthocidicus* UFPEDA 3418, foi possível observar um pico de produção desta enzima no pH 9 com atividade enzimática de 3.663,89 U/mL (Figura 4). Sendo este pH considerado ótimo por ser próximo ao pH fisiológico do corpo humano, se apresentando ligeiramente alcalino, que consequentemente possibilita o equilíbrio ácido-base da corrente sanguínea, pois na presença da L-asparaginase ocorre a hidrólise da L-asparagina aumentando consideravelmente a concentração de aspartato, tornando o sangue mais ácido. Observações semelhantes foram relatadas por Manna et al (1995) e Amena et al (2010) para asparaginase de *Streptomyces gulbargensis* e *Pseudomonas stutzeri* MB-405, respectivamente. Outras pesquisas utilizando *Streptomyces* sp. PDK7 obtiveram valores máximos de atividade enzimática entre pH 8,0 e 8,5.

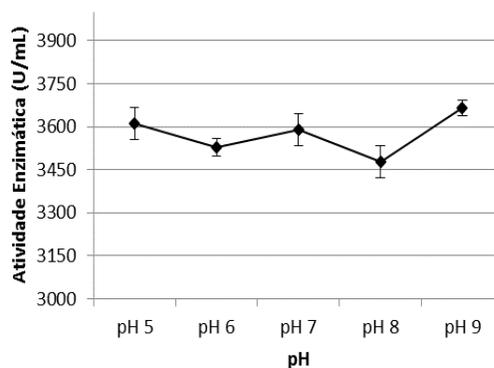


Figura 4 – Determinação do pH ideal de fermentação para produção de L-asparaginase por *Streptomyces xanthocidicus* UFPEDA 3418

## 4. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos foi possível observar que *Streptomyces xanthocidicus* UFPEDA 3418 produz a enzima L-asparaginase, demonstrando resultados satisfatórios, visto que obteve uma boa produção desta enzima. Entretanto, até o momento, nada foi encontrado na literatura relacionado a produção de L-asparaginase por este micro-organismo, sendo este o primeiro relato da produção desta enzima por *Streptomyces xanthocidicus*.

## 5. REFERÊNCIAS

ALI, U.; NAVEED, M., ULLAH, A.; ALI, K.; SHAH, S. A.; FAHAD, S.; MUMTAZ, A. S. L-



- asparaginase as a critical component to combat Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL): A novel approach to target ALL. *European Journal of Pharmacology*. n.771, p. 199-210, 2016.
- BASHA, N. S.; REKHA, R.; KOMALA, M.; RUBY, S. Production of extracellular Anti-leukaemic enzyme L-asparaginase from marine actinomycetes by solid-state and submerged fermentation: Purification and Characterisation. *Trop. J. Pharm. Res.* n.8, v.4, p.353-360, 2009.
- DESHPANDE, N.; CHOUBEY, P.; AGASHE, A. Studies on Optimization of Growth Parameters for L-Asparaginase Production by *Streptomyces ginsengisoli*. *Sci. World J.*, 6 págs, 2014.
- EL-NAGGAR, N.E.; MOAWAD, H.; EL-SHWEIHY, N. M.; EL-EWASY, S. M. Optimization of Culture Conditions for Production of the Anti-Leukemic Glutaminase Free L-Asparaginase by Newly Isolated *Streptomyces olivaceus* NEAE-119 Using Response Surface Methodology. *BioMed Research International*. Article ID 627031, 17 pages, 2015.
- GULATI, R.; SAXENA, R.K.; GUPTA, R. A rapid plate assay for screening L-asparaginase producing micro-organisms. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 24, p. 23-26, 1997.
- IMADA, A.; IGARASI, S.; NAKAHAMA, K.; ISONO, M. Asparaginase and glutaminase activities of micro-organisms. *J. Gen. Microbiol.*, 76, 85-99, 1973.
- KUMAR, M.S., SELVAM, K. Isolation and purification of high efficiency L-asparaginase by quantitative preparative continuous elution SDS PAGE electrophoresis. *J. Microb. Biochem. Technol.* n.3, v.5, p.073-083, 2011.
- MEENA, B.; ANBURAJAN, L.; SATHISH, T.; RAGHAVAN, R.V.; DHARANI, G.; VINITHKUMAR, N. V.; KIRUBAGARAN, R. L-Asparaginase from *Streptomyces griseus* NIOT-VKMA29: optimization of process variables using factorial designs and molecular characterization of l-asparaginase gene. *Scientific Reports – Nature*, 512404, DOI: 10.1038/srep12404, 2015.
- NARTA, U.K.; KANWAR, S.S.; AZMI, W. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, v.61, p. 208-221, 2007.
- SALIMATH, M.B.; SHOBHA, K. S.; ONKARAPPA, R. Anti-lymphocytic enzyme L-asparaginase from *Streptomyces antibioticus* of Western Ghat Soil. *BioTech*. ISSN 2251-2489 doi: 10.5176/2251-2489\_BioTech16.26, 2016.
- SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Methods For Characterization Of *Streptomyces* Species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 16, p. 313-340, 1966.

## 6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e bolsa concedida ao primeiro autor.



ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOTECNOLOGIA E NANOTECNOLOGIA EM SAÚDE – BN 14

## DESENVOLVIMENTO DE NANOBIOELETRODO BASEADO EM COMPÓSITO HÍBRIDO PARA O DIAGNÓSTICO ULTRASSENSÍVEL DE HPV 16

K. Y. P. S. AVELINO<sup>1</sup>, I. A. MORALES<sup>1</sup>, N. LUCENA-SILVA<sup>2</sup>, C. P. de MELO<sup>3</sup>, C. A. S. de ANDRADE<sup>1</sup> e M. D. L. de OLIVEIRA<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica, Recife/PE, Brasil

<sup>2</sup> Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife/PE, Brasil

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Departamento de Física, Recife/PE, Brasil

E-mail para contato: kareniasmim@hotmail.com

**RESUMO** – *O Papillomavírus Humano (HPV) é o principal patógeno transmitido sexualmente com alta prevalência entre jovens e adultos. Este vírus pode infectar o epitélio anogenital e as mucosas, causando o aparecimento de verrugas e lesões pré-cancerosas. Entre os genótipos virais de alto risco oncogênico, destaca-se o HPV16 por ser responsável pelo desenvolvimento de câncer cervical em aproximadamente 70% dos casos e outros tipos de câncer com menor incidência, como o câncer vaginal, peniano, vulvar e anal. Diante deste problema, este estudo tem como principal objetivo desenvolver um nanobioeletrodo baseado em compósito híbrido para o diagnóstico ultrasensível de HPV16. A técnica de voltametria cíclica foi escolhida para a caracterização eletroquímica das etapas de construção do nanobioeletrodo e avaliação de sua bioatividade após exposição as amostras clínicas de pacientes infectados com o vírus. O compósito híbrido exibiu excelentes propriedades físicas e químicas para a nanoestruturação da plataforma biossensível e amplificação do sinal analítico. Além disso, o nanobioeletrodo mostrou alta sensibilidade e seletividade para o reconhecimento bioespecífico de HPV16 com um limite de detecção de  $1 \text{ pg.}\mu\text{L}^{-1}$ . Portanto, o biodispositivo proposto pode ser considerado uma ferramenta útil para o desenvolvimento de um sistema de detecção efetivo com impacto no tratamento e prognóstico de pacientes infectados com o papillomavírus.*

**Palavras-chave:** *Nanopartículas de ouro, Papillomavírus Humano, Polianilina, Voltametria cíclica.*

**ABSTRACT** – *The Human Papillomavirus (HPV) is the main sexually transmitted pathogen with high prevalence among young and adults. This virus can infect the*

*anogenital epithelium and mucous membranes, causing the appearance of warts and precancerous lesions. Among the viral genotypes of high oncogenic risk, we highlight the HPV16 by being responsible for the development of cervical cancer in approximately 70% of cases and other types of cancers with lower incidence, as vaginal, penile, vulvar, and anal cancer. Facing this problem, this study has as main objective develop a nanobioelectrode based on hybrid composite for ultrasensitive diagnostic of HPV16. The technique of cyclic voltammetry was chosen for the electrochemical characterization of the nanobioelectrode construction steps and evaluation of its bioactivity after exposure to clinical samples of patients infected with the virus. The hybrid composite exhibited excellent physical and chemical properties for the nanostructuring of the biosensitive platform and amplification of the analytical signal. Furthermore, the nanobioelectrode showed high sensitivity and selectivity for the biospecific recognition of HPV16 with a detection limit of  $1 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ . Therefore, the proposed biodevice may be considered as a useful tool for the development of a effective detection system with impact in the treatment and prognosis of patients infected with the papillomavirus.*

*Keywords: Cyclic voltammetry, Gold nanoparticles, Human Papillomavirus, Polyaniline.*

## 1. INTRODUÇÃO

O Papilomavírus Humano (HPV) é um vírus de cadeia dupla de DNA não envelopado responsável por infecções nas mucosas e no epitélio anogenital (Hutter; Decker, 2016). Este patógeno apresenta alta incidência e prevalência entre jovens e adultos, sendo o vírus mais comum transmitido sexualmente. Atualmente, são conhecidos mais de 200 genótipos de HPV subdivididos de acordo com o seu potencial oncogênico em tipos de baixo risco (HPV6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 61, 72, 73 e 81) associados ao aparecimento de verrugas genitais e tipos de alto risco (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68) responsáveis por alterações citogenéticas que levam ao desenvolvimento de cânceres, como o câncer cervical, vaginal, vulvar, peniano, e anal (CIVIT *et al.*, 2012). Além disso, estudos epidemiológicos mostram que aproximadamente 70% dos casos de carcinoma cervical invasivo em todo o mundo estão correlacionados com infecções por HPV16 (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 eficazes. Em adição, permite o rastreamento dos genótipos virais mais frequentes em uma população (Hutter; Decker, 2016). 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 (Urrego *et al.*, 2015). Logo, o desenvolvimento de 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 (Frías *et al.*, 2015).

Ao longo dos anos, os avanços da nanociência e o desenvolvimento biotecnológico possibilitaram a fabricação de novos dispositivos eletrônicos, como os biossensores (Yang; Zhang,



2014). A estratégia funcional destes dispositivos fundamenta-se na especificidade de moléculas biológicas e na capacidade analítica de métodos de transdução de sinal (Frías *et al.*, 2015). Dentre os inúmeros tipos de biossensores, destacam-se os genossensores eletroquímicos por apresentarem estabilidade em condições ambientais adversas e elevada especificidade (Sassolas *et al.*, 2008). Estes sensores são baseados na imobilização de segmentos de ácidos nucleicos sobre a superfície de um transdutor eletroquímico. Através de mudanças nas propriedades eletroquímicas do sistema decorrentes da hibridação entre um fragmento de cadeia simples de DNA e a cadeia complementar, é possível obter informações analíticas qualitativas ou quantitativas, específicas e seletivas (Costa *et al.*, 2014). Os genossensores apresentam amplo potencial de aplicabilidade para o diagnóstico clínico, pois, são métodos de detecção ultrasensíveis que permitem uma análise em tempo real de alvos moleculares a um baixo custo e requerem pequenos volumes de amostras. Em adição, a instrumentação é simples com a possibilidade de miniaturização, portabilidade e automação (Rosario; Mutharasan, 2014).

O desafio para a construção de genossensores eletroquímicos consiste em preservar a atividade biológica da biomolécula após sua imobilização sobre superfícies transdutoras. Por esta razão, a associação de materiais nanométricos e polímeros condutores pode ser considerada uma alternativa inovadora para a construção de plataformas nanoestruturadas biocompatíveis (Rovina; Siddiquee, 2016). Estas atuam como interfaces entre a biomolécula e o eletrodo, possibilitando uma ancoragem estável do receptor, sem perda de atividade biológica, o que determina um efetivo processo de biorreconhecimento (Huo *et al.*, 2016).

O Compósito híbrido constituído por nanopartículas de ouro (AuNps) e polianilina (PANI) apresenta propriedades físico-químicas únicas, tornando-se uma grande promessa para o desenvolvimento de biossensores com elevado desempenho analítico (Avelino *et al.*, 2014; Avelino *et al.*, 2016). As AuNps possuem excelentes características para o interfaceamento do reconhecimento biológico. Por exemplo, estas nanopartículas são biocompatíveis e proporcionam um microambiente adequado para a imobilização estável de biomoléculas (Yáñez-Sedeño; Pingarrón, 2005). Além disso, as AuNps exibem elevada energia superficial, elevada relação entre superfície e volume que proporciona uma maior área eletroquimicamente ativa e atuam como agentes para a transferência direta e efetiva de elétrons entre o eletrodo e a biomolécula (Pingarrón *et al.*, 2008).

A PANI é um dos polímeros orgânicos mais estudados devido sua elevada condutividade, estabilidade química sob condições ambientais, monômero de baixo custo, facilidade de polimerização e dopagem. Em adição, a PANI proporciona uma amplificação do sinal eletroquímico por atuar como um mediador direto de elétrons (Suckeveriene *et al.*, 2011). Por estas razões, o compósito híbrido de AuNps e PANI destaca-se entre os demais nanomateriais por apresentar características essenciais para a construção de plataformas biossensíveis (Avelino *et al.*, 2014; Avelino *et al.*, 2016).

Com a finalidade de contribuir para o desenvolvimento de novos ensaios de detecção para o papilomavírus, este trabalho científico possui o objetivo de construir um nanobioeletrodo baseado em compósito híbrido de AuNps e PANI para o diagnóstico ultrasensível de HPV16. Portanto, o biodispositivo proposto poderá ser útil para a identificação de infecções por HPV16, implementação de terapias adequadas e prevenção de câncer cervical, promovendo assim, a qualidade de vida da população.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

## 2.1 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA

As medidas voltamétricas foram realizadas em um Potenciostato/Galvanostato Autolab PGSTAT 128N controlado por um software de interfaceamento NOVA 1.8 (Metrohm Autolab, The Netherlands). Os experimentos foram realizados em uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos imersos em 20 mL de solução de ferro-ferricianeto de potássio  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  (1:1) a 10 mM em tampão fosfato de sódio (PBS - pH 7,4), atuando como sonda redox. O eletrodo de ouro foi utilizado como eletrodo de trabalho, o eletrodo de Ag/AgCl saturado com KCl a 3 M e o eletrodo de platina foram usados, respectivamente, como eletrodo de referência e contra-referência. Os voltamogramas cíclicos foram obtidos em uma faixa de potencial de -0,2 a +0,7 V e velocidade de varredura de  $50 \text{ mV.s}^{-1}$ . Todas as análises eletroquímicas foram realizadas em triplicatas, a temperatura ambiente (22 - 24 °C) e no interior de uma gaiola de Faraday.

## 2.2 CONSTRUÇÃO DO NANOBIOELETRODO

O eletrodo de ouro ( $\varnothing = 2 \text{ mm}$ ) foi cuidadosamente polido em um disco de feltro com uma suspensão de alumina ( $Al_2O_3$ ) a  $0,05 \mu\text{M}$ . Em seguida, enxaguado com água ultrapura e submetido a um banho de ultrassom durante 10 minutos para a remoção de partículas residuais e seco ao ar. O método de automontagem foi usado para a estruturação do nanocompósito de AuNps e PANI sobre a superfície de ouro do eletrodo de trabalho. Nesta etapa, o eletrodo foi imerso por 2 minutos em uma solução de nanocompósito (1/750, nanocompósito/etanol, v/v). Posteriormente, o eletrodo modificado com o nanocompósito foi rinsado com solução de etanol para a remoção das partículas não adsorvidas. Subsequentemente, uma sonda de DNA específica para HPV funcionalizada com grupo amino terminal foi imobilizada quimicamente sobre a plataforma nanoestruturada. Através do método de *drop-coating*,  $2 \mu\text{L}$  de uma solução de glutaraldeído a 0,5% e  $2 \mu\text{L}$  de uma solução a  $25 \text{ pmol}/\mu\text{L}$  da sonda foram adicionados por 10 minutos à superfície do eletrodo modificado com o nanocompósito para a obtenção do nanobioeletrodo. O glutaraldeído atua como um agente reticulante bifuncional promovendo a formação de bases de Schiff entre os grupos amino da sonda e os grupos amino do polímero PANI, viabilizando assim, a ancoragem estável da sonda sobre o nanocompósito.

## 2.3 ESTUDO DE BIOATIVIDADE

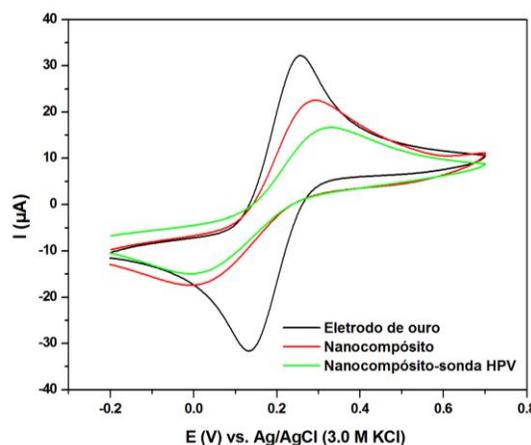
Os ensaios de biodeteção foram realizados com produtos de amplificação de PCR derivados de amostras de pacientes infectados com HPV16 (amostras de cDNA). Para o estudo de sensibilidade e especificidade, o nanobioeletrodo foi exposto a  $2 \mu\text{L}$  das amostras de cDNA em diferentes concentrações (1; 25; 50; 75 e  $100 \text{ pg.}\mu\text{L}^{-1}$ ) por 15 minutos. Em adição, amostras de cDNA de pacientes não infectados foram utilizadas para o estudo de seletividade.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 demonstra a caracterização eletroquímica das etapas de construção do

nanobioeletrodo. O voltamograma cíclico para o eletrodo de ouro não modificado apresentou picos anódico e catódico bem definidos e uma taxa de transferência de carga reversível na presença da solução eletrolítica  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ . Ao adicionar o nanocompósito de AuNps e PANI sobre o eletrodo de trabalho foi observada uma diminuição da resposta amperométrica. O bloqueio parcial do processo de oxido-redução está relacionado à formação de uma monocamada automontada de nanocompósito sobre a área eletroativa. O nanocompósito híbrido possui grupos tióis terminais (SH-) que interagem com a superfície de ouro e conduzem a estruturação do nanocompósito (Avelino *et al.*, 2016).

Subsequentemente, uma sonda de DNA específica para HPV foi imobilizada quimicamente sobre o eletrodo modificado com o nanocompósito. O processo de ancoragem da sonda de DNA foi baseado na ação de acoplamento do glutaraldeído que promoveu a formação de ligações covalentes entre o grupo amino da sonda e grupo amino do polímero PANI. Os resultados voltamétricos demonstraram que após a modificação do eletrodo com nanocompósito-sonda DNA houve uma redução no sinal de corrente devido a uma baixa penetração do par redox no sistema sensor. Em adição, a repulsão eletrostática entre os grupos fosfato da sonda de DNA e as cargas negativas dos eletrólitos  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  contribuiu para o bloqueio do processo redox (Figura 1).

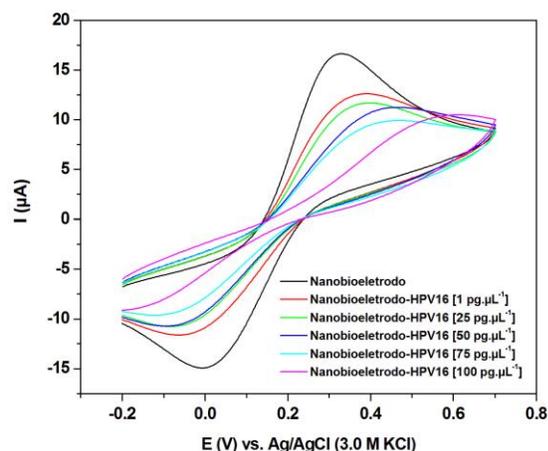


**Figura 1.** Voltamogramas cíclicos para cada etapa de montagem do nanobioeletrodo.

O desempenho analítico do nanobioeletrodo foi avaliado através da interação bioespecífica do sensor com amostras de cDNA de pacientes infectados com HPV16. A Figura 2 ilustra os voltamogramas cíclicos para o nanobioeletrodo exposto a diferentes concentrações das amostras de cDNA (1; 25; 50; 75 e 100  $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ). Após o processo de hibridação, pode-se observar uma diminuição nos valores das correntes de pico e uma redução das áreas voltamétricas, sendo estes decréscimos proporcionais ao aumento da concentração de cDNA (Tabela 1).

Segundo Costa *et al.* (2014) o processo de hibridação é um evento de biorreconhecimento a nível da interface eletroquímica que ocasiona uma redução total da resposta amperométrica. Sabe-se que o processo de hibridação entre a sonda e o DNA alvo resulta na formação de uma fita dupla de DNA (dsDNA) que possui propriedades não condutoras (Benvidi *et al.*, 2015). Logo, o decréscimo observado na resposta eletroquímica após a exposição do nanobioeletrodo as amostras de cDNA de

pacientes infectados com HPV16 é devido a formação de híbridos dsDNA na superfície do sensor que ocasionam a redução do fluxo de elétrons para o transdutor (Figura 2).



**Figura 2.** Voltamogramas cíclicos para o nanobioeletrodo exposto a diferentes concentrações de amostras de cDNA de pacientes infectados com HPV16 (1; 25; 50; 75 e 100  $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ).

**Tabela 1.** Valores das correntes e áreas dos picos anódico e catódico dos voltamogramas para cada etapa de montagem do nanobioeletrodo e sua bioatividade frente as amostras de cDNA.

Eletrodo modificado	Concentração cDNA ( $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	Corrente de p. anódica ( $\mu\text{A}$ )	Corrente de p. catódica ( $\mu\text{A}$ )	Área do pic. anódico ( $\mu\text{m}$ )	Área do pic. catódico ( $\mu\text{m}$ )
Eletrodo de ouro	-	$33,28 \pm 0,91$	$-30,69 \pm 0,91$	$7,66 \pm 0,22$	$6,23 \pm 0,18$
Nanocompósito	-	$21,94 \pm 0,7$	$-10,85 \pm 0,38$	$5,64 \pm 0,19$	$2,68 \pm 0,09$
Nanocompósito-sonda DNA	-	$15,10 \pm 0,41$	$-9,71 \pm 0,28$	$4,38 \pm 0,12$	$2,42 \pm 0,06$
Nanobioeletrodo-HPV16	1	$9,63 \pm 0,26$	$-5,43 \pm 0,14$	$3,10 \pm 0,08$	$1,38 \pm 0,03$
Nanobioeletrodo-HPV16	25	$8,78 \pm 0,31$	$-4,47 \pm 0,16$	$2,79 \pm 0,09$	$1,08 \pm 0,03$
Nanobioeletrodo-HPV16	50	$6,75 \pm 0,16$	$-4,11 \pm 0,09$	$2,22 \pm 0,05$	$0,98 \pm 0,02$
Nanobioeletrodo-HPV16	75	$5,64 \pm 0,23$	$-3,05 \pm 0,13$	$1,81 \pm 0,07$	$0,72 \pm 0,03$
Nanobioeletrodo-HPV16	100	$3,12 \pm 0,09$	$-1,07 \pm 0,03$	$0,88 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,00$
Nanobioeletrodo-Amostra não infectada	100	$13,92 \pm 0,41$	$-8,22 \pm 0,27$	$4,07 \pm 0,13$	$2,11 \pm 0,06$

\*Nanobioeletrodo = Nanocompósito-sonda DNA. Os valores correspondem a média das triplicatas mais o desvio padrão.

Para avaliar a seletividade, o nanobioeletrodo foi exposto as amostras de cDNA de pacientes não infectados com HPV a uma concentração de  $100 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ . É importante destacar que após este processo de biointeração houve apenas uma redução sutil nas correntes de pico anódica e catódica. Ao comparar



este dado com o resultado do nanobioeletrodo exposto as amostras de cDNA infectadas com HPV16 (na mesma concentração), verifica-se um decréscimo significativo nas correntes de pico anódica e catódica, indicando o baixo potencial do biodispositivo para a hibridação não específica (Tabela 1).

#### 4. CONCLUSÃO

Um nanobioeletrodo baseado em compósito híbrido de AuNps e PANI foi desenvolvido com sucesso para a detecção eletroquímica de HPV16 em amostras de cDNA. As análises voltamétricas possibilitaram a caracterização das etapas de montagem do sistema sensor e evidenciaram a sua capacidade de reconhecimento biospecífico. Em adição, o nanobioeletrodo apresentou um limite de detecção de  $1 \text{ pg.}\mu\text{L}^{-1}$ , elevada sensibilidade, seletividade e um processo de fabricação simples com rápido tempo de resposta. Portanto, o sistema de detecção proposto pode ser considerado uma valiosa ferramenta para o diagnóstico molecular do papilomavírus, possibilitando a identificação do HPV16 em amostras clínicas antes do desenvolvimento de alterações malignas cervicais.

#### 5. REFERÊNCIAS

- AVELINO, K.Y.P.S.; ANDRADE, C. A. S.; MELO, C. P.; NOGUEIRA, M. L.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; OLIVEIRA, M. D. L. Biosensor based on hybrid nanocomposite and CramoLL lectin for detection of dengue glycoproteins in real samples. *Synthetic Metals*, v. 194, p. 102-108, 2014.
- AVELINO, K.Y.P.S.; FRIAS, I. A.; LUCENA-SILVA, N.; GOMES, R. G.; MELO, C. P.; OLIVEIRA, M. D.; ANDRADE, C. A. 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.
- BENVIDI, A.; FIROUZABADI, A. D.; MOSHTAGHIUN, S. M.; MAZLOUM-ARDAKANI, M.; TEZERJANI, M. D. Ultrasensitive DNA sensor based on gold nanoparticles/reduced graphene oxide/glassy carbon electrode. *Analytical Biochemistry*, v. 484, p. 24-30, 2015.
- CIVIT L.; FRAGOSO, A.; HÖLTERS, S.; DÜRST, M.; O'SULLIVAN, C. K. 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.
- COSTA, M.P.; ANDRADE, C. A.; MONTENEGRO, R. A.; MELO, F. L.; OLIVEIRA, M. D. Self-assembled monolayers of mercaptobenzoic acid and magnetite nanoparticles as an efficient support for development of tuberculosis genosensor. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 433, p. 141-148, 2014.
- FRÍAS, I.A.M.; AVELINO, K. Y.; SILVA, R. R.; ANDRADE, C. A.; OLIVEIRA, M. D. Trends in biosensors for HPV: identification and diagnosis. *Journal of Sensors*, v. 2015, p. 1-16, 2015.
- HUANG, H; BAI, W.; DONG, C.; GUO, R.; LIU, Z. 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.
- HUO, X.; LIU, X.; LIU, J.; SUKUMARAN, P.; ALWARAPPAN, S.; WONG, D. K. Strategic applications of nanomaterials as sensing platforms and signal amplification markers at electrochemical immunosensors. *Electroanalysis*, v. 28, p. 1730-1749, 2016.



HUTTER, J. N.; DECKER, C. F. Human papillomavirus infection. *Disease-A-Month*, v. 62, p. 294-300, 2016.

PINGARRÓN, J. M.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; GONZÁLEZ-CORTÉS, A. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. *Electrochimica Acta*, v. 53, p. 5848-5866, 2008.

SASSOLAS, A.; LECA-BOUVIER, B. D.; BLUM, L. J. DNA Biosensors and Microarrays. *Chemical Reviews*, v. 108, n. 1, p. 109-139, 2008.

SUCKEVERIENE, R. Y.; ZELIKMAN, E.; MECHREZ, G.; NARKIS, M. Literature review: conducting carbon nanotube/polyaniline nanocomposites. *Reviews in Chemical Engineering*, v. 27, p. 15-21, 2011.

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.

ROVINA, K.; SIDDIQUEE, S. Electrochemical sensor based rapid determination of melamine using ionic liquid/zinc oxide nanoparticles/chitosan/gold electrode. *Food Control*, v. 59, p. 801-808, 2016.

URREGO, L.F.; LOPEZ, D. I.; RAMIREZ, K. A.; RAMIREZ, C.; OSMA, J. F. Biomicrosystem design and fabrication for the human papilloma virus 16 detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 207, p. 97-104, 2015.

YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PINGARRÓN, J. M. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 382, n. 4, p. 884-886, 2005.

YANG, J.; ZHANG, W. Indicator-free impedimetric detection of BCR/ABL fusion gene based on ordered FePt nanoparticle-decorated electrochemically reduced graphene oxide. *Journal of Solid State Electrochemistry*, v. 18, p. 2863-2868, 2014.

## 6. AGRADECIMENTOS

À UFPE, PROPESQ, CAPES-Rede nanobio/ELINOR, CNPq e FINEP pelo auxílio para elaboração desta pesquisa.



# **CONTROLE DE QUALIDADE NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA**



ÁREA DE SUBMISSÃO: CONTROLE DE QUALIDADE E INDÚSTRIA FARMACÊUTICA –  
CQ 13

## DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DO AZUL DE METILENO RESIDUAL NA PRODUÇÃO DE COLA DE FIBRINA

D. M. D. SILVA<sup>1</sup>, E. M. M. SILVA<sup>1</sup>, A. S. L. OLIVEIRA<sup>1</sup> e D. C. G. BEDOR<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético  
E-mail para contato: danilo.bedor@nudfac.com.br

**RESUMO** – *O objetivo do trabalho foi desenvolver um método bioanalítico utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas para quantificação simultânea dos resíduos de azul de metileno (AZM) e de seus subprodutos (AZA, AZB e AZC) em plasma humano, e aplicação no controle de qualidade de lotes de cola de fibrina. Para o desenvolvimento do método foram definidas as condições espectrométricas, separação cromatográfica, otimização da ionização de acordo com as condições cromatográficas, definição do procedimento de extração, visando a obtenção de um método seletivo, linear, preciso e exato. A coluna utilizada na separação dos analitos foi a Zorbax SB-CN, 3.5 µm, 4.6 mm x 150 mm, com a fase móvel em modo isocrático constituída de formiato de amônio 5mM:acetonitrila (1:1, v/v), a uma taxa de fluxo de 0,5 mL.min<sup>-1</sup> e tempo de retenção de 5,4; 4,4; 4,83, 3,95 e 7,92 minutos para o AZM, AZA, AZB, AZC e violeta de metileno (VLM – padrão interno), respectivamente. A ionização foi por electrospray em modo positivo e o analisador de massas triploquadrupolo em modo de monitoramento de reações múltiplas 284>268, 256>214, 270>254, 242>200 e 343>299 para o AZM, AZA, AZB, AZC e VLM, respectivamente. O método demonstrou-se linear, seletivo, sem efeito residual e efeito matriz não significativo. Na cola de fibrina analisada, foram quantificados resíduo de azul de metileno e seus subprodutos dentro dos limites de aceitação.*

*Palavras-chave: Adesivo Tecidual de Fibrina, análise de resíduo, CLAE-EM/EM.*

**ABSTRACT** – *This study aimed to develop a bioanalytical method using high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry for simultaneous quantification of methylene blue (MB) residue and its related products (BA, BB and BC) in human plasma, this method is applied in the quality control of lots of glue*



*fibrin. For method development it were defined spectrometric conditions, chromatographic separation of the analytes and internal standard, optimization of ionization according to the chromatographic conditions and the extraction procedure setting in order to obtain a selective, linear, precise and accurate method. The column used for separation of analytes was the Zorbax SB-CN, 3.5  $\mu$ M, 4.6 mm x 150 mm with isocratic mobile phase consisting of ammonium formate 5mM:acetonitrile (50:50, v/v) at a rate of flow 0.5 ml.min, retention times were 5,4; 4,4; 4,83, 3,95 and 7,92 minutes for MB, BA, BB, BC and methylene violet (MV – internal standard), respectively. The ionization was electrospray in positive mode and triploquadrupole mass analyzer in multiple reaction monitoring 284>268, 256>214, 270>254, 242>200 e 343>299 for AZM, AZA, AZB, AZC and VLM, respectively. The method demonstrated being linear, selective, no residual and no significant effect matrix effect. In the analyzed fibrin glue, residue of methylene blue and its by-products were quantified within the acceptable limits, and therefore it were approved in quality control.*

*Keywords: Fibrin Tissue Adhesive, residue analysis, LC- MS/MS.*

## 1. INTRODUÇÃO

A cola de fibrina tem sido considerada o sistema mais eficaz para controlar hemorragia em procedimentos cirúrgicos e é defendida pela maioria dos cirurgiões como o material que melhor se aproxima do selante ideal (Valbonesi, 2006). É utilizada para simular os estágios finais da cascata de coagulação e é obtida através do crioprecipitado, que corresponde a fração de plasma obtida a partir do plasma fresco congelado, contendo glicoproteínas de alto peso molecular (Ghanem *et al.*, 2010).

Várias técnicas de esterilização e inativação viral têm sido utilizadas a fim de tornar esses produtos mais seguros e eficazes (Valbonesi, 2006). O azul de metileno, um corante catiônico, é utilizado durante o processamento da cola de fibrina como inativante viral (Seghatchian *et al.*, 2008; Valbonesi, 2006). O composto é adicionado no plasma antes da obtenção do crioprecipitado (Valbonesi, 2006), isentando risco de contaminação dos usuários por doenças infecciosas. Após a inativação viral, o azul de metileno é removido por um filtro especialmente projetado (Seghatchian *et al.*, 2008). Ao final do processo, o azul de metileno presente na cola de fibrina, deve estar dentro dos limites aceitáveis. Este processo é seguido pela Empresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia (Hemobrás).

Nos seres humanos o azul de metileno é metabolizado para produzir os metabólitos N-desmetilados, o azul B como metabólito majoritário e azul A como metabólito secundário, além destes, outro metabólito secundário é produzido, o azul C (Seghatchian *et al.*, 2008).

De acordo com o crescente interesse em azul de metileno como um potencial agente terapêutico, especialmente nas doenças do sistema nervoso central, os efeitos biológicos e

comportamentais do azul de metileno e os seus metabólitos, especialmente azul B, têm sido estudados (KIM *et al.*, 2013).

Algumas técnicas para quantificação de azul de metileno em amostras biológicas têm sido publicadas, tais como, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia por exclusão e espectrofotometria (Bélaz-David *et al.*, 1997; Borwitzky *et al.*, 2005; Gaudette, Lodge 2005; Turnipseed *et al.*, 1997 apud KIM *et al.*, 2013). Porém, muitas destas técnicas apresentam um tempo de execução longo (Kim *et al.*, 2013).

Diante disso, o presente trabalho é de extrema importância, já que visa desenvolver um método simples e sensível, capaz de quantificar o resíduo de azul de metileno e de seus produtos de degradação no controle de qualidade de lotes de cola de fibrina fabricados, comprovando que a remoção do azul de metileno é realizada de forma eficiente, de modo a não ultrapassar os limites permitidos. Além de aplicar o método no controle de qualidade de lotes de cola de fibrina produzidos pela Hemobrás.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

O azul de metileno, azul A, azul B, azul C e violeta de metileno (VLM, padrão interno) foram adquiridos da Sigma Aldrich (EUA). Os solventes empregados de grau CLAE, foram provenientes a partir de J. T. Baker (Darmstadt, Alemanha) e os outros produtos químicos foram de grau CLAE ou de mais alta qualidade. Foi utilizado o espectrômetro de massas triplo quadrupolar híbrido com íon trap Sciex 3200 QTRAP da SCIEX (Framingham, EUA), um sistema cromatográfico composto por duas bombas isocráticas (LC 30AD), degaseificador de fase móvel (DGU 20A3), um forno de colunas (CTO 20A), um amostrador automático (SIL 30AC) e um sistema controlador (CBM 20A), todos da Shimadzu (Kyoto, Japão).

Foram preparadas soluções estoque dos analitos e do padrão interno (PI) na concentração de  $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  diluídas em água ultrapurificada. Essas soluções primárias dos analitos foram diluídas com acetonitrila : água (1:1, v/v) + 0,1% ácido fórmico, para obter soluções em concentrações de 1, 3, 7, 10, 20, 30, 50  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Todas as soluções estoque foram armazenadas em tubos de vidro na geladeira protegidas da luz.

Para obtenção de seletividade, linearidade, precisão e exatidão, foram realizados: definição das condições espectrométricas; separação cromatográfica dos analitos e padrão interno; otimização da ionização de acordo com as condições cromatográficas; definição do procedimento de extração e otimização da espectrometria de massas e condições cromatográficas de acordo com o efeito matriz.

Para a separação dos compostos realizou-se testes com diferentes colunas. Foram avaliados para a fase móvel, os solventes aquosos, água e o tampão formiato de amônio (5mM). Em ambos os testes, o solvente orgânico utilizado foi o acetonitrila (ACN), em proporção de 50:50 (v/v). A concentração de ácido fórmico empregado para ionização dos compostos foi de 0,1%. Foram testados também para a fase móvel, o modo de eluição gradiente e isocrático. O



fluxo da fase móvel foi mantido em  $0,5 \text{ mL.mL}^{-1}$ . O volume de injeção para ser aplicado no método foi testado com 10, 20 e 30  $\mu\text{L}$ .

A ionização da fonte foi otimizada através da variação dos seguintes parâmetros: a polaridade de ionização da fonte (*electrospray* positivo ou *electrospray* negativo); temperatura da fonte; voltagem do capilar; gás de nebulização; gás de secagem auxiliar. Para realização da otimização dos parâmetros do analisador de massas no modo monitorização de reações múltiplas (MRM), foi utilizado a análise por injeção em fluxo (FIA), onde foram otimizadas as energias de colisão e voltagens de entrada e saída da célula de colisão.

O volume de matriz biológica a ser utilizada para o procedimento de extração foi selecionado após análises com 250, 500 e 700  $\mu\text{L}$ . Assim como, a concentração do VLM foi determinada após testes com 150 ng/mL e 75 ng/mL em água. Para indução da precipitação de proteínas plasmáticas, foram testados dois solventes extratores, o ACN puro e o ACN+1% de ácido perclórico. Em tubo de plástico de 2 mL foi alíquotado o plasma e em seguida adicionado o PI. A solução foi agitada durante 30 segundos, com posterior adição de 500  $\mu\text{L}$  do agente precipitante, seguido por agitação durante 1 minuto. Após este procedimento, a solução foi levada a centrifugação durante 10 minutos, a  $4^\circ\text{C}$  e 4000 xg. O sobrenadante foi transferido para *vials* e injetado no sistema CLAE-EM/EM (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas triploquadrupolo).

Foram avaliados os parâmetros de seletividade (amostras de seis diferentes indivíduos), efeito residual (*carryover*), efeito matriz, linearidade, precisão e exatidão nas concentrações referentes ao Limite Inferior de Quantificação (LIQ), Controle de Qualidade Baixo (CQB), Controle de Qualidade Médio (CQM) e Controle de Qualidade Alto (CQA). As soluções de CQB, CQM e CQA foram preparadas nas concentrações de 3, 10, 40  $\text{ng.mL}^{-1}$ , respectivamente.

A metodologia desenvolvida foi validada segundo aspectos descritos na RDC 27 de 17 de maio de 2012 e aplicada no controle de qualidade de cola de fibrina produzida pela Hemobrás. As avaliações foram realizadas em triplicata, do lote PI 1014371. Através do método desenvolvido, foram calculadas as concentrações de azul de metileno e de seus produtos de degradação presentes no lote da cola de fibrina.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição e a proporção dos solventes da fase móvel foram testados, sendo avaliadas a simetria e a relação sinal/ruído dos picos para definir qual solução utilizar. Vários testes foram avaliados para a separação dos compostos, minimizando o ruído e formato (assimetria menor que 1,2) e a largura dos picos dos analitos (número de pratos teóricos acima 2000).

A coluna cromatográfica empregada para quantificação dos compostos foi escolhida através de metodologia já descrita na literatura e de testes com colunas disponíveis no laboratório. Em estudo realizado por Kim e colaboradores (2013), a coluna utilizada para quantificação de AZM e AZB, foi a Zorbax HILIC Plus column (3,5  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 100 mm) e uma



fase móvel consistindo de 10:90 (v/v) de acetato de amônio 5mM:metanol, o que ofereceu a separação ótima do AZM e AZB e melhor sensibilidade. O AZM e seus produtos de degradação foram separados no presente estudo, por uma coluna Zorbax SB-CN, com dimensões de 4,6 mm x 150 mm e tamanho de partícula de 3,5  $\mu\text{m}$ .

Foram realizados testes com a fase móvel no modo isocrático e gradiente, com o objetivo de definir a melhor eluição de fase móvel para o método. Após realizados os testes, foram observados picos assimétricos no modo gradiente, isso pode ser explicado por uma afinidade maior do analito por um dos constituintes da fase móvel, sendo selecionado o modo isocrático para o método.

No primeiro teste realizado para escolha da fase móvel, foi utilizado ACN como solvente orgânico e a água como solvente aquoso. Foram adicionados aos solventes 0,1% de ácido fórmico para garantir ionização dos fármacos. No segundo teste, utilizou-se uma solução tampão (formiato de amônio 5mM) como solvente aquoso, mantendo ACN como solvente orgânico. Foi visto que a utilização da solução tampão como fase móvel melhora a simetria dos picos, isto porque os íons do tampão tem uma maior afinidade pela fase estacionária do que as moléculas do analito, permitindo a saída em uma velocidade constante das moléculas. Além disso, a solução tampão permitiu uma melhor resolução dos picos, aumentando a eficiência cromatográfica e uma maior seletividade por aumentar o fator de separação (Santos Neto, 2009). Dessa forma, a solução tampão foi escolhida como solvente aquoso da fase móvel.

Foram testados diferentes volumes de injeção da amostra, de 10  $\mu\text{L}$ , 20  $\mu\text{L}$  e 30  $\mu\text{L}$ . O volume de 10  $\mu\text{L}$  deixou a intensidade baixa para os analitos, principalmente para o AZC, diminuindo a sensibilidade do método para o analito, além de ter apresentado uma relação sinal/ruído menor quando comparado com o volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ . Para o volume de 20  $\mu\text{L}$ , os picos se apresentaram com uma intensidade elevada, uma relação sinal/ruído  $> 10$  e melhor exatidão do método quando comparada com os demais volumes de injeção. Enquanto que para o volume de injeção de 30  $\mu\text{L}$ , os picos apresentaram uma alta intensidade, porém com exatidão diminuída, possivelmente por saturação do equipamento. O volume de injeção selecionado para o método foi o de 20  $\mu\text{L}$ .

O tempo de análise do método foi de 10 minutos e os tempos de retenção do AZM, AZA, AZB e AZC foram de 5,4; 4,4; 4,83 e 3,95 minutos, respectivamente (Figura 1).

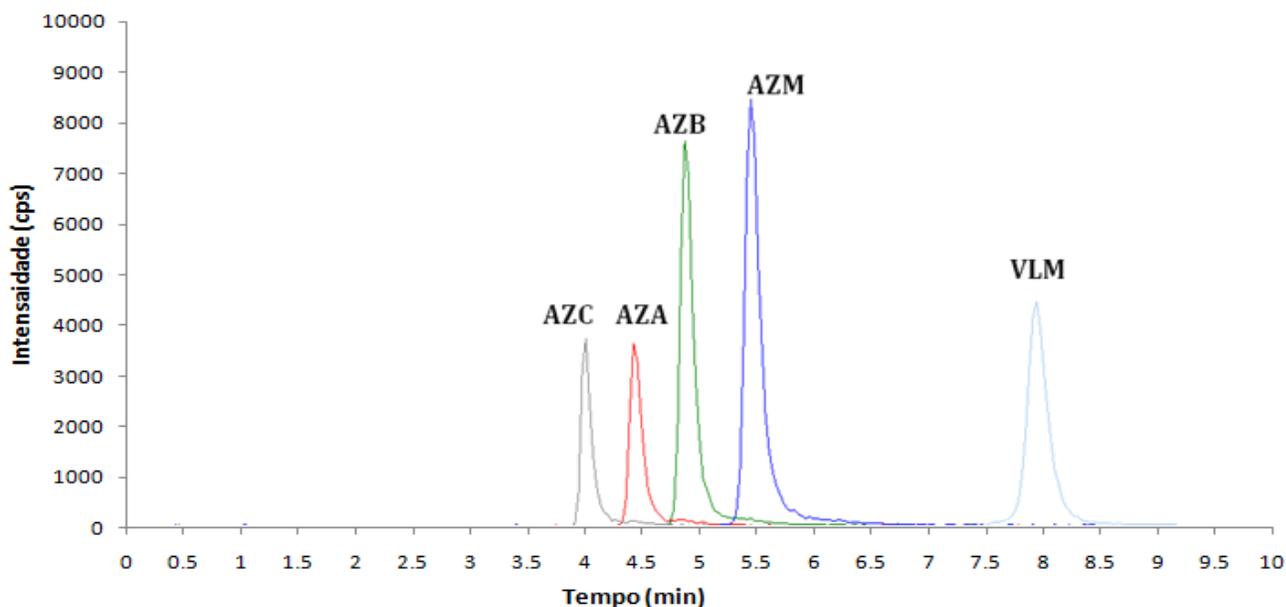


Figura 1 – Cromatograma dos analitos obtidos por CLAE-EM/EM.

O AZM, por apresentar em sua estrutura mais grupamentos metila, o que lhe confere uma menor polaridade em comparação com os demais compostos, apresentou maior afinidade pela coluna e, conseqüentemente, maior tempo de retenção. O inverso ocorre com o AZC que, dos analitos testados, é o que possui menor tempo de retenção por conta do seu caráter mais hidrofílico e maior afinidade pela fase móvel.

A fonte de ionização por electrospray foi utilizada para ionizar os compostos AZM, AZA, AZB, AZC e VLM, sendo selecionado o modo positivo de ionização (ESI+), o que permite aos fármacos receberem um cátion hidrogênio (H+). Os íons foram monitorados no modo de varredura MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas), oferecendo à técnica uma alta sensibilidade e seletividade (Gonçalves, 2007).

A otimização dos parâmetros da fonte foi conseguida através da análise por injeção em fluxo. Nesta análise é realizada injeção constante de uma pequena quantidade de analito enquanto os parâmetros da fonte são variados (Applied Biosystems, 2005 apud Oliveira, S., 2010), com o objetivo de promover picos estáveis e de alta intensidade. Os parâmetros otimizados encontram-se descritos na Tabela 1.

Analíto	Íon Precursor	Íon produto	DP(v)	EP(v)	CEP(v)	CE(v)	CXP(v)
AZM	284	268	76.000	9.000	16.000	41.000	4.000

AZA	256	214	86.000	8.500	14.000	39.000	4.000
AZB	270	254	71.000	9.000	16.000	41.000	4.000
AZC	242	200	71.000	10.000	16.000	43.000	4.000
VLM	343	299	76.000	10.500	30.000	43.000	4.000

Tabela 1 – Parâmetros da Espectrometria de Massas

Foram utilizados para a extração das amostras, plasma branco com padrão interno e plasma com concentrações de 1, 3, 7, 10, 20, 30 e 50 ng.mL<sup>-1</sup> dos analitos, CQB, CQM e CQA. O volume de matriz biológica selecionado para realizar o procedimento de extração foi o de 250 µL, já que os demais apresentaram uma menor exatidão. O volume adicionado do Violeta de Metileno na matriz biológica foi de 50 µL de uma solução de 150 ng/mL em água.

O agente precipitante é utilizado para realizar o *clean-up* da amostra e diminuir a interferência da matriz biológica na ionização do composto (efeito matriz). Foram testados dois agentes precipitantes a acetonitrila pura e acetonitrila com 1% de ácido perclórico, o ácido foi utilizado com o objetivo de deslocar os compostos de ligação às proteínas, melhorando a precipitação de proteínas, diminuindo a co-precipitação e aumentando a eficiência de extração. Essa extração mais eficiente do fármaco utilizando ácido como líquido extrator, corrobora com estudo realizado por Burhenne e colaboradores (2008), no qual foi observado que a extração para o AZM, utilizando 1% de ácido trifluoroacético em acetonitrila, apresentou taxas de recuperação de fármaco mais eficiente quando testadas com acetonitrila pura. O teste utilizando acetonitrila com 1% de ácido perclórico, promoveu uma melhor eficiência na extração e recuperação dos compostos, sendo este o líquido extrator selecionado para aplicação ao método.

Após a pré-validação o método desenvolvido mostrou-se seletivo (sem interferentes nos tempos de retenção dos compostos), linear (precisão e exatidão de ±15% para todos os níveis de concentração e de ±20% para o limite inferior de quantificação), preciso e exato (foram avaliadas intra- e inter-sequências), sendo portanto aplicado no controle de qualidade de cola de fibrina. O limite de aceitação estabelecido para o controle de qualidade, é que o somatório do AZM e seus produtos de degradação apresentem concentração inferior a 30 ng.mL<sup>-1</sup> no lote da cola de fibrina. A Tabela 2 apresenta as concentrações obtidas em triplicata de cada analito no lote analisado, observando que o somatório das concentrações dos analitos é de 29,13 ng.mL<sup>-1</sup>, ficando abaixo do valor estabelecido. Portanto, o lote analisado é aprovado de acordo com as especificações.

Tabela 2 – Concentrações e desvio padrão dos analitos presentes no lote analisado

AZM	AZA	AZB	AZC
7,42ng/mL	9,4ng/mL	5,12ng/mL	7,17ng/mL
7,15ng/mL	9,85ng/mL	4,82ng/mL	7,21ng/mL



	7,23ng/mL	9,97ng/mL	4,97ng/mL	7,07ng/mL
<b>Média</b>	<b>7,27 ng/mL</b>	<b>9,74ng/mL</b>	<b>4,97ng/mL</b>	<b>7,15ng/mL</b>
<b>Desvio Padrão</b>	0,138684	0,3005	0,15	0,072111

#### 4. CONCLUSÃO

O método desenvolvido por CLAE-EM/EM demonstrou-se adequado para quantificação simultânea de resíduo de azul de metileno e seus subprodutos em plasma humano. Visto que, o método se mostrou eficiente na separação dos analitos, sensível e seletivo, além de ser simples, sem necessitar de tempo longo de execução no preparo da amostra. O emprego deste método no controle de qualidade de cola de fibrina permite contribuir com o desenvolvimento de uma grande empresa do setor farmacêutico, a Hemobrás, atual produtora deste selante biológico.

#### 5. REFERÊNCIAS

- BURHENNE, J.; RIEDEL, K. D.; RENGELSHAUSEN, J.; MEISSNER, P.; MULLER, O.; MIKUS, G.; HAEFELI, W. E.; SACK, I. W. . Quantification of cationic anti-malaria agent methylene blue in diferente human biological matrices using cation exchange chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v. 863, p. 273–282, 2008.
- GHANEM, R. C; OLIVEIRA, R. F.; FURLANETTO, E.; GHANEM, M. A.; GHANEM, V. C. Transplante autólogo de conjuntiva com uso de cola de fibrina em pterígios primários. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, v. 73, n. 4, 2010.
- GONÇALVES, F. F. *Estudos de métodos empregando HPLC-DAD e LC-MS/MS para determinação de resíduos de herbicidas em água e solo do cultivo de arroz irrigado*. 148 f. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, 2007.
- KIM, S. J.; HA, D. J.; KOO, T. S. Simultaneous quantification of methylene blue and its major metabolite, azure B, in plasma by LC-MS/MS and its application for a pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*, v. 28, p. 518-524, 2013.
- OLIVEIRA, M. S. *Validação de metodologia analítica para análise de aflatoxina M1 e sua ocorrência em leite bovino comercializado no sul do Brasil*. 105 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos alimentos, Santa Maria, 2010.
- SANTOS NETO, A. J. Problemas com o formato dos picos em cromatografia líquida - Parte 1. *Scientia Chromatographica*, Universidade Federal de Alfenas, MG, v. 1, n. 3, p. 69-77, 2009.
- SEGHATCHIAN, J.; WALKER, W. H.; REICHENBERG, S. Updates on pathogen inactivation of plasma using Theraflex methylene blue system. *Transfusion and Apheresis Science*, v. 38, p. 271-280, 2008.
- VALBONESI, M. Fibrin glues of human origin. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, v. 19, n. 1, p. 191-203, 2006.

#### 6. AGRADECIMENTOS

Ao Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético da Universidade Federal de Pernambuco e à Empresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia (Hemobrás).



**DESENVOLVIMENTO E  
IMPLEMENTAÇÃO DE MÉTODOS  
*IN SILICO***



**ÁREA DE SUBMISSÃO:** DESENVOLVIMENTO E IMPLEMENTAÇÃO DE MÉTODOS *IN SILICO* – **DInsilico 1**

## **MODIMOL WORKBENCH: A WEB-BASED SCIENCE GATEWAY TO SUPPORT *IN SILICO* APPLICATIONS IN HPC ENVIRONMENTS**

K. R. CAVALCANTE<sup>1</sup> e M. Z. HERNANDES<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Química Teórica Medicinal

E-mail para contato: klauscavalcante@gmail.com, zaldini@gmail.com

*RESUMO – Metodologias computacionais têm sido cada vez mais empregadas para estudar sistemas moleculares, sua estrutura e comportamento, além da predição de suas propriedades físico-químicas. Desta forma, métodos in silico estão sendo largamente utilizados, especialmente no contexto da inovação terapêutica, devido principalmente a grande disponibilidade de programas (softwares) gratuitos e máquinas com capacidade computacional cada vez maior. Portais científicos fornecem meios para gerenciar dados e executar estes softwares em infraestruturas de HPC (clusters, grids e nuvens públicas/privadas) através de interfaces web intuitivas. Este presente trabalho apresenta o desenvolvimento de um portal científico, denominado Modimol Workbench, cujo principal objetivo é prover acesso a diferentes metodologias de modelagem molecular, assim como suporte para dispositivos móveis (smartphones e tablets) através de interfaces web responsivas projetadas especialmente para estes dispositivos, demonstrando um enorme potencial como uma nova ferramenta de pesquisa para a modelagem molecular, particularmente na inovação terapêutica.*

*Palavras-Chave: portal científico, virtual workbench, computação de alto desempenho, inovação terapêutica, dispositivo móvel.*

*ABSTRACT – Computational methodologies have been increasingly employed to study molecular systems, their structural representation and behavior elucidation, besides prediction of their physicochemical properties. Thus, in silico methods are being widely used, especially in the context of therapeutic innovation, mainly due to the huge availability of free softwares and hardware with greater computational capabilities, focused on molecular modeling applications. Science gateways provide ways to manage data and execute these softwares into HPC infrastructures (clusters, grids, or private/public clouds) through web-based friendly interfaces. This current work*



*presents the development of a science gateway, named Modimol Workbench, whose main goal is to provide access to different molecular modeling methodologies, as well as support for mobile devices (smartphones and tablets) through web responsive user interfaces designed especially for these devices, demonstrating an enormous potential as a new research tool for molecular modeling, particularly in therapeutic innovation.*

*Keywords: science gateway, virtual workbench, high-performance computing, therapeutic innovation, mobile device.*

## 1. INTRODUCTION

Molecular modeling is one of the research areas that has received great contribution from computing technologies in the last years, since it brought the ability to study, at the atomistic level, molecular systems ranging from small molecules up to complex systems, such as proteins and nucleic acids, through the simulation of their structures, behavior and properties. The main difficulty to apply "*in silico*" methodologies consists in the hardware requirements to perform these procedures (virtual screening of molecular libraries and *ab initio* quantum calculations, for example). These methods are generally computationally expensive (CPU-intensive), and therefore its usage in certain situations are limited to the existence of an infrastructure compatible with the required computational demand. Thus, new efforts have been directed towards High-Performance Computing (HPC) approaches to provide feasible platforms for running high processing power applications (Egi, 2016; Osg, 2016). In this context, it is worth mentioning that HPC strategies can reduce the costs involved in research and development of new drugs in a typical pharmaceutical industry up to 50% (Geldenhuis *et al.*, 2006; McGee, 2005).

For these purposes, science gateways are been increasingly employed as an intermediate layer between users and scientific applications running (as jobs) over HPC systems. A science gateway, in this case, is a facilitator environment that provides a portfolio of scientific applications, accessible remotely, through a friendly user interface and whose main goal is to avoid, from the interested end-users, the complexity to i) install new molecular modeling softwares, ii) submit and monitor jobs over the computing infrastructure (handling directly with resource schedulers through command line), and iii) keep the underlying system (hardware/operating system) properly working. The main advantage of this strategy lies in the fact that the user can interact with a certain software without knowing exactly on which resource(s) it will run inside the computing infrastructure, as well as without having to deal explicitly with the command line (input parameters, environment variables, etc.).

In this context, this work presents the development of a new science gateway, named Modimol Workbench, whose main goal is to provide an environment in which molecular modeling softwares are available to submit, monitor and analyze jobs, and where all generated results are organized to allow the visualization of job's information: activity history and running tracking (input/output data, and used parameters). The term Modimol comes from the acronym for "Modeling for Molecular Innovation" in portuguese, that corresponds to our research group's name.

One of the main features of the proposed platform is the ability to add dynamically new



softwares (or services) without needing of rebuild and redeploy a new version of the system (a common scenario found in some science gateways in which softwares are included as hard-coded elements using static user interfaces). Thus, all configuration data to the software starts working are provided at runtime, including the user interface components. Another highlighted difference in comparison with the other examples of science gateways (Goecks *et al.*, 2010; Néron *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 2015) is the presence of responsive user interfaces for mobile devices (smartphones and tablets, for example). It is important to stress that, nowadays, softwares (apps) to these platforms are more and more available, including those focusing on scientific applications (Feldt *et al.*, 2012; Rose, *et al.*, 2012; ImolView, 2016). Thus, the development of new scientific computational solutions must aim, for the future, the need of including suitable mobile versions.

## 2. MODIMOL WORKBENCH

Science gateways can be seen as facilitators among computational resources and its interested end-users. The Modimol Workbench environment was primarily designed and developed with this goal, but also aiming two important aspects: i) become the user experience with this kind of computational system more intuitive, and ii) make administration tasks easier. In our proposal, these premises are addressed through some key concepts. Firstly, researchers often need to submit several jobs before reaching the desired results. So, these jobs are logically associated, and, thus, must be joined together since they were generated for the same purpose (specific research). This concept is implemented in this work by organizing jobs in "activities". An activity may be created to map all performed actions throughout a specific research. Therefore, a job will always be available and accessible under its owner activity. This feature, beyond improving a high level comprehension for the user over his current researches (mapped as individual activities), also allows data tracking in a more efficient way.

Regarding to the administrative aspects, as mentioned in the previous section, softwares are included/updated dynamically (at runtime) by the system's administrator. In this way, the administrator just needs to access the maintenance system's interface, perform the changes, and save the new settings without rebuilding or restarting the system, since, these entities are not defined directly in system's source code or structured in XML configuration files.

Modimol Workbench has two important concepts: software and service. Typically, a software is an executable file (binary or script) while service can be seen as an instantiation of a software using a specific set of input parameters. Thus, for a given software, the system can maintain several services available with different goals for each of them.

### 2.1 Basic features

The Modimol Workbench system shares the same set of basic features commonly present in the majority of science gateways. These features are discussed below:

2.1.1 *Submission, monitoring and visualization of jobs.* A system user can submit and monitor his

jobs, and also detail all their information, such as status, processing time, selected service, standard output and generated files.

2.1.2 *Data tracking and visualization of activity history.* Jobs, as mentioned before, are organized in activities. Thus, every activity contains inherently a collection of jobs performed over time that, consequently, can be seen as the own sequence of actions done by user on that activity. Additionally, every accomplished job is immutable (only visualization is allowed), ensuring that the sequence of actions by the user upon his activities remains unchanged. The Figure 1 presents a screen that contains the general information about an activity.

The screenshot displays the MODIMOL WORKBENCH interface. At the top, there is a navigation bar with "Session (advanced)" and "Activity" dropdown menus. Below this, a breadcrumb trail shows "manage activities" and "activity details". The main content area is divided into three sections:

- Activity Information:**
  - Name:** Virtual screening of Trypanosoma Cruzi
  - Description:** Virtual screening tests with AutoDock Vina with focuses on Trypanosoma Cruzi targets
  - Created:** 2015/11/03 21:20:11 GMT-03:00
  - Disabled:**
- Sharing Information:**

Type	Name	Owner?	Read only?
	John Doe	✓	
	Joe Bloggs		✓
- Jobs:**

#	Service	Started	Finished	State	Result	
14	AutoDock Vina - CENAPAD-PE	2015/11/06 19:54:48	2015/11/06 19:55:11	FINISHED	SUCCESS	
11	AutoDock Vina - CENAPAD-PE	2015/11/05 23:08:49	2015/11/05 23:09:13	FINISHED	SUCCESS	
10	AutoDock Vina - CENAPAD-PE	2015/11/03 23:40:51	2015/11/03 23:41:10	FINISHED	SUCCESS	
9	MOPAC	2015/11/03 23:38:13	2015/11/03 23:38:13	FINISHED	SUCCESS	
8	AutoDock Vina - CENAPAD-PE	2015/11/03 23:26:52	2015/11/03 23:27:17	FINISHED	SUCCESS	
7	AutoDock Vina - CENAPAD-PE	2015/11/03 23:13:07	2015/11/03 23:13:07	FINISHED	SUCCESS	
6	MOPAC	2015/11/03 23:13:07	2015/11/03 23:13:07	FINISHED	SUCCESS	
5	AutoDock Vina - CENAPAD-PE	2015/11/03 23:01:35	2015/11/03 23:01:54	FINISHED	SUCCESS	
4	MOPAC	2015/11/03 23:00:56	2015/11/03 23:00:57	FINISHED	SUCCESS	
3	AutoDock Vina - CENAPAD-PE	2015/11/03 21:22:31	2015/11/03 21:22:50	FINISHED	SUCCESS	

Figure 1 – System screen detailing the information of an given activity.

2.1.3 *Data sharing.* This feature promotes the collaboration among users, allowing that activities be modified from non owner users (through submission of jobs, for example). In our case, any activity may be configured to enable two levels of sharing: visualization (read-only) and edition (permission to the collaborator user to submit new jobs into the activity).

2.1.4 *File management.* The system provides options to edit, copy, rename, delete, upload and

download files at the user's storage repository. Another available system's feature is the file conversion using the OpenBabel software (O'Boyle 2011). Additionally, users can visualize the stored files through a molecular visualization tool coupled in the system interface. This option presents the loaded molecular structure into the JSmol visualization software (JSmol, 2016). Similarly to OpenBabel, JSmol is also a well known and worldwide used tool, both with a huge community of users contributing to improve and add new features.

## 2.2 Technologies

The Figure 2 illustrates the overall system's architecture. The Modimol Workbench platform is composed by two main elements: i) an application server that runs the system itself, and ii) a database server which contains a Database Management System (DBMS), responsible for storing the system's data. The system is accessed through a web client from a desktop or a mobile device (smartphone or tablet, for example).

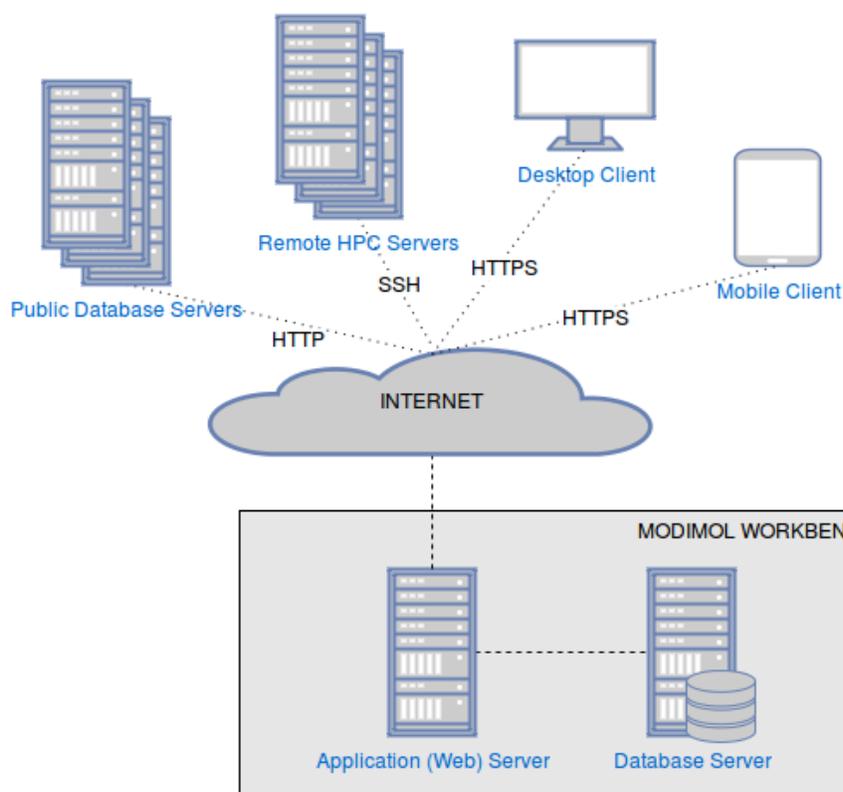


Figure 2 – Overall system's architecture.

The development of the Modimol Workbench system was carried out with the Java programming language and some programming frameworks and related technologies (including, but not limited to, Hibernate, Java Server Faces, PrimeFaces, HTML, CSS and Javascript). The core elements of the proposed platform was formed by the Apache Tomcat and the MySQL Server as the web application container and the DBMS, respectively.

The system can be integrated with external HPC environments through Secure Shell (SSH) connections. The system submits jobs to these remote infrastructures, in order to utilize their available computational resources, to run complex and high demanding tasks. Furthermore, the system provides an integration with some public database servers in order to make available the molecular structures directly from these remote services.

### 2.3 Integration with external public database servers

The majority of submitted jobs contains one or more associated files, needed as input data to run their respective services. These files may be formed by structural data of molecules, if they are used with molecular modeling softwares, for example. Basically, an user can obtain these kind of data from a file upload to the system, or typing (in an ASCII text pad) the content directly at the graphical interface. Beyond these sources, the system provides a way to retrieve chemical compounds directly from external public database servers. The current database servers, integrated with the system, are CACTUS (Cactus, 2016), ChemSpider (ChemSpider, 2016), PDB (Pdb, 2016), PubChem (PubChem, 2016) and ZINC (Zinc, 2016).

### 2.4 Mobile version

As mentioned at the introductory section, the Modimol Workbench system provides access to their features through mobile devices.

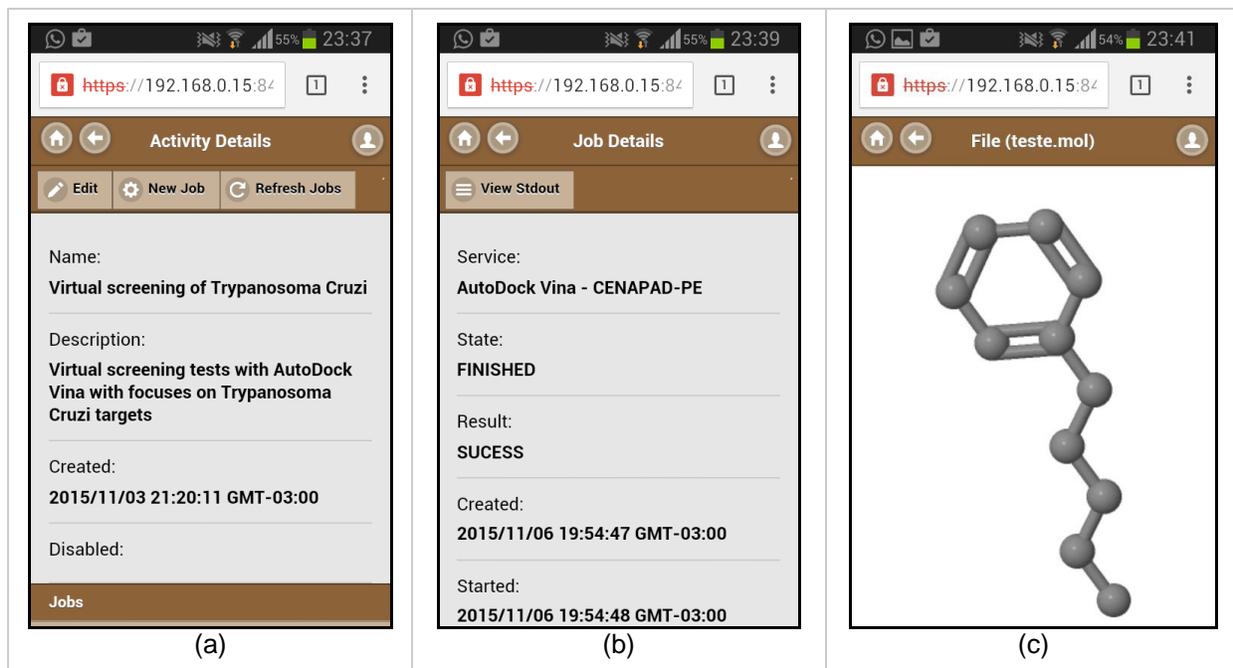


Figure 3 – Web responsive screens: a) Activity details; b) Job details; and, c) File visualization with JSmol tool.



The strategy of this work to provide the mobile access to the Modimol Workbench system was through the adaptation of the user interfaces to support automatically the screen dimensions of the mobile devices (responsive interfaces). The Figure 3 illustrates some system's responsive screens presented on a mobile device.

### 3. CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

This work has presented the development of the Modimol Workbench system, whose main goal is to provide a feasible and integrated platform to manage scientific softwares and user's data, and facilitate job related operations (submission, monitoring, analyzing, visualization, and tracking of executions). As a science gateway, the platform provides some highlighted features, such as the ability to manage softwares/services dynamically, without the need for restart or rebuild the system. Another important feature consists in organizing the user's jobs in activities, in such a way that, an user can visualize his personal researches in a higher level comprehensive way. Also, the system has the ability to obtain molecular structures from external public database servers. This option makes easier the job submission process, since the user can download the desired data directly from these servers, instead of searching and uploading the file from his personal machine. Finally, the system provides access from mobile devices (smartphones and tablets), through optimized responsive user interfaces. Thus, it can be concluded that the development effort of Modimol Workbench system allowed to provide a scientific portal where molecular modeling tools (services) can be used faster and in a more intuitive manner, especially by beginner users.

The perspectives for future work include: i) feature to release wasted space from user's personal storage area would be having a feature to archive and export 'inactive' activities to user's machine; ii) inclusion of workgroups, as a set of users with common goals and/or belonging to the same organization, in order to simplify and make easier the collaboration among the involved people; and also, iii) a more fine-grained control to monitor, intercede and query detailed information over the job remote executions, mainly for HPC resources.

### 4. REFERENCES

- egi. european grid infrastructure, 2016. disponível em <<http://www.egi.eu/>>. acesso em: 05 set. 2016.
- osg. open science grid, 2016. disponível em <<http://www.opensciencegrid.org/>>. acesso em: 05 set. 2016.
- geldenhuys, w. j., gaasch, k. e., watson, *et al.* optimizing the use of open-source software applications in drug discovery. *drug discovery today*, 11, 3-4, 127-132, 2006. doi:10.1016/s1359-6446(05)03692-5.
- mcgee, p. modeling success with in silico tools. *drug discovery and development*, 8(4), 24-28, 2005.
- goecks, j.; nekutenko, a.; taylor, j.; and the galaxy team. galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *genome biology*, 11(8), 86, 2010. doi:10.1186/gb-2010-11-8-r86
- néron, b.; ménager, h.; maufrais, c.; *et al.* mobyte: a new full web bioinformatics framework. *bioinformatics*, 25(22), 3005-3011, 2009. doi:10.1093/bioinformatics/btp493



gomes a. t. a.; bastos b. f.; medeiros v.; moreira v. m. experiences of the brazilian national high-performance computing network on the rapid prototyping of science gateways, *concurrency computat.: pract. exper.*, 27:271-289, 2015. doi:10.1002/cpe.3258

feldt, j.; mata, r. a.; dieterich, j. m. atomdroid: a computational chemistry tool for mobile platforms. *journal of chemical information and modeling*, 52(4), 1072-1078, 2012.

rose, p. w.; bi, c.; bluhm, w. f.; *et al.* the rcsb protein data bank: new resources for research and education. *nucleic acids research*, 41(d1): d475-d482, 2012.

imolview. imolview a mobile app for iphone/ipad and android, molsoft, l.l.c., 2016. disponível em: <<http://www.molsoft.com/imolview.html>>. acesso em: 05 set. 2016.

o'boyle, n. m.; banck, m.; james, c. a.; morley, c.; vandermeersch, t.; and hutchison, g. r. open babel: an open chemical toolbox. *journal of cheminformatics* 2011, 3:33. doi:10.1186/1758-2946-3-33

jsmol. a javascript-based molecular viewer from jmol, 2016. disponível em: <<http://sourceforge.net/projects/jsmol/>>. acesso em: 05 set. 2016.

cactus. cadd group cheminformatics tools and user services, national cancer institute, 2016. disponível em: <<http://cactus.nci.nih.gov/chemical/structure>>. acesso em: 05 set. 2016.

chemspider. royal society of chemistry, 2016. disponível em: <<http://www.chemspider.com/>>. acesso em: 05 set. 2016.

pdb. protein data bank, research collaboratory for structural bioinformatics (rcsb), 2016. disponível em <<http://www.rcsb.org/pdb/>>. acesso em: 05 set. 2016.

pubchem. national center for biotechnology information, u.s. national library of medicine, 2016. disponível em: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. acesso em: 05 set. 2016.

zinc. zinc database, university of california, ucsf, 2014. disponível em: <<http://zinc.docking.org/>>. acesso em: 08 fev. 2014.

## 5. ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the “Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho de Pernambuco” - (CENAPAD-PE) team for hosting and support the Modimol Workbench server.



ÁREA DE SUBMISSÃO: DESENVOLVIMENTO E IMPLEMENTAÇÃO DE MÉTODOS *IN SILICO* - **DIinsilico 2**

## **GRIDOMOL: NEW DEVELOPMENTS AND IMPLEMENTATIONS OF DISTRIBUTED COMPUTING FOR *IN SILICO* APPROACHES USED IN THERAPEUTIC INNOVATION**

L. F. G. R. FERREIRA<sup>1</sup>, M. Z. HERNANDES<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Corresponding E-mail: zaldini@ufpe.br

**RESUMO** – *Estima-se que o uso de métodos in silico pode reduzir os custos associados ao desenvolvimento de um novo fármaco em até 50%. Esta redução ocorre porque o número de moléculas que precisam ser testadas e sintetizadas experimentalmente passa a ser drasticamente reduzido devido a alta confiabilidade dos métodos computacionais. Porém, estes métodos podem apresentar uma alta demanda computacional quando o número de moléculas a ser testados é alto e quando se busca maior precisão nos resultados numéricos. Sendo assim, este trabalho apresenta o desenvolvimento do programa GriDoMol, uma plataforma unificada para realizar cálculos de docking molecular em um sistema distribuído, através de um grid computacional, com foco em alto desempenho e precisão. Utilizando o GriDoMol e configurações avançadas de docking, foi possível realizar o docking molecular de um conjunto de 213 complexos em um tempo até 9,91 vezes mais rápido e encontrando soluções de docking mais estáveis, com reduções de até 1,3 Kcal/mol, quando comparado com a execução sequencial deste mesmo conjunto em um único computador, utilizando apenas um núcleo de processamento e a configuração padrão de docking. O GriDoMol também oferece a opção de realizar estudos de vacinologia reversa permitindo cálculos de docking molecular entre candidatos a epítomos e alelos de MHCs de Classe I e II humanos com o intuito de encontrar epítomos que possuam uma boa afinidade por estes alelos, aumentando as chances de apresentar uma resposta imunológica significativa.*

*Palavras chave: Grid Computacional, Docking Molecular, Desenvolvimento.*

**ABSTRACT** – *It is estimated that the use of in silico methods can reduce the costs spent at the development stage of a new drug by up to 50%. This happens because the number of molecules that need to be experimentally synthesized and tested becomes drastically reduced due to the high predictability and reliability of the computational methods. Nevertheless, these methods may present a high computational demand when*



*the number of molecules to be tested is high and when it's seeking for a higher precision in the numerical results. Therefore, this work presents the development of the program GriDoMol, a unified platform for performing molecular docking calculations in a distributed system, through a computational grid environment, with focus in high performance and precision. By using GriDoMol and higher docking settings values, it was possible to execute the molecular docking of a set containing 213 complexes in a time up to 9.91 times faster and finding more stable complexes, with energy reduction by up to 1.3 Kcal/mol, when compared with the sequential execution of this same set on a single computer, using a single processor core and the default docking settings values. The program GriDoMol also offers a reverse vaccinology option, allowing the molecular docking of candidate epitopes on selected human MHC's Class I and II alleles, in order to find the most promising epitopes which have a good binding affinity on a large set of alleles and, thus, better chances of having a significant immunogenic response.*

*Keywords: Computational Grid, Molecular Docking, Development.*

## 1. INTRODUCTION

The molecular modeling is a computational method, commonly known as an *in silico* approach, that study the structures and properties of molecules, and analyze their intermolecular interactions to predict which molecules may have higher affinity for a biological target, for example. These methods aim to support the conventional laboratory tests (*in vitro* and *in vivo*) by predicting the structure and behavior for a large number of molecules, even before these molecules are experimentally synthesized. The importance of *in silico* methods have been noted by scientific community and by big pharmaceuticals companies around the world. It is estimated that the use of these methodologies can reduce the costs associated with drug discovery research by up to 50% (Geldenhuys *et al.*, 2006). This elevated cost reduction happens because the number of molecules that need to be experimentally synthesized and tested (*in vitro*, *in vivo*, *ex vivo*, etc.) becomes drastically reduced due to the high predictability and reliability of the computational methods (*in silico*).

The molecular docking, in particular, is extremely used in pharmaceutical innovation area, because it searches for a position and orientation that maximizes the intermolecular interactions between small ligand (potential drug) and a pharmacological target (biomacromolecules, typically) forming a complex by structural complementarity and energetic stabilization. Usually, a molecular docking study is based upon the knowledge of the three-dimensional structure of the pharmacological target, and several potential ligands (small molecules) are tested for binding in this target. Unfortunately, these methods may present a high computational demand when the number of molecules to be tested is very high and when it's seeking for higher numerical precision. In this context, it is possible to find initiatives of studies involving molecular docking being accelerated by powerful computing infrastructures (Buyya *et al.*, 2002; Abreu *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2008; De Vries; Van Dijk; Bonvin, 2010).



In this way, this work presents the development of the program GriDoMol, which is a unified platform to create, submit and manage molecular docking calculations in large scale under a distributed infrastructure of computational grid environment, for both drug discovery and reverse vaccinology cases.

## 2. METHODS

The program GriDoMol has been developed using the programming language JAVA (*Java*, 2016), a multi-platform language used worldwide that allows a high degree of portability.

Currently, the program GriDoMol operates using the distributed computing infrastructure of the computational grid middleware OurGrid (*Andrade et al.*, 2003). The OurGrid middleware has been chosen for this work because it is suitable for the execution of Bag-of-Tasks (BoT) applications, where the tasks have no logical or temporal dependence among themselves, which is exactly the case of molecular docking calculations. Thus, by using the OurGrid middleware it was possible to assemble a computational grid containing 8 computers with the same specifications, each having 2x Intel Xeon quad core (8 processor cores) and 16 GB RAM.

Two open-source and worldwide used molecular docking softwares are AutoDock (*Morris et al.*, 2009) and AutoDock Vina (*Trott; Olson*, 2010). The first version of the program AutoDock dates back to 1996 (*Goodsell; Morris; Olson*, 1996).

As the main objective of the GriDoMol program is allow the user to perform faster molecular docking calculations with increased precision in the docking solutions, tests were performed aiming to determine the time gain as more computers are added to the computational grid and the precision gain when using enhanced docking settings, which yield better numerical results at an increasing computational cost (time) per docking calculation. These results were compared with the experimental data. These tests were performed using a set of 213 complexes, composed by molecules with highly distinct properties, which is a subset from the complexes used by the biochemical group from the Zhejiang University (China) in a study about optimizing molecular docking score functions (*Wang et al.*, 2013). This molecule subset was composed of complexes available at PDBBIND data bank (*Liu et al.*, 2015), which includes the experimental values of binding energy for each of those 213 complexes and, thus, allowing direct comparison between the docking solutions and the experimental values.

For the performance gain (time) benchmark, the number of computers used to perform molecular docking with 213 complexes were alternated, systematically, from 1 to 8 computers. Additionally, as each computer used in this work possess 8 processors core (CPUs), tests were performed with the aim to verify the scale up when using different numbers of CPUs. Moreover, as the main goal is to compared the speed up scale when adding more computers, the speed up scale was measured as the time spent to perform the molecular docking for the set of 213 complexes using X computers divided by the amount of time spent to perform the molecular docking of the same molecule set using a single computer, at the same number of CPUs in each case. For example, the time needed to perform the 213 molecular docking calculations using 5 computers (each using 2 CPUs) has been divided by the necessary time to perform this same 213 molecular docking calculations with only 1 computer (also using 2 CPUs), resulting on the speed up scale factor. Thus,



we can see the speed up scale factor for the tests with these CPUs variants solely based on the number of computers used on each test.

For the accuracy of docking solutions benchmark, all the molecular docking calculations were carried out by the program AutoDock Vina. The EXHAUSTIVENESS parameter (EX#) is one of the most important for AutoDock Vina settings. Moreover, the exhaustiveness parameter was varied from 1 to 64, in a geometric progression of 2, resulting on values 1, 2, 4, 8, 16, 32 and 64, for this parameter. Happens that the higher this setting value is, the higher is the chances of finding a better docking result. Therefore, with this test, it is expected to identify possible "bottlenecks" where, even raising even further the exhaustiveness parameters besides this limit, the accuracy gain of the docking solution becomes minimal.

Typically, virtual screening tests takes place before the experimental tests are performed, in order to reduce the development costs by discarding the molecules with lower affinity for the chosen target. Thus, even if a docking program does not predict precisely the experimental values of binding energy (Trott; Olson, 2010), it is important that it can precisely identify the behavior of a large set of molecules (drug candidates), filtering which of these molecules have more affinity for the biological target than others. Therefore, it was compared the stability between each complex and the most stable complex (experimental) present on this molecular set, which was, in this case, the complex #58 (-16,17 kcal/mol). The Relative Percentage Difference, with the equation  $RPD = [E(\#x) - E(\#58)] / E(\#58)$ , where the binding energy of a given complex  $E(\#x)$  is subtracted by the binding energy of the reference complex  $E(\#58)$  and divided by the binding energy of this same reference complex, which results on the percentage that a given complex of this set is more (or less) stable than the reference complex. For instance, if a given complex has a value of -0,50 RPD, means that this complex is 50% less energetically stable than the complex #58.

The reverse vaccinology approach functionally implemented in the program GriDoMol will not be described in this present work, because it was reported on the peptide search for candidate epitopes with immunogenic response against Leishmania (E Silva *et al.*, 2016).

### 3. DISCUSSION AND RESULTS

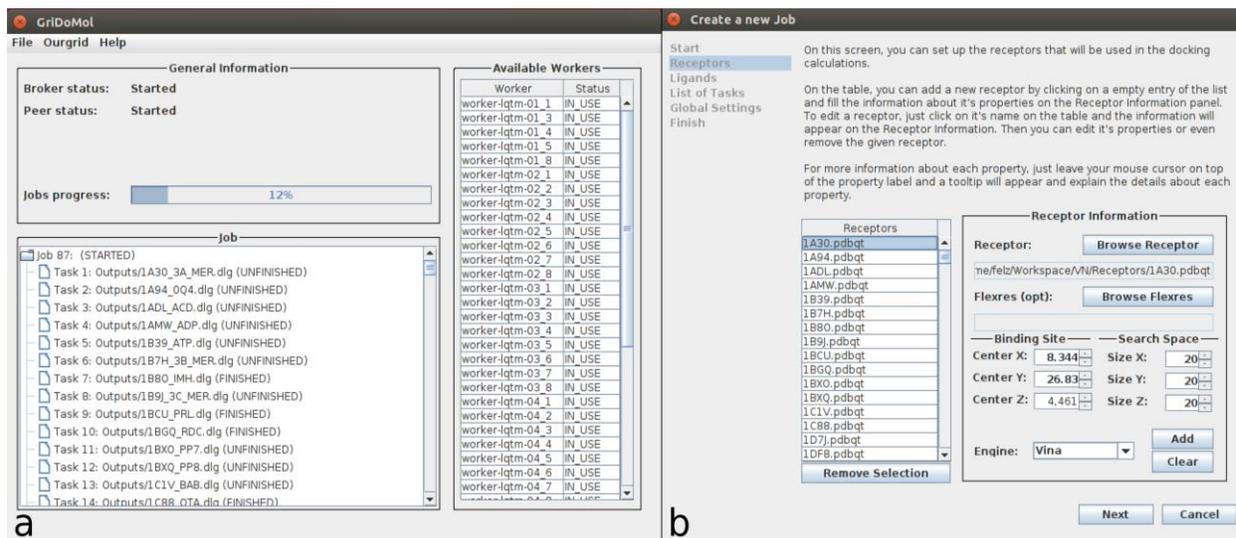


Figure 1 – The GriDoMol's main window (a) and one of the wizard steps for virtual screening job creation (b).

One of the highlights of GriDoMol when it's compared with other platforms is a friendly graphic interface (see Figure 1), which automates the generation and conversion of input files to the required format for both AutoDock and AutoDock Vina. The file format conversion from PDB (or MOL2) to PDBQT is carried out by adding hydrogens, removing water molecules, setting gasteiger charges, torsions branches (on ligands), among other actions. Additionally, the program GriDoMol automatically creates the GPF (Grid Parameter File) and DPF (Docking Parameter File) files for molecular docking calculations using the AutoDock program. Therefore, the only actions required by the user is to inform which docking program to use for each docking calculation, the receptor (pharmacological target) and ligand (drug candidate) file names, and the coordinates and size of the binding site through a "wizard" like window (see Figure 1b). Although the program GriDoMol distributes the docking calculations along the available computers that integrates the computational grid (worker machines), for the user's point of view, it seems like the whole set of docking calculations are being run at his own computer as he can track the overall progress in real time (see Figure 1a).

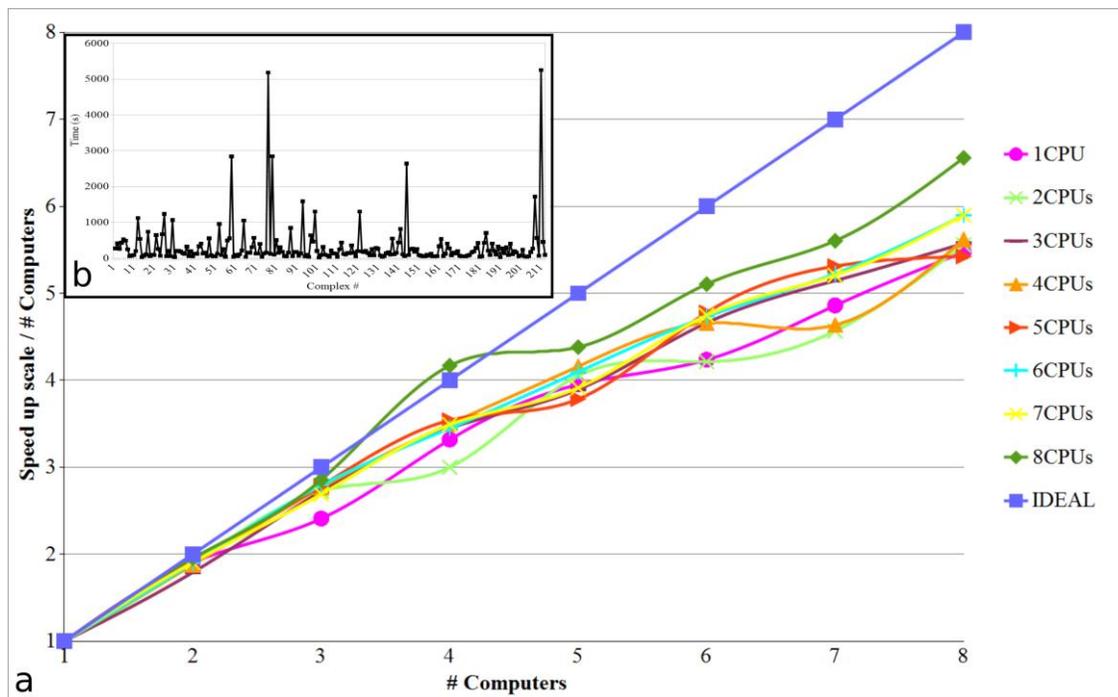


Figure 2 – The speed up scale as more computers are added to the computational grid for different AutoDock Vina's CPUs usages (a) and the individual molecular docking computational demand for each of the 213 complexes when using a single computer and a single processor core (b).

The speed up scale graphic (Figure 2a) shows how faster the set of 213 molecular docking calculations were performed as more computers were used in the computational grid, for different numbers of processor cores (CPUs) available to the AutoDock Vina program. The ideal values would be a scale up equal to the number of computers used, regardless of the number of CPUs. For instance, when using 5 computers, it is expected that the time required to perform the set of docking calculations will be reduced by 5 and, thus, being 5 times faster when compared to the time required to perform this same set of docking calculations on a single computer. It is important to note that the speed scale up gets higher as more computers are added, although it does not hit the ideal speed scale up on the great majority of cases. This speed up happens because as more computers are added to the computational grid, more molecular docking calculations are being done in parallel simultaneously, in different computers, reducing the total time spent performing these 213 molecular docking calculations.

Moreover, one can note that the speed up scale value for the test with 8 CPUs and 4 computers have surpassed the expected (IDEAL) speed up value. It is important to note that these computers integrating the computational grid have their own operational system and, thus, part of these computer's CPUs are periodically used by system processes in order to maintain these computers working. Happens that the molecular docking calculations, in special the ones that uses all CPUs (8 CPUs, in this study), leaves little computational resources for the computer's operational system, making it dispute computational resources with the molecular docking calculations, slowing down these docking calculations. This slowdown effect has higher impact on tests with only 1 computer and 8 CPUs as these tests tends to last longer, having higher chances of periodical



operational system processes disputing computational resources with the molecular docking calculation. Therefore, taking into consideration that the speed up scale metric uses the tests with 1 computer as the base for the speed up scale calculation, it is possible that the speed up scale values for some of the tests may exceed the IDEAL value, which was the case of the test with 8 CPUs and 4 computers, as the IDEAL value is just the expected value and not a theoretical limit.

Furthermore, one can note that the speed up scale increasingly differs from the ideal scale as more computers are added. In order to identify the reason behind this behavior, each computational demand (time) for molecular docking calculation have been displayed in Figure 2b. As these 213 complexes (receptors and ligands) differ in their molecular properties and sizes, it is natural that the individual computational demand required to perform each molecular docking may differ from complex to complex. Thus, the computational demand of each molecular docking calculation for each of these 213 complex, when using a single CPU, has been verified (Figure 2b). Hence, it has been observed that the third to last complex was the most time consuming molecular docking (5273 seconds) while most of molecular docking calculations has taken less than 1000 seconds (Figure 2b). This high demand for molecular docking calculation happened during the final docking calculations and, because of this, the remaining computers became idle while waiting for the last computer to finish this very high time consuming molecular docking calculation. Therefore, the idleness of the others computers limited the speed up scale gain in comparison to the theoretical ideal scale up. In this way, a new test has been performed altering the molecular docking executions order of those 213 complexes sorted by descending computational demand, that is, starting from the most time consuming execution to the least time consuming, using 8 computers (using 1 CPU each) and, thus, reducing the idleness at the final molecular docking calculations. The speed up scale has increased from 5.47 to 6.50, getting a little bit closer to the ideal predicted scale up of 8. Unfortunately, it is difficult to precisely know which molecular docking calculation may have a higher computational demand than another before performing the molecular docking and, thus, the original order of execution, which was alphabetical (random, in terms of computational demand), represents a typical molecular docking case.

In Figure 3 one can see the graphic of the Relative Percentage Difference (RPD) for each one of 213 complexes used in this work, taking into account the values 1, 8 and 64 for EXHAUSTIVENESS (EX) of AutoDock Vina, along with the RPD for the experimental values of binding energy (IDEAL). In this way, by comparing the stability behavior prediction with a very low (1), default (8) and very high (64) values of EX to the experimental behavior (IDEAL), one can see that, in most of the cases, increasing the exhaustiveness value also increases the prediction precision, nearing the experimental values of RPD. For instance, RPD value for the complex #210 has changed from -0.09 to -0.11, when increased the EX value from 8 (default value) to 64, getting closer to the value -0.14, observed experimentally (IDEAL).

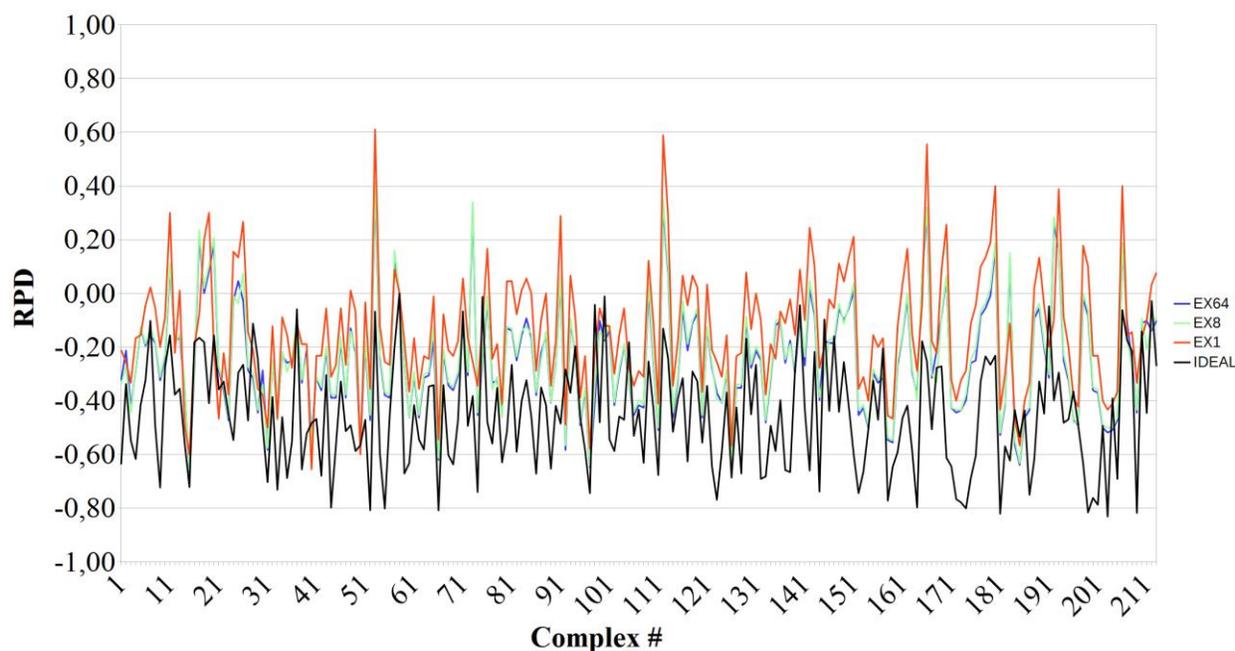


Figure 3 – The Relative Percentage Difference graphic for the 213 complexes docking solutions by varying the exhaustiveness parameter (EX1, EX8 and EX64) and the experimental values (IDEAL).

Furthermore, it has been noted that, in several cases, the RPD value for the molecular docking solutions have been positive (or, higher than zero), meaning that some of the AutoDock Vina setups (particularly EX=1) erroneously predicted that these complexes would be more energetically stable than the most stable experimental complex (reference complex: #58). This happens because, although the complex #58 is the most stable complex observed in experimental tests, it was not the most stable complex found by the docking solutions. Nevertheless, as aforementioned, by setting a higher value for the EXHAUSTIVENESS (EX) parameter of AutoDock Vina, the values of RPD gets more closer to the experimental (in vitro) values and, thus, contributes into the reduction of false positive and negatives obtained, when compared with those using lower EX values for molecular docking calculations.

#### 4. CONCLUSION

Based on both performance benchmark and accuracy tests, by using the GriDoMol software to create and submit molecular docking calculations into a computational grid environment, it is possible to perform a batch of molecular docking calculations faster and with a higher precision, when compared with the execution of the same calculations using only a single computer, and with default docking settings. By combining both the distributed execution on a computational grid, and enhanced docking settings, accelerating 9.91 times the molecular docking calculations when compared to a single computer using a single processor core, while being able to acquire docking solutions more energetically stable, resulting on binding energy reductions for each complex up to 1.3 kcal/mol, when compared with the default docking settings.



## 5. REFERENCES

- ABREU, R. M. V.; FROUFE, H. J. C.; QUEIROZ, M.; FERREIRA, I. MOLA: a bootable, self-configuring system for virtual screening using AutoDock4/Vina on computer clusters. *Journal of Cheminformatics*, v. 2, 2010. ISSN 1758-2946.
- ANDRADE, N.; CIRNE, W.; BRASILEIRO, F.; ROISENBERG, P. OurGrid: An approach to easily assemble grids with equitable resource sharing. In: FEITELSON, D.; RUDOLPH, L., et al (Ed.). *Job Scheduling Strategies for Parallel Processing*. Berlin: Springer-Verlag Berlin, v.2862, 2003. p.61-86. (Lecture Notes in Computer Science). ISBN 0302-9743.
- BUYA, R.; BRANSON, K.; GIDDY, J.; ABRAMSON, D. *The virtual laboratory: A toolset for utilising the world-wide grid to design drugs*. Los Alamitos: Ieee Computer Soc, 2002. 278-279 ISBN 0-7695-1582-7.
- DE VRIES, S. J.; VAN DIJK, M.; BONVIN, A. The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking. *Nature Protocols*, v. 5, n. 5, p. 883-897, 2010. ISSN 1754-2189.
- E SILVA, R. de F.; FERREIRA, L. F. G. R.; HERNANDES, M. Z.; DE BRITO, M. E. F.; DE OLIVEIRA, B. C.; DA SILVA, A. A.; PEREIRA, V. R. A. Combination of In Silico Methods in the Search for Potential CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T Cell Epitopes in the Proteome of *Leishmania braziliensis*. *Frontiers in Immunology*, 7, 327. 2016.
- GELDENHUYS, W. J.; GAASCH, K. E.; WATSON, M.; ALLEN, D. D.; VAN DER SCHYF, C. J. Optimizing the use of open-source software applications in drug discovery. *Drug Discov Today*, v. 11, n. 3-4, p. 127-32, Feb 2006. ISSN 1359-6446.
- GOODSELL, D. S.; MORRIS, G. M.; OLSON, A. J. Automated docking of flexible ligands: Applications of AutoDock. *Journal of Molecular Recognition*, v. 9, n. 1, p. 1-5, Jan-Feb 1996. ISSN 0952-3499.
- Java (2016). Available at: <<http://www.java.com/>>. Access date: October 2016.
- JIANG, X. H.; KUMAR, K.; HU, X.; WALLQVIST, A.; REIFMAN, J. DOVIS 2.0: an efficient and easy to use parallel virtual screening tool based on AutoDock 4.0. *Chemistry Central Journal*, v. 2, Sep 2008. ISSN 1752-153X.
- LIU, ZHIHAI; LI, YAN; HAN, LI; LI, JIE; LIU, JIE; ZHAO, ZHIXIONG; NIE, WEI; LIU, YUCHEN; WANG, R. PDB-wide collection of binding data: current status of the PDBbind database. *Bioinformatics (Oxford, England)*, v. 31, n. 3, p. 405-12, 1 fev. 2015.
- MORRIS, G. M.; HUEY, R.; LINDSTROM, W.; SANNER, M. F.; BELEW, R. K.; GOODSELL, D. S.; OLSON, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, v. 30, n. 16, p. 2785-2791, Dec 2009. ISSN 0192-8651.
- TROTT, O.; OLSON, A. J. Software News and Update AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, v. 31, n. 2, p. 455-461, Jan 2010. ISSN 0192-8651.
- WANG, WEI; HE, WANLIN; ZHOU, XI; CHEN, X. Optimization of molecular docking scores with support vector rank regression. *Proteins*, v. 81, n. 8, p. 1386-98, ago. 2013.

## 6. ACKNOWLEDGEMENTS

L.F.G.R.F. acknowledge the doctoral fellowship received from “Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco” (FACEPE). M.Z.H. acknowledge the research fellowships received from “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq).



**GESTÃO, ECONOMIA E SAÚDE**



ÁREA DE SUBMISSÃO: GESTÃO, ECONOMIA E SAÚDE – GE 1

## ANÁLISE DE CUSTO RELATIVO AO TRATAMENTO DA MICROCEFALIA NO PRIMEIRO ANO DE VIDA E SEUS IMPACTOS NA SAÚDE PÚBLICA.

A.L. da SILVA<sup>1</sup>; B.C. MORONE-PINTO<sup>2</sup>; F.C.M. PINTO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, Núcleo de Saúde Coletiva.

<sup>2</sup>Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Sociais e Aplicadas (CCSA), Ciências Econômicas.

E-mail para contato: fcmorone@gmail.com

**RESUMO** – *O objetivo deste estudo foi analisar os custos em saúde com o tratamento e acompanhamento de crianças com microcefalia no primeiro ano de vida, considerando a elevação nos casos de microcefalia associada à infecção materna pelo Zika Vírus. Trata-se de estudo exploratório-descritivo, com abordagem quantitativa. Esta pesquisa adota para a análise de custos a técnica de custeio por absorção. O tratamento dos agravos e problemas previstos no primeiro ano de vida de crianças com microcefalia totalizou R\$17.837,02/ano, os itens relacionados a procedimentos clínicos representaram a maioria dos gastos em saúde R\$13.124,4 no período observado, seguido de Procedimentos com finalidades diagnósticas, com um total de R\$ 1.932,77. Em relação à distribuição espaço-temporal de microcefalia no Brasil de acordo com as estimativas do custo anual são necessárias cerca de mais de R\$ 30.000,00 por ano para assistência de uma única criança com microcefalia no primeiro ano de vida. Em 2015 foram registrados 1.227 casos de microcefalia, destes 1.152 foram registrados na região nordeste, sendo esta a mais afetada pelo Zika vírus, gerando um custo aos cofres públicos de mais de R\$ 34.560.000,00 por ano em todo nordeste. Os dados do presente estudo mostram que houve no Brasil em 2015 uma grande elevação nos registros de casos de microcefalia, e, contudo, uma necessidade de reformulação da agenda da saúde pública.*

**Palavras chave:** *Análise de Custo; Microcefalia; Zika Vírus.*

**ABSTRACT** – *The aim of this study was to analyze the health costs of the treatment and monitoring of children with microcephaly in the first year of life, considering the increase in cases of microcephaly associated with maternal infection Zika virus. It is exploratory and descriptive study with a quantitative approach. This research adopts for the cost analysis the cost technique for absorption. The treatment of problems associated with microcephaly listed in the first year of life of children totaled R\$17,837.02/year, items related to clinical procedures accounted for most of the*

*spending on health R\$13,124.4 in the observed period, followed by procedures for purposes diagnostic, with a total of R\$1.932.77. Regarding microcephaly spatio-temporal distribution in Brazil according to the estimates of the annual cost are necessary about more than R\$30,000.00 per year for care of a single child with microcephaly in the first year of life. In 2015 were registered 1,227 cases of microcephaly, these 1,152 were registered in the Northeast, which is the most affected by Zika virus, generating a cost to the public coffers of more than R\$34,560,000.00 per year. The data from this study show that there was in Brazil in 2015 a large increase in recorded cases of microcephaly, and, however, a need to reform the public health agenda.*

*Keywords: Cost Analysis; Microcephaly; Zika Virus.*

## 1. INTRODUÇÃO

Desde outubro de 2015 estamos vivenciando um crescente aumento no registro de ocorrência de casos de microcefalia em recém-nascidos no Brasil (Oliveira, Coelho e França, 2015), de origem secundária, neste caso potencialmente relacionada à epidemia pelo vírus Zika, que atinge o feto no útero ou o lactente durante os períodos de rápido crescimento cerebral, em especial nos primeiros dois anos de vida (Pinto e Sá, 2013).

A microcefalia relacionada ao vírus Zika é uma doença nova que está sendo descrita pela primeira vez na história (Paho, 2015). No entanto, caracteriza-se pela ocorrência de microcefalia com ou sem outras alterações no Sistema Nervoso Central (SNC) em crianças cuja mãe tenha histórico de infecção pelo vírus Zika na gestação (Paraíba, 2015). Tal situação impacta nas condições de saúde pública, na medida em que pode ser acompanhada de epilepsia, paralisia cerebral, retardo no desenvolvimento cognitivo, motor e fala, além de problemas de visão e audição (Ashwal *et al.*, 2009).

A qualidade de vida das crianças e das famílias será afetada e a microcefalia pode ser responsável ainda pelo aumento da mortalidade neonatal infantil. Além do comprometimento da qualidade de vida das crianças e das famílias, as comorbidades associadas à microcefalia impactam fortemente o orçamento da saúde, visto que ampliam muito os gastos, por exigirem tecnologias de altos custos e inovadoras. Ela pode também impactar no orçamento individual/familiar, em que as famílias podem enfrentar diversas dificuldades, inclusive porque essas crianças precisam de cuidados especiais e do tempo dos pais, que muitas vezes precisam abandonar seu emprego. Além do impacto orçamentário, também, representam um desafio para a organização do SUS e para o processo de trabalho em saúde (Blisner, 2008).

Segundo especialistas em saúde, apesar dos estudos serem muito recentes, existem evidências que correlacionam esse aumento dos números de casos de microcefalia com o vírus Zika (transmitido pelo mosquito *Aedes aegypti*) (Brasília, 2015).

A Microcefalia não tem um tratamento específico, pois as intervenções dependem do grau de comprometimento da criança. O acompanhamento ideal é realizado por uma equipe multidisciplinar e é direcionado para as áreas de comprometimento, neurologista, neuropediatra, fonoaudiólogo, fisioterapeuta, psicólogo, terapeuta ocupacional, psicopedagogo e outras especialidades médicas (a depender do comprometimento) (Nanap, 2016).

Diante da relevância do tema o objetivo principal desse trabalho foi analisar os custos em saúde com o tratamento e acompanhamento de crianças com microcefalia no primeiro ano de vida,



considerando a elevação nos casos de microcefalia associada à infecção materna pelo Zika Vírus e seus impactos sobre a saúde pública.

## 2. ASPECTOS METODOLÓGICOS

Trata-se de estudo exploratório-descritivo, com abordagem quantitativa. Este método caracteriza-se pelo emprego da quantificação, tanto nas modalidades de coleta de informações, quanto no tratamento dessas através de técnicas estatísticas, desde as mais simples até as mais complexas (Gil, 2008; Richardson, 1989).

Foi realizada uma estimativa a partir da análise espaço-temporal da prevalência de microcefalia no Brasil nos últimos 5 anos (de janeiro de 2011 a janeiro de 2016). Os dados de janeiro de 2006 a 2013 foram obtidos no Sistema de Informação de Nascidos Vivos (SINASC) e no Sistema de Informação de mortalidade (SIM). Os dados de 2014 a janeiro de 2016 foram obtidos por meio de boletins epidemiológicos disponibilizados pelo ministério da saúde para levantamento do número de nascidos vivos e de mortalidade infantil e fetal de casos de microcefalia decorrente de infecções congênita, com possível associação ao vírus Zika durante a gestação.

Esta pesquisa adota para a análise de custos a técnica de custeio por absorção, que consiste na apropriação absoluta de todos os custos, neste caso, os concernentes à produção do cuidado integral (Drummond, Stoddart & Torrance, 1991).

Para a contabilização dos custos diretos com assistência à saúde, foi realizado um levantamento na literatura sobre os agravos e problemas de saúde previstos em crianças com diagnóstico de microcefalia. Diante do levantamento foram consultados diferentes protocolos de orientação ao tratamento da microcefalia, inclusive o Plano Nacional de Combate à Microcefalia e, de acordo com os problemas identificados, foram pesquisadas as condutas terapêuticas empregadas, sendo agrupadas nas seguintes categorias: procedimentos clínicos, cirúrgicos e com finalidade diagnóstica. Ainda de acordo com este levantamento foram apurados os tipos de cuidados/intervenções, o custo da assistência (valor unitário), a frequência esperada de atendimentos (quantidade de atendimentos/mês) e os custos da assistência no período de 1 ano.

Foi realizada também uma estimativa de custos considerando-se a frequência de intercorrências ou complicações da microcefalia. Para isto, o levantamento de literatura foi expandido, sendo pesquisadas as complicações e a frequência (%) de ocorrência para cada uma delas. Foram estimados o custo médio da intervenção (valor unitário), a frequência esperada de intercorrências e o custo médio das intervenções ajustado pela frequência de ocorrência.

Também serão estimados os custos diretos sanitários, como as despesas de pessoal, que neste caso são relativos aos salários dos profissionais de saúde nas especialidades apontadas no levantamento de literatura; de capital, referente à aquisição e à manutenção de bens imóveis para cobertura assistencial às crianças com microcefalia; e as despesas gerais (*overhead*), necessárias para manter a estrutura física das unidades de saúde identificadas.

A composição das despesas e a classificação dos custos foram embasadas no estudo de Marinho *et al.* (2011).

Os valores em reais dos custos diretos foram estimados por meio dos dados adquiridos pelo Sistema de Informação Hospitalar do SUS (SIH/SUS) e Sistema de Informação de Gerenciamento de Tabela de Procedimentos de Medicamentos, Órtese e Prótese e materiais do SUS (SIGTAP e OPM/SUS).

A análise epidemiológica está baseada na distribuição espacial e temporal, características demográficas, aplicação dos indicadores de prevalência, mortalidade e distribuição proporcional. Para comparação das tendências, expressas na inclinação das retas de regressão linear simples

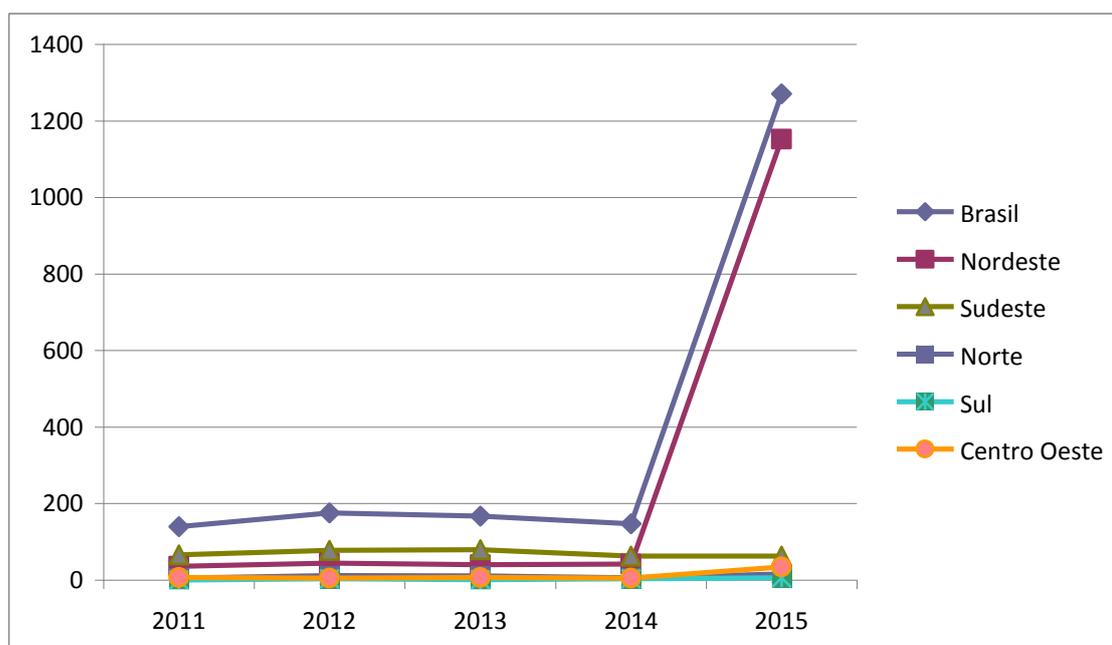
entre dados, serão calculadas a variação percentual ajustados dos casos de microcefalia obtida pela divisão estimada a mais ou menos em cada ano (dados fornecidos pelo cálculo da inclinação) pela incidência ajustada média do período.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Análise espaço-temporal da prevalência de microcefalia

Observa-se um expressivo aumento de casos de Microcefalia no Brasil, sendo registrados 1.227 casos de microcefalia em 2015, destes, a maioria foram registrados nos estados da região nordeste. Pernambuco é o estado com o maior número de casos de microcefalia, seguido da Bahia, Maranhão e Paraíba (Figura 1). Foram mais de mil casos de microcefalia notificados, o que representa um grande impacto na saúde pública, em relação a gravidade da doença, ao total de crianças afetadas pela doença e ao acesso a uma assistencial integral.

**Figura 1.** Números de casos de Microcefalia por região no período de 2011 a 2015 no Brasil.



Fonte: SINASC/DATASUS, Ministério da Saúde e Secretárias Estaduais. 2016.

#### 3.2 Análise de custos da provisão para a assistência à saúde em crianças com microcefalia no primeiro ano de vida

O tratamento dos agravos e problemas previstos no primeiro ano de vida de uma criança com microcefalia totalizou R\$17.837,02/ano. Os itens relacionados aos procedimentos clínicos representaram a maioria dos gastos em saúde R\$13.124,4 no período observado, seguido de procedimentos com finalidades diagnósticas (R\$1.932,77).

As complicações da doença que representam maiores custos são as lesões motoras crônicas e incapacitantes (R\$6.106,00), responsáveis pelo maior gasto/ano, seguidas das complicações neurológicas e comprometimento cognitivo (R\$3.621,06).

Assim, os custos são superiores a R\$30.000/caso/ano se considerarmos o tratamento com agravos e problemas previstos mais aqueles relacionados às complicações mais recorrentes.

### **3.3 Distribuição espaço-temporal da microcefalia no Brasil versus a assimilação absoluta de custos para a assistência à saúde no primeiro ano de vida**

Em relação à distribuição espaço-temporal de microcefalia no Brasil e os gastos em saúde é preocupante, pois segundo estimativas do custo anual são necessárias cerca de mais de R\$ 30.000,00 por ano para assistência de uma única criança com microcefalia no primeiro ano de vida. Em 2015 foram registrados 1.227 casos de microcefalia, destes 1.152 foram registrados na região nordeste, sendo esta a mais afetada pelo Zika vírus como ilustra a Figura 1, gerando um custo aos cofres públicos de mais de R\$34.560.000,00.

Cuidar de uma criança com microcefalia significa ser acompanhado por uma vida inteira, ou seja, os gastos em saúde relativo a doença permaneceram por toda a vida, sendo esta uma nova demanda do Sistema Único de Saúde. A região nordeste é uma região onde está concentrada metade da população brasileira que vive abaixo da linha de pobreza e onde a maioria da população depende exclusivamente do Sistema Público de Saúde.

De acordo com o Ministério da Saúde, o Brasil conta com uma rede de 1.544 serviços de reabilitação, são unidades que oferecem atendimento nas especialidades da reabilitação, nas modalidades auditiva, visual, intelectual e motora. Desse total, 138 serviços são Centros Especializados em Reabilitação (CER), unidades que disponibilizam de duas a quatro especialidades. A manutenção desses serviços de reabilitação segundo o Ministério da Saúde custa aos cofres públicos R\$650,6 milhões anuais.

De acordo com o Ministério da Saúde, o Plano Nacional de Enfrentamento à Microcefalia prevê a habilitação de outros 64 Centros Especializados de Reabilitação (CER), para cobrir “vazios assistenciais”, em regiões onde a oferta de Atenção Especializada não é suficiente. O custeio anual com esses novos CER é estimado em R\$135 milhões (Pompeo, 2016).

## **4. CONCLUSÃO**

Os dados do presente estudo mostram que, no Brasil até 2013, a média de nascimentos de crianças com microcefalia era de 12 crianças por ano em cada estado. Em 2015 houve uma grande elevação nos registros de casos de microcefalia possivelmente associada à rápida circulação do vírus Zika pelo país logo após a copa do mundo, resultando em uma grande epidemia de microcefalia por infecção congênita, sendo registrados 1.227 casos de microcefalia no Brasil. A Região Nordeste é a mais afetada pelo Zika, sendo responsável por 91% dos casos.

Os custos diretos sanitários ainda não foram estimados. Espera-se ao final deste estudo poder mensurar os custos totais em saúde com o tratamento e acompanhamento de crianças com microcefalia no primeiro ano de vida e ampliar a discussão sobre os impactos na saúde pública, considerando-se esta nova demanda assistencial.

## **5. REFERÊNCIAS**

ASHWAL S, MICHELSON D, PLAWNER L, DOBYNS WB. Practice parameter: Evaluation of the child with microcephaly (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology* [Internet]. 2009, 15;73(11):887–97.



- BLIESNER Magno. *Gestão de Custo na Saúde Pública: Análise dos custos dos serviços de Fisioterapia prestados pelo CERFI*. Balneário Camboriú/SC 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde; Secretaria-Executiva; Área de Economia da Saúde e Desenvolvimento. *Avaliação econômica em saúde: desafios para gestão no Sistema Único de Saúde*. Brasília: MS; 2008.
- BRASÍLIA (DF). Ministério da Saúde. Secretária de Atenção à saúde. *Protocolo de atenção à saúde e resposta à ocorrência de microcefalia relacionada à infecção pelo vírus Zika*. Versão N° 01. Brasília, dezembro 2015. 1ª edição – Brasília, 2015.
- DRUMMOND MF, STODDART GL, TORRANCE GW. *Métodos para la evaluación económica de los programas de atención de la salud*. Madri: Diaz de Santos SA; 1991.
- GIL, Antônio Carlos. *Método e técnicas de pesquisa social*. 6.ed. –São Paulo : Atlas, 2008.
- MARINHO MGS, CESSÉ EAP, BEZERRA AFB, CARVALHO IM. Análise de custos da assistência à saúde aos portadores de diabetes melito e hipertensão arterial em uma unidade de saúde pública de referência em Recife. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2011;55-6.
- NANAP. Núcleo de apoio de avaliação e neuropsicológica e acompanhamento psicoterapêutico (NANAP). *Microcefalia: Informações que você precisa ter*. Fevereiro 2016, <http://www.nanap.com.br/> 2016.
- OLIVEIRA WK DE, COELHO GE, FRANÇA GVA DE. *Boletim Epidemiológico - Situação epidemiológica de ocorrência de microcefalias no Brasil, 2015*. *Bol Epidemiológico da SVS/MS* [Internet]. 2015;46(34):1–3. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/19/Microcefalia-bol-final.pdf>
- PAHO. *Alerta Epidemiológica - Síndrome neurológico, anomalias congénitas e infección por vírus Zika. Implicaciones para lasalud pública enlas Américas*. 1 de diciembre de 2015 [Internet]. Washington: Pan American Health Organization; 2015. Available from: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&Itemid=270&gid=32404=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=32404=es)
- PINTO E SÁ, LEILA MARIA SINGH DE MACEDO. *Intervenção Precoce e Microcefalia. Estratégias de Intervenção Eficazes*. Mestrado em Ciências da Educação na Especialidade de Educação Especial no Domínio Cognitivo-Motor. Escola Superior de Educação João de Deus. Lisboa, julho de 2013. 182p. Disponível em: [http://comum.rcaap.pt/bitstream/10400.26/4571/1/Tese\\_Mestrado.pdf](http://comum.rcaap.pt/bitstream/10400.26/4571/1/Tese_Mestrado.pdf), acesso em maio de 2016.
- POMPEO, Carolina. *Tratamento de criança com microcefalia custa até R\$ 5 mil por mês*. março de 2016 Disponível em: <http://www.gazetadopovo.com.br/vida-e-cidadania/tratamento-de-criancas-com-microcefalia-custa-ate-r-5-mil-por-mes-f3oigzs38370xbf1hwoono083>, acesso em julho de 2016.
- RICHARDSON, Roberto Jarry. *Pesquisa social: métodos e técnicas*. São Paulo: Atlas, 1989.



ÁREA DE SUBMISSÃO: GESTÃO, ECONOMIA E SAÚDE - GE 2

## ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE GASTO PÚBLICO PER CAPITA EM SAÚDE E A TAXA DE MORTALIDADE INFANTIL NAS QUATRO MACRORREGIÕES DE SAÚDE DO ESTADO DE PERNAMBUCO NO PERÍODO DE 2008 A 2012

H. D. R. de LIMA<sup>1</sup>, P. R. G. CARDOSO<sup>2</sup>, M. G. R. PITTA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Centro de Ciências Sociais Aplicadas, Departamento de Economia

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Centro de Ciências Sociais Aplicadas, Departamento de Economia

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Centro de Ciências Sociais Aplicadas, Departamento de Economia

E-mail para contato: harleydavidsonrl@hotmail.com

**RESUMO:** *Considerando que a mortalidade infantil reflete o índice de desenvolvimento socioeconômico e cultural de uma determinada região; que a avaliação deste indicador deve definir desde investimentos em ações em saúde até investimentos financeiros, faz-se necessária a realização de estudos que possam analisar a relação entre a despesa per capita em saúde e a taxa de mortalidade infantil-TMI. Objetivo: Este trabalho objetivou analisar a relação entre a despesa per capita em saúde e o impacto na TMI nas quatro Macrorregiões do Estado Pernambuco no período de 2008 a 2012. Metodologia: Estudo quantitativo, descritivo com dados secundários. Foram analisadas as informações referentes aos 184 municípios de PE, sendo esses agrupados em 4 Macrorregionais de Saúde, de acordo com a divisão política administrativa de saúde do Estado. Os dados foram analisados através do método de Pearson e do modelo econométrico de regressão múltipla. Resultados: Na análise da correlação bivariada entre a despesa per capita em saúde e a TMI nas quatro Macrorregiões de saúde, os dados mostraram que as variáveis estão correlacionadas em todas as quatro Macrorregiões, com destaque para a Macrorregião II ( $p = 0,011$  e de  $r^2 = 0,91$ ), que apresentou a correlação mais significativa entre as Macrorregionais de saúde. Na montagem do modelo econométrico, os resultados mostraram que mesmo com a introdução de outras variáveis que também influenciam a TMI, o efeito da despesa per capita/ano na TMI continua significativo, conferindo a despesa per capita com saúde um grau de robustez.*

*Palavras chave: investimento, indicador e correlação.*



**ABSTRACT:** *Considering that infant mortality reflects the socio-economic and cultural development index of a given region; the evaluation of this indicator is set from investments in health actions to financial investments, it is necessary to carry out studies to analyze the relationship between per capita spending on health and mortality rate infantile- TMI. Objective: This study aimed to analyze the relationship between per capita spending on health and the impact on IMR in the four Macro regions Pernambuco State from 2008 to 2012. Methodology: quantitative, descriptive study of-the side. the information regarding the 184 municipalities of PE were analyzed, those grouped into 4 macro-regional Health, according to the administrative political division of health PE status. Data were analyzed using the Pear-son method and econometric multiple regression model. Results: In the analysis of the bivariate correlation between the per capita expenditure on health and IMR in four health Macro regions, the data showed that the variables are correlated in all four Macro regions, highlighting the macro-region II ( $p = 0.011$  and  $r^2 = 0.91$ ), which showed the most significant correlation between health macro-regional. In the assembly of the econometric model, the results showed that even with the introduction of other variables also influence the IMR, the effect of expenditure per capita / year in IMR remains significant, giving the per capita expenditure on health a degree of robustness.*

*Keywords: investment, index and correlation.*

## 1. INTRODUÇÃO

O financiamento da saúde tem-se constituído numa preocupação permanente dos gestores e de todos os envolvidos diretamente com a construção do sistema de saúde, tornando-se tema constante em todas as discussões das instâncias gestoras (CONASS, 2011). Sendo assim, o gestor se depara hoje com dois grandes dilemas: a quantidade de recursos cada vez mais escassos para garantir a universalidade e a integralidade do sistema, e a qualidade desses gastos, que deve ser aplicado de forma eficiente.

O debate nacional sobre as dificuldades do sistema oscila entre os que acreditam que a causa dos problemas reside no subfinanciamento e aqueles que pensam que o cerne é a má gestão dos recursos. O que tem prevalecido é a ideia de que tanto o financiamento insuficiente quanto à gestão inadequada dos recursos são responsáveis por um conjunto de estrangulamentos, os quais resultam em prejuízos à qualidade e ao acesso aos serviços (Brasil, 2012).

A qualidade dos gastos está diretamente relacionada à melhoria da capacidade e da eficiência da gestão. A qualidade dos serviços públicos de saúde segue sendo uma das principais necessidades para a sociedade. A situação crítica da saúde nos municípios proveniente da quantidade insuficiente de profissionais, falta de materiais, de medicamentos e de recursos é preocupante em todo Brasil (Queiroz *et al.*, 2013).

Uma forma de medição e monitoramento das atividades de saúde é através do estabelecimento de indicadores, tal uso têm desempenhado um papel importante na compreensão



e na resolução dos desafios no sistema de saúde. Um dos indicadores mais importantes para avaliação das condições de vida, das transformações socioeconômicas e dos serviços de saúde é o indicador da Taxa de Mortalidade Infantil - TMI. Na avaliação do The World Bank, (2013), a TMI relaciona-se direta e obviamente com o bem-estar humano, mostrando-se como indicador relativamente sensível do nível e da distribuição das condições de vida.

As estatísticas de mortalidade são uma importante ferramenta para o planejamento e avaliação das ações e serviços de saúde (Costa; Frias, 2011).

Deste modo, a redução da TMI a níveis mais aceitáveis pode refletir uma evolução de qualidade de vida. Andrade *et al.* (2006) defendem que as condições de vida, a dificuldade de acesso a bens e serviços pode ampliar risco de morte no primeiro ano de vida, confirmando que a TMI tem sido considerada um indicador sensível às condições sociais e de qualidade de vida da população.

Compreender a relação do investimento em saúde e a melhoria das condições de vida e de saúde da população é fundamental do ponto de vista do planejamento orçamentário do SUS Municipal. A partir dessas informações e de uma visão holística do financiamento do sistema público de saúde, os gestores passam a ter importantes subsídios para melhor organização dos sistemas, qualificando o processo de tomada de decisão e aprimorando o planejamento e a gestão do SUS.

Sendo assim, considerando que a mortalidade infantil reflete o índice de desenvolvimento socioeconômico e cultural de uma determinada região; que a avaliação deste indicador deve definir desde investimentos em ações em saúde até investimentos financeiros, faz-se necessário a realização de estudos que possam analisar a relação entre a despesa per capita em saúde e a TMI no Estado Pernambuco. Desse modo, este estudo objetivou analisar a relação entre a despesa per capita em saúde e a TMI nas quatro Macrorregiões Estado Pernambuco.

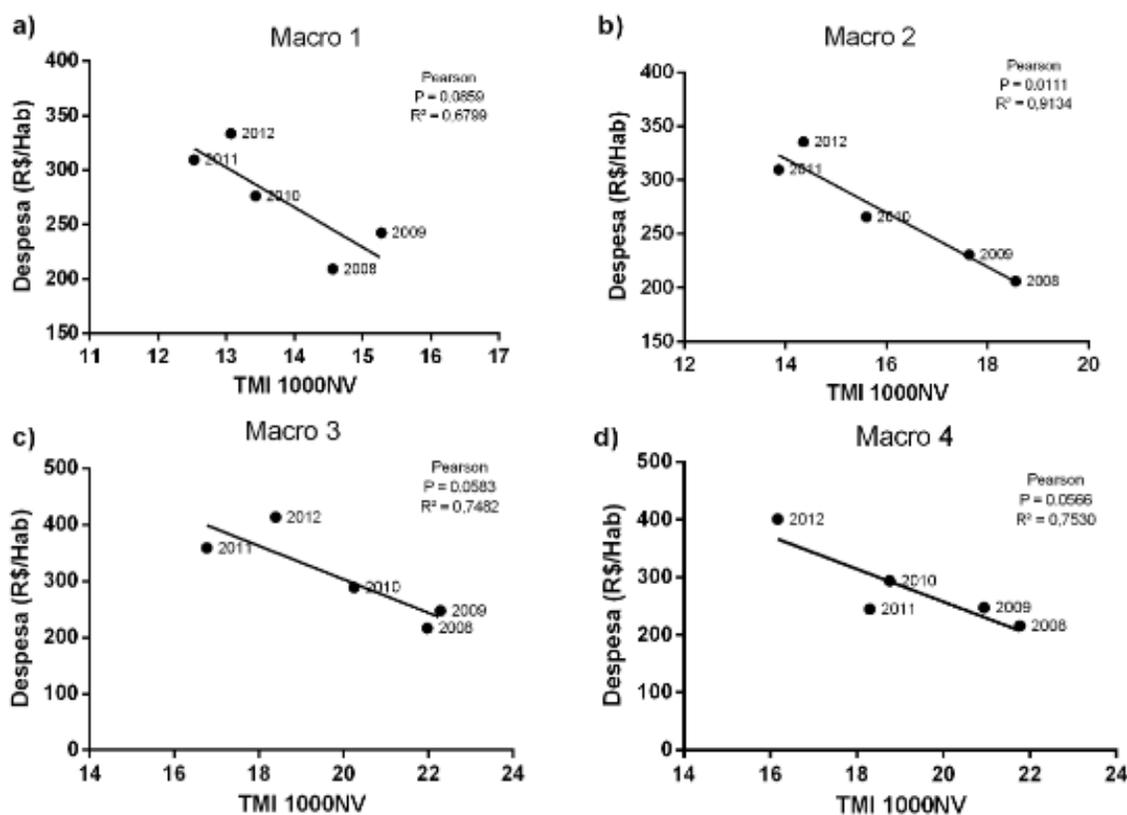
## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Estudo quantitativo, descritivo com dados secundários. Foram analisadas as informações referentes aos 184 municípios de PE, sendo esses agrupados em 4 Macrorregionais de Saúde, de acordo com a divisão política administrativa de saúde do Estado. Os dados foram analisados através do método de Pearson e do modelo econométrico de regressão múltipla. Os dados desse estudo foram extraídos principalmente do Sistema de Informações sobre Orçamentos Públicos em Saúde-SIOPS, que segundo o Ministério da Saúde, o SIOPS “faculta aos Conselhos de Saúde e à sociedade em geral a transparência e a visibilidade sobre a aplicação dos recursos públicos no setor saúde” e deve servir como ferramenta para a gestão no que tange a decisão e negociação no referido setor (BRASIL, 2007). Também foram utilizados os dados secundários dos sistemas de abrangência nacional: o Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) e o Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos (SINASC), disponibilizados na rede mundial de computadores através do Departamento de Informática do SUS (DATASUS). Dados do Fundo de Participação dos Municípios (FPM), disponibilizados pelo Tribunal de Contas da União-TCU, do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE e do Departamento de Atenção Básica-

DAB. Foram coletados os dados de 2008 a 2012. Este período foi escolhido em função de 2012 ser o último ano com dados completos disponíveis no SIOPS no período da pesquisa.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Figura 01** – Taxa de Mortalidade Infantil (1000 NV) por despesa per capita em saúde/ano nas quatro Macrorregionais de Saúde de Pernambuco, no período de 2008 a 2012.



Fonte: SIM/SINASC/SIOPS, 2008 a 2012.

Os resultados mostram que a Macrorregião II, apresentou a correlação mais forte entre as Macrorregionais de saúde com o valor de  $p = 0,0111$  e de  $r^2 = 0,91$ . Assim, pode-se dizer que 91% da variação da taxa de mortalidade pode ser explicada pela despesa com saúde. Nas Macrorregiões I, III, e IV observa-se uma correlação média entre a TMI e a despesa per capita em saúde. A Macrorregião I foi a que apresentou menor correlação entre as duas variáveis, com valor de  $p = 0,0859$  e  $r^2 = 0,67$ . Nas Macrorregiões III e IV obtivemos uma correlação com valor de  $p = 0,0583$  e valor de  $r^2 = 0,74$  e valor de  $p = 0,0566$  e  $r^2 = 0,75$  respectivamente.

A Macrorregião II Agreste foi a que apresentou a maior correlação entre a despesa com saúde per capita e a redução da TMI. É possível que essa condição justifique-se normalmente a ganhos de qualidade de vida da população, como redução da taxa de fecundidade, aumento no



nível de escolaridade da mulher, acesso à água segura e a saneamento básico, e a serviços de saúde, além de ganhos na renda per capita e redução da concentração de renda.

Deve-se considerar também que a sede da Macrorregião II Agreste é a maior cidade do interior do Estado, destacando-se ainda como polo universitário, e reconhecidamente possui umas das maiores feiras ao ar livre do Brasil, o que impulsiona a economia e a renda da população. Além disso, nos últimos governos tem atraído grandes investimentos em saúde como a criação de hospitais gerais e de referência em saúde da mulher. Todos esses fatores têm contribuído diretamente para a promoção de qualidade de vida das pessoas dessa Macrorregião e tem revelado uma discrepância de desenvolvimento em relação às outras. Logo, essas circunstâncias têm favorecido a diminuição da TMI. Desse modo, a despesa com saúde per capita demonstra em seu resultado uma robustez em relação à diminuição da TMI, contudo sendo reflexo de inúmeras outras variáveis.

Para as outras Macrorregiões principalmente a III e IV as variáveis despesa com saúde per capita/ano e a TMI mostraram-se menos impactantes. Esse quadro sugere que mesmo com o aumento do investimento em saúde nos últimos anos, e que neste caso foi maior que nas outras Macrorregiões, não forem acompanhados de outros investimentos sociais, as disparidades regionais tendem à cronificação. E que apesar dos avanços alcançados com a diminuição da TMI, ainda encontram-se muito aquém dos indicadores das outras Macrorregiões o que confirma o desenvolvimento desigual das regiões do Estado.

A caracterização da situação educacional como um condicionante tem sua relevância demonstrada quando se verifica que “as maiores taxas de mortalidade infantil no Brasil apresentam-se associadas tanto aos estados com mais baixos graus de escolarização feminina, quanto às regiões brasileiras com os mais débeis indicadores socioeconômicos” (Duarte, 2006, p.92).

O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE (2012) divulgou uma pesquisa, que aponta para uma representativa redução na mortalidade infantil entre 2000 e 2010. Em Pernambuco, o registro desse tipo de óbito passou de 4.885, em 2000, para 2.083 em 2010, atingindo um decréscimo de 67,3%.

A análise da TMI do Brasil, aponta uma trajetória de redução em todas as regiões do Brasil (Brasil, 2008). Entretanto, essa redução não é igual em todas as regiões. As TMI são mais baixas nas regiões que apresentam maior desenvolvimento econômico. Entre as regiões do país, o Nordeste registra a queda mais expressiva da mortalidade infantil. No período de 2000 a 2010, o índice passou de 44,7 para 18,5 óbitos para cada mil crianças. Porém, ainda é o nível mais alto do Brasil. O menor índice é o do Sul, de 12,6 mortes. (IBGE, 2012).

A TMI atual do Brasil revela uma grande distância em relação ao de países como Cuba (5/1.000 NV) e Costa Rica (10/1.000 NV), apesar da evidenciada diferença da situação econômica entre eles. Esta observação é válida para comprovar que mais importante que a melhoria de indicadores econômicos, como a renda per capita, é como a riqueza do país é utilizada em benefício das condições de vida da sua população (Bonatto; Carandina, 2009).

Estudos realizados sobre a mortalidade infantil evidenciam também uma tendência de declínio no mundo (Chang *et al.*, 2011; Oestergaard *et al.*, 2011). Entretanto, esta queda apresenta padrões distintos, evidenciando diferenciais no risco de morte antes do primeiro ano de vida. Desse modo, mesmo com todos os avanços mencionado há diferenças regionais da

mortalidade infantil que podem ser observadas pelas taxas. Assim, as Macrorregiões de Pernambuco seguem a tendência do país, apresentando diminuição da mortalidade infantil, porém com grandes diferenças entre elas, explicadas pelos diferentes estágios de desenvolvimento econômico de cada região.

Com o intuito de dar mais robustez aos resultados obtidos, realizou-se modelos de regressão múltipla, para verificar a correlação entre a despesa per capita com saúde e a Taxa de mortalidade infantil mediante a introdução de outras variáveis.

## a) Macrorregião I

Variável independente	Coefficiente	R <sup>2</sup>	Desvio padrão	P-valor
Despesa com saúde per capita/ano	-1.502727	0.0273	.7199828	0.041
Índice Firjan Educação	-40.67556		19.93596	0.045
Bolsa Família	-33.68651		52.71291	0.525
Cobertura ESF	-.0378963		.0708877	0.595
Taxa de Médicos	.2952366		2.572237	0.909
Constante	65.78636		15.50637	0.000

Fonte: Elaborada pelo autor.

## Macrorregião II

Variável independente	Coefficiente	R <sup>2</sup>	Desvio padrão	P-valor
Despesa com saúde per capita/ano	-19.22691	0.0535	9.067452	0.039
Índice Firjan Educação	-46.16577		26.02315	0.082
Bolsa Família	-95.91961		86.35257	0.272
Cobertura ESF	-.0909723		.0844753	0.286
Taxa de Médicos	10.59759		8.815113	0.235
Constante	179.7264		43.37398	0.000

Fonte: Elaborada pelo autor.

## Macrorregiões III e IV

Variável independente	Coefficiente	R <sup>2</sup>	Desvio padrão	P-valor
Despesa com saúde per capita/ano	-1.731181	0.0437	1.379622	0.214
Índice Firjan Educação	-21.47098		19.66907	0.279
Bolsa Família	-191.2863		67.93876	0.007
Cobertura ESF	.1730903		.1186213	0.150
Taxa de Médicos	2.856839		6.558744	0.665
Constante	73.57413		14.02529	0.000

Fonte: Elaborada pelo autor.



Para o Estado de Pernambuco, as variáveis que não se apresentaram significativamente correlacionadas com a taxa de mortalidade foram a cobertura da Estratégia de Saúde da Família e taxa de médicos, sendo os resultados diferentes do esperado. As variáveis importantes para a redução na taxa de mortalidade infantil foram: despesa com saúde per capita/ano, escolaridade e renda através do Programa Bolsa Família. Assim, quando a despesa com saúde per capita aumenta em 1%, a probabilidade da TMI se reduzir é de 1,95%. Por outro lado, verificou-se que as variáveis renda e escolaridade foram ainda mais significantes na redução da TMI do que a variável estudada.

Para o modelo da Macrorregião I, as variáveis que não apresentaram significância foram: renda através do PBF, cobertura da Estratégia Saúde da Família e taxa de médicos, sendo diferentes do esperado. As variáveis importantes para a redução na taxa de mortalidade infantil foram: despesa com saúde per capita/ano e escolaridade. Assim, quando a despesa com saúde per capita/ano aumenta em 1%, a probabilidade da TMI se reduzir é de 1,5%.

Para o modelo da Macrorregião II, as variáveis que não apresentaram significância foram: renda através do PBF, cobertura da Estratégia Saúde da Família e taxa de médicos, sendo diferentes do esperado. As variáveis importantes para a redução na taxa de mortalidade infantil foram: despesa com saúde per capita/ano e escolaridade. Assim, quando a despesa com saúde per capita/ano aumenta em 1%, a probabilidade da TMI se reduzir é de 19,2%.

Para as Macrorregiões III e IV as variáveis despesa com saúde per capita/ano e a TMI mostraram-se estatisticamente independentes. Para essas duas regiões a única variável com efeito estatístico para redução da TMI foi a renda através do PBF. Esse quadro sugere que mesmo com o aumento do investimento em saúde nos últimos anos, e que neste caso foi maior que nas outras Macrorregiões, não forem acompanhados de outros investimentos sociais, as disparidades regionais tendem à cronificação. E que apesar dos avanços alcançados com a diminuição da TMI, ainda encontram-se muito aquém dos indicadores das outras Macrorregiões o que confirma o desenvolvimento desigual das regiões do Estado.

#### 4. CONCLUSÃO

No presente trabalho, observou-se que na análise da correlação bivariada entre a despesa per capita em saúde/ano e a Taxa de Mortalidade Infantil-TMI nas quatro Macrorregiões de saúde do Estado de Pernambuco, os dados mostraram que as variáveis estão correlacionadas em todas as quatro Macrorregiões, com destaque para a Macrorregião II, que apresentou a correlação mais significativa entre as Macrorregionais de saúde.

Na montagem do modelo econométrico, os resultados mostraram que mesmo com a introdução de outras variáveis que influenciam a TMI, o efeito da despesa per capita/ano continua significativo, conferindo a despesa per capita com saúde um grau de robustez na redução da TMI.

A partir da constatação deste estudo, percebe-se uma correlação entre aumento da despesa per capita com saúde e a diminuição da TMI. Contudo, há diferenças regionais da mortalidade infantil que podem ser observadas pelas taxas. Assim, as Macrorregiões de Pernambuco seguem a tendência do país, apresentando diminuição da mortalidade infantil, porém com grandes



diferenças entre elas, explicadas pelos diferentes estágios de desenvolvimento econômico de cada região.

## 5. REFERÊNCIAS

ANDRADE, S. M. *et al.* *Condições de vida e mortalidade infantil no Estado do Paraná, Brasil, 1997/2001*. Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 22, n.1, p. 181-189, jan. 2006.

BONATTO, C. P. P.; CARANDINA, L. *Estudo da mortalidade infantil e de seus componentes para o município de Botucatu-SP no período de 1991 a 2007*. Pediatría, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 178-185, 2009. Disponível em:

<<http://www.pediatriasaopaulo.usp.br/upload/pdf/1306.pdf>>. Acesso em: 18 jun. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria-Executiva. Departamento de Economia da Saúde. *Investimentos e desenvolvimento*. Brasília, DF, 2012.

CHANG, J. *et al.* *Decreasing Trends of Neonatal and Infant Mortality Rates in Korea: Compared with Japan, USA, and OECD Nations*. J. Korean Med. Sci., Seoul, v. 26, p.1115-1123, 2011.

COSTA, J. M. B. S.; FRIAS, P. G. *Avaliação da completitude das variáveis da Declaração de Óbitos de Menores de um ano residentes em Pernambuco, Brasil, 1997-2005*. Ciênc. Saúde Coletiva, Rio de Janeiro, v.16, Supl. 1, p.1267-1274, 2011.

DUARTE, I. G.; FERREIRA, D. P. *Uso de indicadores na gestão de um centro cirúrgico*. Rev. Adm. Saúde, abr./jun. 2006.

IBGE. *Síntese de indicadores sociais 2012: uma análise das condições de vida da população brasileira*, 2012. Disponível em:

<[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaoodevida/indicadoresminimos/sinteseindicisociais2012/default.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/indicadoresminimos/sinteseindicisociais2012/default.shtm)>. Acesso em: 10 out. 2015.

MOORE, D. S. *The Basic Practice of Statistics*. New York: Freeman, 2007.

QUEIROZ, M. F. M., Silva, J. L. M., Figueiredo, J. D. S., &Vale, F. F. R. *Eficiência no Gasto Público com Saúde: uma Análise nos Municípios do Rio Grande*. Revista Econômica do Nordeste, 44, 761-776, 2013.

WORLD BANK. Working for a World Free of Poverty. *Brasil: aspectos gerais. Notas técnicas sobre Mortalidade infantil*. Disponível em:

<<http://www.worldbank.org/pt/country/brazil/overview>>. Acesso em: 12 fev. 2016.

## 6. AGRADECIMENTOS

Nossa imensa gratidão ao Ministério da Saúde que financiou esse projeto, e a Universidade Federal de Pernambuco que de modo tão dinâmico e motivador nos proporcionou a conquista de novos saberes.

ÁREA DE SUBMISSÃO: GESTÃO, ECONOMIA E SAÚDE - GE 3

## SISTEMAS DE INFORMAÇÃO DA ATENÇÃO PRIMÁRIA: TEMPO GASTO E NECESSIDADE NA PERCEPÇÃO DOS ENFERMEIROS

P. L. ARRUDA<sup>1</sup>, M. C. do NASCIMENTO<sup>2</sup> e F. E. C. V. FERNANDES<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade de Pernambuco, Campus Petrolina. Graduanda em Enfermagem.

<sup>2</sup>Universidade de Pernambuco, Campus Petrolina. Graduanda em Enfermagem.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pernambuco. Doutoranda pelo Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica. Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Gestão e Economia da Saúde. Professora Assistente da Universidade de Pernambuco, Campus Petrolina.

E-mail para contato: palloma-lobes@hotmail.com

**RESUMO** – *Este estudo teve como objetivo conhecer a percepção dos enfermeiros da Atenção Básica quanto à importância, a forma e o tempo do preenchimento dos instrumentos de registro do sistema de informação. Realizou-se um estudo exploratório com abordagem qualitativa por meio de entrevistas semiestruturadas com enfermeiros da Atenção Básica do município de Petrolina, Pernambuco. Foram entrevistados 41 enfermeiros cujos discursos foram harmonizados em duas categorias de análise: Fatores que influenciam o tempo de preenchimento dos instrumentos e o atendimento e Importância da alimentação do Sistema de Informação e necessidade de mudanças. Observou-se que fatores como a forma de preenchimento dos registros (eletrônico ou manual) e a falta de interoperabilidade entre os sistemas de informação influenciam no tempo de preenchimento dos instrumentos e no atendimento direto ao indivíduo. Os enfermeiros entrevistados reconhecem a importância da alimentação do sistema de informação para a organização das ações em saúde, mas também ressaltam a necessidade de mudanças nos formulários. Segundo os relatos, essa necessidade se dá devido ao grande número repetido de dados pela falta de integração desse sistema. Nesse contexto, seria importante que esses sistemas fossem interligados para diminuir a sobrecarga dos profissionais e reduzir o tempo de preenchimento, direcionando um tempo maior para a assistência, melhorando a qualidade da mesma.*

**Palavras chave:** *Sistema Único de Saúde; Gestão em Saúde; Tecnologia da Informação; Atenção Primária à Saúde.*

**ABSTRACT** - *This study aimed to know the perception of the primary care nurses about the importance, the manner and time of completion of recording instruments Information System. We conducted an exploratory qualitative study using semi-structured interviews*



*with nurses Basic Attention in the city of Petrolina, Pernambuco. Were interviewed 41 nurses whose speeches were harmonized in two categories of analysis: Factors influencing the filling time of the instruments and the service and the Information System feeding importance and need for change. It was noted that factors such as the filling in of records (electronic or manual) and the lack of interoperability among information systems influence the time of completion of the instruments and direct care to the individual. Nurses interviewed recognize the importance of information system power for the organization of health actions, but also highlight the need for changes in forms. According to reports, this need is due to the large number of repeated data by the lack of integration of the system. In this context, it is important that these systems were interconnected to reduce the burden on workers and reduce the filling time, directing more time to care, improving the quality of it.*

*Keywords: Unified Health System; Health Management; Information Technology; Primary Health Care.*

## 1. INTRODUÇÃO

A Política Nacional de Atenção Básica (PNAB) resultou da experiência acumulada de vários atores envolvidos historicamente com o desenvolvimento e a consolidação do Sistema Único de Saúde (SUS), como movimentos sociais, usuários, trabalhadores e gestores das três esferas de governo. No Brasil, a Atenção Básica (AB) é desenvolvida com alto grau de descentralização, capilaridade e próxima da vida das pessoas. Deve ser o contato preferencial dos usuários, a principal porta de entrada e o centro de comunicação com toda a Rede de Atenção à Saúde. Por isso, é fundamental que ela se oriente pelos princípios da universalidade, da acessibilidade, do vínculo da continuidade do cuidado, da integralidade da atenção, dentre outros (Brasil, 2012).

Nessa perspectiva, o enfermeiro é reconhecido pela habilidade interativa e associativa e por compreender o ser humano como um todo. Deve proporcionar a integralidade da assistência à saúde, pela capacidade de acolher e identificar-se com as necessidades e expectativas dos indivíduos interagindo diretamente com o usuário e a comunidade. Além disso, promove o diálogo entre os usuários e a equipe de saúde da família (Backes *et al.*, 2010).

Todas as ações desenvolvidas nos serviços de saúde do Sistema Único de Saúde são registradas e informadas em um sistema de informação. A atuação profissional na AB utiliza alguns recursos necessários e capazes de permitir a agregação e disponibilização de diversas informações utilizadas no cotidiano da equipe. Considerando a necessidade de reestruturação do Sistema de Informação da Atenção Básica (SIAB), o Departamento de Atenção Básica (DAB) da Secretaria de Atenção à Saúde (SAS) do Ministério da Saúde (MS) assumiu esse compromisso. Tal mudança tem como objetivo melhorar a qualidade da informação em saúde e de otimizar o uso dessas informações pelos gestores, profissionais de saúde e cidadãos (Brasil, 2014).

A atribuição de registrar todas as atividades realizadas pelos enfermeiros na AB demandava um tempo que poderia ser modificado proporcionando eficiência em suas ações cotidianas, por meio do



uso de tecnologias como prontuário eletrônico e sistema de informação *online*. Nesse sentido, tecnologias que oportunizassem a agilidade no preenchimento dos instrumentos de registros dos sistemas de informações utilizados na AB poderiam diminuir o tempo gasto no preenchimento dos formulários. Assim, buscou-se conhecer a percepção dos enfermeiros da AB quanto à importância, a forma e o tempo do preenchimento dos instrumentos de registro do sistema de informação.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo exploratório, com abordagem qualitativa. A pesquisa foi realizada com enfermeiros da AB da zona urbana e rural do município de Petrolina-PE.

A seleção dos enfermeiros que atuam na AB foi feita utilizando a base de dados do Cadastro Nacional de Estabelecimentos de Saúde (Cnes), onde estão cadastradas 41 Unidades Básicas de Saúde (UBS) incluindo a zona urbana e rural de Petrolina. Foram convidados todos os 88 enfermeiros cadastrados nas equipes de Estratégia de Saúde da Família (ESF) e Estratégia de Agentes Comunitários de Saúde (EACS) cadastrados na atenção básica para compor a população alvo e 41 aceitaram participar da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Excluíram-se os profissionais que se encontravam de férias ou licença durante o período de coleta.

Foram realizadas entrevistas semiestruturadas, utilizando gravador para análise dos discursos dos sujeitos, com questões relacionadas ao perfil do enfermeiro com as variáveis sociodemográficas e econômicas: sexo, idade, tempo de formação, especialização em Saúde Pública ou áreas afins, tempo de atuação na AB. Com relação ao trabalho na UBS foram questionados: a forma de alimentação dos sistemas de informação utilizados na AB, o tempo médio empregado no preenchimento dos instrumentos de registro dos SIS durante um dia e durante uma semana, quanto tempo é empregado na consolidação mensal dos instrumentos, o tempo médio empregado na atenção direta ao indivíduo/coletivo durante um dia e durante uma semana, quais as dificuldades no preenchimento dos instrumentos, a sua percepção quanto a necessidade do preenchimento dos instrumentos e a opinião sobre como o tempo empregado no preenchimento dos instrumentos interfere no atendimento ao indivíduo/coletivo.

O conteúdo e os registros resultantes das entrevistas foram tratados com base na “Análise de Conteúdo”, que segundo Bardin (2008) é um conjunto de técnicas de análise das comunicações que visa obter, por procedimentos sistemáticos de descrição do conteúdo das mensagens, indicadores que permitam a inferência de conhecimentos relativos às condições de produção/recepção das mensagens. Esta técnica tem por finalidade efetuar deduções lógicas e justificadas, referentes à origem das mensagens tomadas. A partir da análise dos discursos dos sujeitos, as falas foram analisadas em duas categorias.

Com o intuito de garantir o anonimato e a confidencialidade das informações atribuiu-se identificações fictícias aos entrevistados, a partir da letra inicial E (Enfermeiro) e o número correspondente a entrevista, compreendendo do 1 ao 41.

O presente projeto de pesquisa foi submetido à apreciação de Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade de Pernambuco e aprovado com parecer número: 1.374.406. Além



disso, toda a pesquisa foi conduzida seguindo os preceitos estabelecidos na Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS, 2012).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os 41 entrevistados dois eram do sexo masculino e 39 eram mulheres, com idades entre 25 e 50 anos. Apresentaram tempo médio de formação de 8,9 anos, 28 deles possuíam especialização em saúde pública, e atuaram na atenção básica uma média de 7,6 anos. Quanto a forma de alimentação dos sistemas nas unidades em 28 eram pela forma manual e 13 informatizada.

Os discursos foram harmonizados em duas categorias de análise: Fatores que influenciam o tempo de preenchimento dos instrumentos e o atendimento e Importância da alimentação do Sistema de Informação e necessidade de mudanças.

#### **Fatores que influenciam o tempo de preenchimento dos instrumentos e o atendimento**

A primeira influência identificada entre os profissionais está relacionada a forma de preenchimento dos instrumentos de registro do sistema de informação na atenção primária a saúde (APS) no cotidiano. Essa forma de alimentação pode ser feita manualmente ou de forma eletrônica. O município de Petrolina está em fase de informatização da sua rede para adequação ao novo sistema de informação, o e-SUS AB. Assim, algumas unidades de saúde ainda estão realizando o processo de registro das informações manualmente pelos profissionais. Estes, relatam algumas desvantagens nesse processo de alimentação sendo evidenciado pelas seguintes falas:

*Na nossa unidade não é informatizado, então é tudo manual, então acaba atrapalhando, a gente perde um tempo maior, a maior dificuldade é essa. [E 05]*

*[...]talvez se fosse algo até mais informatizado ao computador, porque as fichas a gente preenche manual seria mais rápido esse preenchimento[...] [E07]*

*[...]se fosse informatizado a unidade seria bem melhor e mais rápido porque tudo aqui é manual, na caneta[...] [E14]*

*[...] por enquanto a gente tá fazendo o e-sus de forma manual, mas esses formulariozinho aqui todinho aqui vão ser no computador, até a marcação vai ser no computador tudo vai ser no computador então ser mais fácil e mais rápido a tendência é perder cada vez menos tempo com essa papelada. [E15]*

A influência do tempo despendido no preenchimento manual poderia estar sendo direcionada para melhoria ou ampliação de atividades profissionais nas Unidades. Por outro lado, a alimentação eletrônica dos formulários do sistema de informação traz pontos positivos, minimizando as dificuldades no preenchimento e proporcionando maior satisfação na ótica dos enfermeiros como observado nos discursos:



*[...] antigamente era bastante ficha, mas agora foi reduzida devido ao e-sus, então facilitou bastante o trabalho da gente. [E 08]*

*[...] acredito que existe uma melhora, uma evolução, desde que partiu do sistema manual pra o informatizado porque aí as consultas demora menos e como um todo o trabalho informatizado ele evolui, ele tem uma tendência a melhorar na questão de tempo, chegada do paciente, demanda, até o final da consulta, e até também pra o trabalho mensal, consolidado mensal na unidade de saúde. [E 11]*

No Brasil o Sistema de Informação da Atenção Básica (SIAB) esta sendo substituído pelo e-SUS (SISAB). Esse processo de implantação teve início em julho de 2013 por meio da Portaria 1.412/GM/MS. Apesar de ainda não estar completamente concluído, apresenta melhoria de trabalho para os profissionais (BRASIL, 2013).

O outro fator relacionado a influência no tempo destinado ao preenchimento se refere a repetição dos dados nos diversos formulários utilizados pelos profissionais da APS. A unificação dessas informações seria uma proposta de redução do tempo de alimentação proporcionando um trabalho mais eficiente desses profissionais. Grande parte dos entrevistados queixou-se da elaboração das fichas utilizadas principalmente por conter questionamentos repetitivos e muitas vezes desnecessários, que somando o tempo gasto ao longo do dia preenchendo esses dados, reduziam o tempo que poderia ser empregado na atenção direta ao indivíduo. Essa sugestão foi observada nos relatos:

*[...] tem as vezes muitos dados repetitivos, que você acaba preenchendo a mesma informação várias vezes, em geral as dificuldades se baseiam nisso, em serem bem extensas e ter informações repetidas, você precisa preencher mais de uma vez em vários locais [E10]*

*A dificuldade é única é duplicidade de informação eu preencho a mesma informação em vários formulários alimento o sistema com a mesma informação poderia aproveitar uma informação única [...] e já entender aquilo ali como uma informação que já foi dada então fazer o autopreenchimento. [E 02]*

Os diversos sistemas de informação existentes no SUS que não trabalham de forma integrada, permite uma maior sobrecarga de trabalho para os profissionais que precisam registrar as atividades que são desenvolvidas. A interoperabilidade entre os diversos sistemas utilizados na APS permitiria uma maior agilidade e qualidade na informação prestada pelo executante.

O e-SUS Atenção Básica (e-SUS AB) é uma estratégia do Departamento de Atenção Básica a fim de reestruturar as informações da Atenção Básica em nível nacional. Esta ação está alinhada com a proposta mais geral de reestruturação dos Sistemas de Informação em Saúde do Ministério da Saúde, entendendo que a qualificação da gestão da informação é fundamental para aumentar a qualidade no atendimento à população. A estratégia e-SUS AB, faz referência ao processo de informatização qualificada do SUS em busca de um SUS eletrônico (BRASIL, 2012).



### **Importância da alimentação do Sistema de Informação e necessidade de mudanças**

Apesar do tempo gasto no preenchimento dos instrumentos, os enfermeiros reconhecem a importância de alimentar os sistemas de informação para o conhecimento de sua área e a organização de ações mais precisas. Assim sendo, pontuaram que poderia ser trabalhada uma reavaliação na elaboração dos formulários e na divisão dos consolidados mensais da unidade, como observamos nos discursos a seguir:

*[...] vai ter como você ter um resgate de algumas informações quando forem necessárias, embora que seja muitos... muitos preenchimentos e acho que as vezes sem necessidade, você poderia tá preenchendo um documento só e varias pessoas terem acesso a ele[...][E 18]*

*[...] são de extrema importância porque a vigilância só vai ser feita, né, a vigilância epidemiológica, através desses dados[...] então sem os indicadores não tem como fazer saúde publica, eles são extremamente importantes, o que eu questiono é a questão da burocracia, que, não sei se quem produz os formulários atende na ponta também pra ver que algumas informações são muito repetitivas[...][E 22]*

*[...] a gente tem que alimentar os sistemas claro, só que eu acho que teria que ser uma coisa mais sucinta, algo mais simples até pro profissional, ou então que fosse dividido as tarefas entre todos os profissionais[...][E 24]*

A importância do preenchimento dos instrumentos da APS é evidenciada tanto pela necessidade desses dados para vigilância epidemiológica quanto para organização das atividades dos enfermeiros dentro de sua unidade. No entanto, esses instrumentos poderiam ser preenchidos por toda a equipe multiprofissional e não só pelo enfermeiro, acarretando numa sobrecarga de trabalho inclusive na consolidação mensal dos dados.

A estratégia do e-SUS AB avança ao permitir a entrada dos dados orientada pelo curso natural do atendimento e não focada na situação-problema de saúde. A entrada de dados individualizados por cidadão abre caminho para a gestão do cuidado e aproximação destes dados ao processo de planejamento da equipe (Brasil, 2014).

## **4. CONCLUSÃO**

De acordo com os resultados, observou-se que fatores como a forma de preenchimento dos registros (eletrônico ou manual) e a falta de interoperabilidade entre os sistemas de informação influenciam no tempo de preenchimento dos instrumentos e no atendimento direto ao indivíduo.

Os enfermeiros entrevistados reconhecem a importância da alimentação do sistema de informação para a organização das ações em saúde, mas também ressaltam a necessidade de mudanças nos formulários. Segundo os relatos, essa necessidade se dá devido ao grande número repetido de dados pela falta de integração desse sistema.



Nesse contexto, seria importante que esses sistemas fossem interligados para diminuir a sobrecarga dos profissionais e reduzir o tempo de preenchimento, direcionando um tempo maior para a assistência, melhorando a qualidade da mesma.

## 5. REFERÊNCIAS

BACKES, Dirce Stein *et al.* O papel profissional do enfermeiro no Sistema Único de Saúde: da saúde comunitária à estratégia de saúde da família. *Ciência & Saúde Coletiva*, Santa Maria, Rs, v. 17, n. 1, p.223-230, 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.org/pdf/csc/v17n1/a24v17n1.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2015.

BARDIN, L. *Análise de conteúdo*. 3. ed. Lisboa: Ed. 70, 2008. 223p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Política Nacional de Atenção Básica / Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. *Política Nacional da Atenção Básica*. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. *e-SUS Atenção Básica* : manual do Sistema com Coleta de Dados Simplificada : CDS [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Secretaria-Executiva. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Portaria nº 1.412, de 10 de julho de 2013. Institui o Sistema de Informação em Saúde para a Atenção Básica (SISAB). *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 10 jul. 2013. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2013/prt1412\\_10\\_07\\_2013.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2013/prt1412_10_07_2013.html)>. Acesso em: 22 de out 2016.

BRASIL. CNES: Cadastro Nacional de Estabelecimentos de Saúde. Departamento de informática do SUS, Secretaria-Executiva, Brasília: Ministério da Saúde, 2016. Disponível em: <<http://www.cnes.datasus.gov.br>>. Acesso em: 10 out 2016.

ÁREA DE SUBMISSÃO: GESTÃO, ECONOMIA E SAÚDE - GE 5

## A INTEROPERABILIDADE DOS SISTEMAS DE INFORMAÇÕES EM SAÚDE COMO PROPOSTA DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM SAÚDE

F. E. C. V. FERNANDES<sup>1</sup>, S. B. XAVIER<sup>2</sup>, A. L. P. MEIRA<sup>3</sup> e R. A. de MELO<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica. Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Gestão e Economia da Saúde. Professora Assistente da Universidade de Pernambuco Campus Petrolina

<sup>2</sup> Hospital Universitário/Universidade Federal do Vale do São Francisco. Enfermeiro. Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Gestão e Economia da Saúde

<sup>3</sup> Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva. Mestre em Gestão e Economia da Saúde

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica. Professora Assistente da Universidade de Pernambuco Campus Petrolina

E-mail para contato: [flavia.fernandes@upe.br](mailto:flavia.fernandes@upe.br)

*RESUMO – Este artigo teve como objetivo discutir a interoperabilidade dos sistemas de informações do SUS como proposta de inovação tecnológica na saúde. Realizou-se um estudo de caso por meio de pesquisa integrativa da literatura. Utilizou-se base científica Scielo por meio do descritor Sistemas de Informações e análise documental em manuais do Ministério da Saúde e legislação brasileira acerca da temática. O principal sistema abordado foi o Sistema de Informação de Regulação, Controle e Avaliação (SISRCA). Foi possível correlacionar a necessidade de atualização e a proposta atual da interoperabilidade dos SIS como inovação em saúde na busca da melhoria da qualidade da informação. Diante das fragilidades encontradas por alguns dos principais sistemas, principalmente os de caráter assistencial, ficou evidente que medidas governamentais propõem modificações significativas na estrutura, funcionamento, composição, captação e processamento dos dados e informações dos SIS através da criação de um sistema único, o SISRCA. A proposta visava à um processo gradual de implantação e implementação em todas as esferas de governo, contudo, até o momento não foi implementado. Outrossim, novos desafios virão como a possibilidade de interação deste com os sistemas de informação de caráter epidemiológico e na atenção primária a saúde.*

*Palavras chave: Sistema Único de Saúde; Gestão em Saúde; Tecnologia da Informação; Assistência Ambulatorial; Assistência Hospitalar.*



**ABSTRACT** – *This article aims to discuss the interoperability of SUS information systems as proposed technological innovation in health. Were conducted a case study through integrative research literature. It was used scientific basis Scielo through the descriptor information systems and document analysis in manual Ministry of Health and the Brazilian legislation on the theme. The main system was discussed the Regulatory Information System, Control and Evaluation (SISRCA). It was possible to correlate the need to update the current and proposed interoperability of SIS as innovation in health in the pursuit of improving the quality of information. Faced with the weaknesses found by some of the systems, especially assistance character, it became clear that government measures propose significant changes in the structure, functioning, composition, capture and processing of data and information from the SIS by creating a single system, SISRCA. The proposal was aimed at a gradual process of deployment and implementation in all spheres of government, but so far has not been implemented. Moreover, new challenges will come as the possibility of its interaction with the epidemiological nature of information systems and primary health care.*

*Keywords: Unified Health System; Health Management; Information Technology; Ambulatory Care; Hospital Care.*

## 1. INTRODUÇÃO

A inovação tecnológica é tema que tem sido discutido em diversas áreas sendo a saúde, setor de importante influência, considerando que esta pode ser considerada um bem prioritário para as pessoas. As estratégias de desenvolvimento produtivo, de inovação e de proteção social integram-se às propostas de discussão para desenvolvimento (Lorenzetti *et al.*, 2012; Gadelha, 2012). Os avanços e investimentos na área da saúde crescem com incentivos nas diversas subáreas indo desde inovações para promoção e prevenção até recuperação da saúde. Citam-se as melhorias na composição dos imunobiológicos disponíveis no Sistema Único de Saúde (SUS), aperfeiçoamento nas órteses e próteses e materiais utilizados em cirurgias e/ou reabilitações e medicamentos. Observam-se também avanços na área de gestão, com o fortalecimento da informação e comunicação (Lorenzetti *et al.*, 2012).

Mesmo antes da criação do SUS o Brasil já concebia a necessidade de estabelecimento de sistemas de controle dessas informações como o de mortalidade, criado na década de setenta. Com a introdução de um sistema de saúde universal, equânime e integral para todo cidadão brasileiro, os sistemas de informações tiveram a instituição legal assegurada com a criação de um departamento específico para seu gerenciamento. Ao longo dos anos, outros sistemas de informações foram criados e têm cobertura nacional (Mota; Carvalho, 2003). Por meio da construção do sistema de inovação se viabiliza a realização de fluxos de informação necessários ao processo de inovação tecnológica. No SUS todas as ações prestadas, serviços oferecidos, informações de morbidade e mortalidade são fornecidas através dos sistemas de informação em saúde (SIS) (Albuquerque, Cassiolato, 2000).



Considerando o progresso da tecnologia da informação dentro do SUS, em termos de expansão do número e diversidade de sistemas, percebeu-se a necessidade da modernização, do aperfeiçoamento e da interoperabilidade desses SIS para fortalecimento das atividades de controle e melhoria da qualidade das ações e serviços prestados à população. Ante o exposto e tendo ciência da escassez de estudo sobre a temática, este artigo teve como objetivo discutir a interoperabilidade dos sistemas de informações do SUS como proposta de inovação tecnológica na saúde.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Realizou-se um estudo de caso a partir de uma revisão integrativa da literatura visando discutir a interoperabilidade dos Sistemas de Informações em saúde (SIS) no SUS como proposta de inovação tecnológica na saúde através de pesquisa bibliográfica, análise documental tendo como base científica principal pesquisada a Scielo, além de manuais do Ministério da Saúde e análise da legislação brasileira acerca do SUS.

A busca em base científica utilizou a busca booleana com os descritores: “Sistema” and “Informação”, “Sistema” and “Inovação” and “Saúde”. Não foi estabelecido limite de tempo para análise dos conteúdos. Incluíram-se na análise os artigos disponíveis na íntegra e nas línguas português, inglês e espanhol. Foram excluídos os artigos cuja temática não abordasse sistemas de informação, incorporação de novas tecnologias na saúde, ou sistema de inovação em saúde. Além disso, aspectos teóricos foram resgatados em bibliografias impressas.

O trabalho abordou os diversos conceitos acerca de estudos em inovação tecnológica em saúde e em especial para tecnologia da informação, seguido por abordagens conceituais sobre sistemas, dados, informações e sistemas de informações de diversos autores. Publicações legislativas e técnicas acerca da instituição de novos SIS e de modificações dos existentes foram abordadas. Houve a necessidade da descrição dos principais SIS utilizados no SUS. Com isso, foi possível correlacionar a necessidade e proposta atual da interoperabilidade dos SIS como inovação em saúde na busca da melhoria da qualidade da informação.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diversos estudos sobre inovação tecnológica da saúde estão voltados para uso de tecnologias da informação diretamente relacionadas com a assistência ao paciente como o uso de prontuário eletrônico, tele-enfermagem e teleconferências. Encontra-se também criação de softwares e formas de monitoramento de sinais vitais (Pires, 2012). Segundo Trindade (2008), as formas de aplicação prática dos conhecimentos obtidos através das tecnologias em saúde estão no campo de equipamentos, realização de procedimentos clínicos e cirúrgicos, programas e sistemas relacionados com o cuidado com a saúde dos usuários. A legislação brasileira estipulou padrão terminológico para os serviços e produtos da saúde, denominando de medicamentos, equipamentos, artigos e produtos para diagnóstico *in vitro*.



Entretanto, observa-se que toda assistência prestada à população, independente do recurso utilizado pelo profissional e do nível de complexidade desse atendimento, gera dados e informações que alimentam os SIS no SUS. Esses sistemas podem ser entendidos como um conjunto de partes interagentes ou interdependentes que formam um todo com determinados objetivos que se relacionam a seus atributos e efetuam determinadas funções podendo ser um componente da tecnologia da informação (Rezende, 2008; Padoveze, 2009; Santos, 2009). Nesse contexto, os sistemas, assim como as informações disponibilizadas por eles são vistos como ferramentas para o planejamento, para a tomada de decisão e para a gestão da saúde de um modo geral (Pinheiro *et al.*, 2016).

Assim como os conceitos já estabelecidos para sistemas de informação em geral, os sistemas de informação em saúde também são um mecanismo de coleta, processamento, análise e transmissão da informação necessária para se organizar e operar os serviços de saúde. Oportuniza também a investigação e o planejamento com vistas ao controle de doenças e gestão do sistema. O propósito do sistema de informação em saúde é selecionar os dados pertinentes a esses serviços e transformá-los na informação necessária para o processo de decisões, próprio das organizações e indivíduos que planejam, financiam, administram, proveem, medem e avaliam os serviços de saúde (Mota, Carvalho, 2003).

A organização de um sistema nacional de informação em saúde integrado em todo o território nacional, abrangendo questões epidemiológicas e de prestação de serviços, prevista no Art. 47º da Lei 8.080 de 19 de setembro de 1990, ficou a cargo do Ministério da Saúde, em articulação com os níveis estaduais e municipais do SUS (Brasil, 1990). Dessa forma o Departamento de Informática do SUS (DATASUS) foi instituído pelo Decreto nº 100 de 16 de abril de 1991. Em 1998, com o entendimento cada vez mais presente da importância da informação para os processos de gestão e formulação de políticas, a estrutura do DATASUS foi transferida para a Secretaria Executiva, com sua missão ampliada e adequada às necessidades do Ministério da Saúde (MS) e do SUS. Inicialmente, o conjunto de serviços consistia basicamente dos sistemas de faturamento ambulatorial e hospitalar e dos sistemas de acompanhamento de nascidos vivos, agravos de notificação e de mortalidade, além de pequenos sistemas voltados para gestão administrativa, tais como controle de materiais, de patrimônio e de processos (Brasil, 2002).

Entretanto, ao longo desses anos de implantação do DATASUS, vários sistemas foram sendo introduzidos, pelo MS, sendo os de abrangência nacional que possibilitam inúmeras avaliações através dos sistemas de informações assistenciais como: o Sistema de Informação Ambulatorial (SIA), o Sistema de Informações Hospitalares (SIH) e o Sistema de Informação da Atenção Básica (SIAB), e dos sistemas de informações epidemiológicas: o Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM), o Sistema de Informação sobre Nascidos Vivos (SINASC), o Sistema de Informação de Agravos de notificação (SINAN), o Sistema de Cadastro Nacional dos Estabelecimentos de Saúde (SCNES) (Mota; Carvalho, 2003; Mendes *et al.*, 2000).

Além dos sistemas de informações de estatísticas vitais, outros sistemas possibilitam análise da assistência prestada aos usuários como o SIA que teve sua implantação na década de noventa, com abrangência nacional em 1995. Segue uma lógica contábil de controle de gastos com a assistência



visando o registro dos atendimentos realizados no âmbito ambulatorial, por meio do boletim de produção ambulatorial (BPA). Foi implantado com o processamento descentralizado para todos os estados e municípios, o que permite às secretarias de saúde conhecer e acompanhar os serviços produzidos, sendo um importante instrumento de controle e avaliação (Brasil, 2008; Mota; Carvalho, 2003; Scatena; Tanaka, 2001, Brasil, 2010).

Em se tratando da assistência hospitalar prestada e da morbidade hospitalar de uma determinada população, o SIH permite o conhecimento dos procedimentos realizados, com base na Décima Revisão da Classificação Internacional de Doenças (CID 10), bem como dos principais diagnósticos das internações realizadas nos hospitais do SUS, ou que prestam serviços a este. Apresenta sua conformação atual desde o início dos anos 90 quando recebeu a nomenclatura ainda hoje utilizada SIH. Desde então, contém informações de todas as unidades hospitalares da rede pública própria estadual, municipal e federal e da rede contratada e conveniada. Tem como instrumento de alimentação a Autorização de Internação Hospitalar (AIH) (Mota; Carvalho, 2003; Brasil, 2011a).

O SIAB era o principal instrumento de monitoramento da Estratégia Saúde da Família e tem sua gestão na Coordenação de Acompanhamento e Avaliação (CAA/DAB/SAS). Este, sofreu uma série de críticas ao longo dos anos quando a atualização de suas informações. Visando a melhoria deste, foi proposto um novo Sistema de Informação da Atenção Básica (SISAB) executado por meio do e-SUS. Este veio com uma proposta mais inovadora e adequada aos avanços tecnológicos em especial os equipamentos computacionais.

Apesar dos avanços no sentido da melhoria da qualidade das informações disponibilizadas pelos sistemas de informações, ainda se evidenciam algumas fragilidades como a deficiente interoperabilidade destes. Não há unicidade principalmente entre os sistemas de informações assistenciais, pois as produções ambulatorial e hospitalar não podem ser cruzadas porque não há um único cadastro ou nome da unidade (Mendes, 2000). Diante disso, o Ministério da Saúde regulamentou o uso de padrões de interoperabilidade e informação em saúde para sistemas de informação em saúde no âmbito do SUS, nos níveis Municipal, Distrital, Estadual e Federal, e para os sistemas privados e do setor de saúde suplementar sendo um dos objetivos permitir interoperabilidade funcional, sintática e semântica entre os diversos sistemas de informações em saúde, existentes e futuros. Além disso, propõe também a estruturação das informações referentes a identificação do usuário do SUS, o profissional e o estabelecimento de saúde responsáveis pela realização do atendimento (Brasil, 2011b).

Esses aperfeiçoamentos permitirão um levantamento de informações, em especial de morbidade, da população de forma mais fidedigna. Esse processo está fundamentado na necessidade de racionalização, inovação, fortalecimento do sistema de informação e informática em saúde no SUS. Além da interoperabilidade tecnológica dos serviços de saúde, proporcionando maior agilidade dos procedimentos e de um efetivo e eficiente sistema de registro das ações e eventos de saúde num sistema informatizado. Isso permitirá o fortalecimento do gerenciamento do SUS (Brasil, 2011b).



Com base nessa determinação e na necessidade de modernização nos diversos sistemas de informações existentes de uso do Departamento de Regulação, Avaliação e Controle de Sistemas, o Ministério da Saúde instituiu em 2013 o Sistema de Regulação, Controle e Avaliação (SISRCA) (Brasil, 2013). Essa proposta considera também que a tecnologia da informação com foco na gestão é estratégica e imprescindível para a consolidação de um Sistema de Informação que reflita as Redes de Atenção à Saúde (RAS) proposta pelo Decreto nº 7.508/2011 (Brasil, 2011c).

Quando contraposto ao formato dos sistemas de informações de caráter assistencial existente, o SISRCA traz uma proposição inovadora no qual esses SIS farão parte do próprio SISRCA em forma de módulos, ou seja, essa proposta faz a unificação de todos os sistemas atuais de utilização do componente regulação, controle e avaliação. Isso permitirá o aumento das críticas e melhoria da interoperabilidade (Brasil, 2013).

Essa proposta lançada permitia uma unificação das informações diminuindo os erros de cobranças de procedimentos além de permitir melhoria na qualidade da gestão com o foco no controle, avaliação e auditoria do SUS. Contudo o sistema não conseguiu ser implementado no país. Alguns autores afirmam que fatores são importantes no momento da introdução de um novo sistema destacando-se entre outros, a identificação de novas necessidades, obstáculos à adoção, a percepção dos resultados do uso e a existência de um processo participativo entre os vários atores envolvidos: os decisores, os desenvolvedores do sistema e os seus usuários (Perez *et al*, 2010).

Assim como afirmam Pinheiro *et al.* (2016) a utilização dos SIS ainda não atinge todo o seu potencial, pois é usado de maneira incipiente pela gestão da saúde para o processo decisório. Em geral, gestores e trabalhadores compartilham dados e informações, porém, deparam-se com desafios a serem enfrentados no uso da informação como subsídio para a produção do conhecimento e decisão.

#### 4. CONCLUSÃO

Os sistemas de informações, importantes ferramentas utilizadas na gestão do SUS, são essenciais para a saúde como instrumento de planejamento das ações e serviços de saúde. Há mais de 45 anos alguns sistemas de informações já existiam e funcionavam ampliando forma e abrangência mesmo antes da implementação do SUS.

Diante das fragilidades encontradas por alguns dos principais SIS, principalmente os de caráter assistencial, realizou-se estudo que relacionou a interoperabilidade dos SIS no SUS como proposta de inovação tecnológica na saúde ficando evidente que medidas governamentais propuseram modificações significativas na estrutura, funcionamento, composição, captação e processamento dos dados e informações dos SIS através da criação de um sistema único, o SISRCA. Contudo, mesmo com a proposta de processo gradual de implantação e implementação em todas as esferas de governo, este ainda é um desafio considerando que não está em funcionamento.

Novos estudos devem ser propostos no sentido de levantar as fragilidades quanto à implantação e utilização dos SIS para gestores e profissionais de saúde. Outros desafios devem ser



considerados como a possibilidade de interação deste com os sistemas de informação de racionalidade epidemiológica.

## 5. REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, Eduardo da Motta e; CASSIOLATO, José Eduardo. *As especificidades do sistema de inovação do Setor Saúde: uma resenha da literatura como introdução a uma discussão sobre o caso brasileiro*. Belo Horizonte: FESBE, 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Executiva. Departamento de Informática do SUS. *DATASUS Trajetória 1991-2002*. Brasília - DF, 2002. p 7-8-9-42.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria GM/MS nº. 3.462 de 11 de Novembro de 2010. Estabelece critérios para alimentação dos Bancos de Dados Nacionais dos Sistemas de Informação da Atenção à Saúde. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 nov. 2010. Seção 1, p. 50.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 1.904, de 6 de setembro de 2013. Institui o Sistema de Regulação, Controle e avaliação (SISRCA) no âmbito do Ministério da Saúde. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 out. 2013. Seção 1, p. 35.
- BRASIL. Ministério da Saúde/ Secretaria de Atenção à Saúde/ Departamento de Regulação, Avaliação e Controle/Coordenação-Geral de Sistemas de Informação. *Manual técnico operacional do Sistema de Informações Hospitalares: orientações técnicas*. Versão 01.2011. 119 p. Brasília: Ministério da Saúde, 2011a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.073, de 31 de agosto de 2011b. Regulamenta o uso de padrões de interoperabilidade e informação em saúde para sistemas de informação em saúde no âmbito do Sistema Único de Saúde, nos níveis Municipal, Distrital, Estadual e Federal, e para os sistemas privados e do setor de saúde suplementar. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Poder Executivo, Brasília, DF, 01 set. 2011. Seção 1, p. 63.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Decreto nº 7.508 de 28 de junho de 2011c. Regulamenta a Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, para dispor sobre a organização do Sistema Único de Saúde - SUS, o planejamento da saúde, a assistência à saúde e a articulação interfederativa, e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Poder Executivo, Brasília, DF, 29 jun. 2011. Seção 1, p. 1.
- GADELHA, Carlos Augusto Grabois. Saúde e desenvolvimento: uma nova abordagem para uma nova política. *Rev Saúde Pública*, 2012; 46(Supl):5-8.
- LORENZETTI, Jorge et al . Tecnologia, inovação tecnológica e saúde: uma reflexão necessária. *Texto contexto - enferm.*, Florianópolis , v. 21, n. 2, jun. 2012.
- MENDES, Antônio da Cruz Gouveia, et al. Avaliação do sistema de informações hospitalares - SIH/SUS como fonte complementar na vigilância e monitoramento de doenças de notificação compulsória. *Informe Epidemiológico do SUS*. Brasília. v. 9, n. 2. p. 67-86. Junho, 2000.
- MOTA, E.; CARVALHO, D. M. T. Sistemas de Informação em Saúde. In: ROUQUAYROL, M. Z.; ALMEIDA FILHO, N. *Epidemiologia e Saúde*. 6. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2003. p. 605-628.
- PADOVEZE, Clóvis Luís. *Sistemas de informações contábeis: fundamentos e análise*. 6. ed. São Paulo: Atlas, 2009. 352p. ISBN 978-85-224-5693-2.



PINHEIRO, Alba Lúcia Santos et al . Health management: the use of information systems and knowledge sharing for the decision making process. *Texto contexto - enferm.*, Florianópolis , v. 25, n. 3, e3440015, 2016 .

PIRES, Denise Elvira Pires de et al . Inovação tecnológica e cargas de trabalho dos profissionais de saúde: uma relação ambígua. *Rev. Gaúcha Enferm.*, Porto Alegre , v. 33, n. 1, mar. 2012 .

PEREZ, Gilberto et al . Adoção de inovações tecnológicas na área de saúde: um estudo sobre sistemas de informação sob a ótica da teoria de difusão. *JISTEM J.Inf.Syst. Technol. Manag. (Online)*, São Paulo , v. 7, n. 1, p. 71-94, 2010.

REZENDE, Denis Alcides. *Sistemas de informações organizacionais: guia prático para projetos em cursos de administração, contabilidade e informática*. 3. ed. São Paulo: Atlas, 2008. 133 p. ISBN 978-85-224-5172-2.

SCATENA, João Guilherme G.; TANAKA, Oswaldo Yoshimi. Utilização do Sistema de Informações Hospitalares (SIH-SUS) e do Sistema de Informações Ambulatoriais (SIA-SUS) na Análise da Descentralização da Saúde em Mato Grosso. *Informe Epidemiológico do SUS*, 2001. v. 10. n.1. 19 – 30.

TRINDADE, Evelinda. A incorporação de novas tecnologias nos serviços de saúde: o desafio da análise dos fatores em jogo. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 24, n. 5, maio 2008.

## 6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Ministério da Saúde o financiamento do Programa de Pós-Graduação em Gestão e Economia da Saúde realizado pela Universidade Federal de Pernambuco.



ÁREA DE SUBMISSÃO: GESTÃO, ECONOMIA E SAÚDE - GE 6

## MAPEAMENTO DOS CENTROS DE CUSTOS: UM ESTUDO DE CASO NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROFESSOR ALBERTO ANTUNES – HUPAA-UFAL/EBSERH.

I.C. BARBOSA<sup>1</sup>; M. N DE FREITAS<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Economista, Mestre em Gestão em Gestão e Economia da Saúde UFPE-2014

<sup>2</sup>Administrador, Mestre em Gestão em Gestão e Economia da Saúde UFPE-2014

E-mail para contato: inezcb@hotmail.com

E-mail para contato: marcelomcz@hotmail.com

**RESUMO** - *Este trabalho tem por objetivo definir os centros de custos em produtivos e não produtivos, classificar os centros de custos em administrativos, básicos, auxiliares e finais, calcular a margem de contribuição, o ponto de equilíbrio e o superávit ou déficit de receita do Hupaa. A metodologia constitui um estudo de caso e a coleta de dados foi realizada através de documentos e da observação a partir de visitas in loco nos serviços/setores. Utilizou-se o método de sistema de custeio variável, tendo em vista a alta complexidade de cálculos em detrimento de tempo para conclusão do trabalho. Como resultado identificou-se uma margem de contribuição de R\$ 2.361.354,26, o ponto de equilíbrio de R\$ 4.178.991,67 e um déficit no valor de R\$ 82.990,43. A gestão de custos fornece informações que são extremamente úteis aos gestores, visto que tais dados podem auxiliá-los nas tomadas de decisões, pois permite uma análise interna que possibilitará um melhor conhecimento dos resultados da gestão e uma melhoria no funcionamento da organização.*

**Palavras-chave:** Margem de Contribuição, Ponto de Equilíbrio e Superávit ou Déficit da Receita.

**ABSTRACT** - *This paper aims to define the productive cost centers and unproductive sort the cost centers in administrative, basic, auxiliary and final calculate the contribution margin, the break-even point and the surplus or income deficit Hupaa. The methodology is a case study and data collection was carried out through documents and observation from on-site visits in services / sectors. We used the system variable costing method, in view of the highly complex calculations over time for completion of the work. As a result identified a margin contribution of R\$ 2.361.354,26, the balance of R\$ 4.178.991,67 and a deficit of R\$ 82.990,43. The cost management provides information that is extremely useful to managers, since such data can assist them in making*



*decisions, it allows an internal analysis that will enable a better understanding of the results of management and an improvement in the functioning of the organization.*

*Keywords: Contribution Margin, Break-Even Point, Surplus or Deficit of Income.*

## 1. INTRODUÇÃO

O Hospital Universitário Professor Alberto Antunes (Hupaa), foi fundado em 1973, sendo um órgão de apoio acadêmico da Universidade Federal de Alagoas (Ufal), é um Hospital-Geral de ensino que mantém relação funcional com todas as Unidades Acadêmicas da Universidade, é referenciado em urgência obstétrica de alto risco, atenção ambulatorial especializada e internação em média e alta complexidade, com ações abrangendo as áreas de ensino, pesquisa e assistência. O Hospital é contratualizado com a Secretaria Municipal de Saúde de Maceió, com a qual pactua a oferta de seus serviços assistenciais desde 2006.

O Hupaa é uma instituição pública e gratuita, cujo financiamento depende exclusivamente do Sistema Único de Saúde (SUS), tendo como base a tabela de procedimentos do SUS, em que cada serviço prestado seja no nível de internação, ambulatorial e nos serviços de apoio ao diagnóstico corresponde a um valor pré-fixado.

O Hospital conta com uma área construída de 28.051,61 m<sup>2</sup>, possui 212 leitos distribuídos em 6 (seis) andares, nas especialidades cirúrgico, clínico, obstétrico, pediátrico, Hospital Dia e leitos complementares. Conta ainda com 99 consultórios ambulatoriais destinados às consultas e procedimentos nas diversas especialidades médicas, e ainda nas áreas de enfermagem, nutrição, odontologia, serviço social e psicologia.

Com a criação do Programa de Reestruturação dos Hospitais Universitários Federais (Rehuf) no âmbito do SUS, em 2004, foi definida uma nova política de gestão e financiamento para os hospitais universitários federais, o que fez com que a instituição tivesse que realizar diversas mudanças em seu perfil assistencial – levando a organização focar em procedimentos de média e alta complexidade e na sistemática de financiamento – a partir da pactuação de metas vinculadas à produção e desempenho gerencial.

Em janeiro de 2014 foi realizada parceria entre a Ufal e a Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares (Ebserh), sendo esta uma empresa pública vinculada ao Ministério da Educação (MEC), criada pela Lei Federal nº 12.550, de 15 de dezembro de 2011, que tem como finalidade a prestação de serviços gratuitos de assistência médico-hospitalar, ambulatorial e de apoio diagnóstico e terapêutico à comunidade, assim como a prestação às instituições públicas federais de ensino ou instituições congêneres de serviços de apoio ao ensino, à pesquisa e à extensão, ao ensino-aprendizagem e à formação de pessoas no campo da saúde pública, observada, nos termos do art. 207 da Constituição Federal, a autonomia universitária.

O Hupaa, assim como os demais hospitais universitários federais, enfrenta dificuldades, principalmente relacionadas com seu custeio. As instituições públicas têm a função social como seu principal objetivo, mas, ressalta-se aqui que apresentam os mesmos problemas econômicos das empresas privadas prestadoras de serviços.

Com a crescente exigência do governo e da sociedade pela racionalização dos custos e despesas, aumento da produtividade e melhoria da qualidade dos atendimentos nos Hospitais



Universitários (HU's), no Brasil, eclode a busca de um gerenciamento sustentável destas instituições. Diante desta realidade os hospitais de ensino encontram-se debilitados por serem mais dispendiosos dado que incorporam atividades de ensino, pesquisa e extensão e por serem um referencial em tecnologia de ponta (Silva, Costa E Tibério, 2003).

Deste modo, conhecer a composição dos custos como um processo norteador das decisões gerenciais torna-se de extrema importância para a saúde financeira das instituições, sendo necessário trabalhar com informações confiáveis, principalmente na forma de indicadores que meçam a produção, produtividade e qualidade dos serviços ofertados à comunidade.

Diante de tal cenário e da complexidade do Hospital em questão, que requer um trabalho preciso sobre a apuração dos custos hospitalares, o trabalho apresentado limita-se a um estudo inicial da apuração dos custos, o qual se considera como uma etapa preliminar de conhecimento estrutural do Hupaa. Destarte, tem-se como objetivo *“Definir os centros de custos em produtivos e não produtivos, classificar os centros de custos em administrativos, básicos, auxiliares e finais, calcular a margem de contribuição, o ponto de equilíbrio e o superávit ou déficit de receita do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes - Hupaa-Ufal-Ebserh”*.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho consiste em um estudo de caso. O método de coleta de dados se deu através da análise de documentos e observação participante. A pesquisa documental que consiste numa fonte de coleta de dados, foi uma das formas de se obter informações sobre a instituição estudada, por meio da disponibilização dos seus arquivos como: Organograma da Instituição e o Relatório de Dimensionamento de Serviços Assistenciais e da Gerência de Ensino e Pesquisa 2013. Já os dados financeiros para o levantamento da receita e das despesas tiveram como fonte de informação o Setor de Avaliação e Controladoria do Hupaa, referentes ao ano de 2015. Além da fundamentação científica com base em artigos científicos, livros e manuais de custos em saúde do Ministério da Saúde.

Já na observação participante o pesquisador vivencia pessoalmente o evento de sua análise para melhor entendê-lo, agindo de acordo com as suas interpretações da área vivenciada; procurando entender as ações no contexto da situação observada, onde, para o desenvolvimento do estudo foram feitas visitas *in loco* em diversos serviços/setores do Hospital.

Para a elaboração do trabalho, foi utilizado o sistema de custeio variável, tendo em vista a alta complexidade de cálculos em detrimento de tempo, sendo também um fator de limitação do estudo.

As etapas do trabalho iniciaram-se com a coleta dos dados, onde, foram levantadas as receitas do Hupaa e classificados os tipos de custos em fixos e variáveis, na segunda etapa foram calculados a margem de contribuição, o ponto de equilíbrio e o déficit de receitas utilizando como ferramenta de apoio para os cálculos a planilha eletrônica Excel.

De acordo com Matos (2002), a margem de contribuição corresponde à diferença entre o valor da receita total menos o custo variável, cuja expressão compreende a parcela de contribuição do produto ou do serviço destinada à cobertura do custo fixo e à geração de resultados, caso o montante da referida receita seja superior ao valor do custo fixo. A consequência direta dessa equação é o aparecimento do ponto de equilíbrio, que expressa o nível de atividades em que o resultado operacional é zero, no qual ocorre, portanto, a igualdade entre a receita total e o custo total.

Na terceira etapa de estruturação dos centros de custos, utilizou-se como referência o organograma do Hospital para definir os centros de custos em produtivos e não produtivos, e em seguida classificou-se os centros de custos em administrativos, básicos, auxiliares e finais.

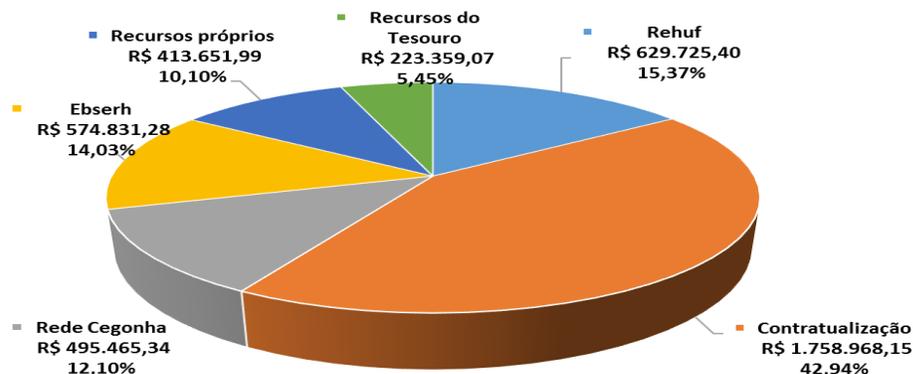
De acordo com o Ministério da Saúde (2006), os centros de custos produtivos, são os centros de custos que desenvolvem atividades diretamente relacionadas com os objetivos principais da instituição, ou seja, unidade que presta serviço diretamente aos pacientes e que compreendem uma atividade com remuneração pelos serviços prestados. Já os centros de custos não produtivos, são os setores que não influenciam diretamente na produção do serviço ou produto da instituição.

Os centros de custos também foram classificados em 4(quatro) grupos:

1. Centros de custos administrativos correspondem aos setores de apoio que executam atividades de caráter gerencial e administrativo;
2. Centros de custos básicos são os setores de infraestrutura, sendo os mesmos responsáveis pela manutenção das diversas atividades realizadas no hospital;
3. Centros de custos auxiliares correspondem os setores que tem função de apoio aos demais setores; e
4. Centros de custos finais agregam os centros de custos representativos dos serviços relacionados às atividades fins da instituição.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente serão apresentados os resultados referentes a composição das receitas do Hospital. Observa-se na Figura 1 que a principal fonte de receita do Hupaa advém do processo de Contratualização, percentual equivalente a 42,94% da receita total. As outras fontes de receita são do Rehuf/MEC 15,37%, da Ebserh 14,03%, Programa da Rede Cegonha do Ministério da Saúde, 12,10%, Recursos próprios 10,10% e Recursos do tesouro 5,45%.



**Figura 1** - Fontes de receitas do Hupaa – Mensal/2015  
Fonte: Elaborado pelos autores, 2016.

Algumas Observações:

- a) Contratualização: Receita derivada do repasse do Fundo Nacional de Saúde referente ao pagamento pelos atendimentos prestados à população pelo Hospital;

- b) Programa da Rede Cegonha: Receita derivada de repasses do Ministério da Saúde para custeio da rede de cuidados de atenção à mulher. O recurso da Rede Cegonha só pode ser utilizado para pagamento das despesas relacionadas ao seu objeto, não podendo ser empregado nas demais despesas do Hupaa;
- c) Ebserh: Receita derivada do repasse da Ebserh para suporte financeiro ao Hospital;
- d) Rehuf: Receita derivada de repasses do Ministério da Educação a serem aplicados em investimentos/capital e custeio do Hospital;
- e) Recursos próprios: Receita derivada da seleção da residência médica e multiprofissional e aluguéis (espaços utilizados por terceiros, Ex. Lanchonete, entre outros).
- f) Recursos do tesouro: Reforço para custeio do Hupaa.

Na sequência são apresentados os resultados referentes à composição dos custos da instituição. Como relatado na seção de metodologia, os custos serão tratados seguindo a metodologia de custeio variável, a qual segrega os custos em fixos e variáveis.

A Tabela 1, mostra a classificação dos tipos de custos em fixos e variáveis e seus respectivos valores médios mensais em 2015 do Hupaa. Nota-se que o maior impacto dos custos fixos está relacionado com o pagamento de pessoal da Fundação que representam 42,78%, Terceirizados 20,98% e Limpeza e Conservação 15,06% no qual totalizam 78,82% do total dos custos fixos. Em relação aos custos variáveis o seu maior comprometimento está relacionado a três principais itens: medicamentos 27,74%; material médico-hospitalar 25,62% e contratos de fornecimento de alimentação 210,03%, importando no total de 74,39% dos custos variáveis.

**Tabela 1 – Tipos de custos fixos e variáveis do Hupaa no ano de 2015**

GRUPO DE CUSTOS	DESCRIÇÃO DO CUSTO	TIPO DO CUSTO	CUSTO ANUAL	% DOS CUSTOS FIXOS	% DOS CUSTOS TOTAL
CONTRATOS	MANUTENÇÃO E CONSERVAÇÃO DE BENS IMÓVEIS - MANUTENÇÃO PREDIAL	FIXO	R\$ 48.984,57	2	58,14%
	MANUTENÇÃO E CONSERVAÇÃO DE MÁQUINAS E EQUIPAMENTOS	FIXO	R\$ 180.994,59	7	
	LIMPEZA E CONSERVAÇÃO	FIXO	R\$ 362.818,52	15	
	VIGILÂNCIA OSTENSIVA	FIXO	R\$ 62.512,86	2	
	SERVIÇOS TÉCNICOS PROFISSIONAIS DE TI. - INFORMÁTICA	FIXO	R\$ 1.279,40	0	
	SERVIÇO DE ENERGIA ELÉTRICA	FIXO	R\$ 36.666,67	1	
	ÁGUA	FIXO	R\$ 24.479,32	1	
PESSOAL	LOCAÇÃO DE MÁQUINAS E EQUIPAMENTOS	FIXO	R\$ 155.403,06	6	
	SERVIÇOS DE APOIO ADMINISTRATIVO TÉCNICO E OPERACIONAL - TERCEIRIZAÇÕES	FIXO	R\$ 505.363,43	20	
	SERVIÇOS DE APOIO ADMINISTRATIVO TÉCNICO E OPERACIONAL - FUNDAÇÃO	FIXO	R\$ 1.030.696,03	42	
<b>TOTAL DOS CUSTOS FIXOS</b>			<b>R\$ 2.409.198,44</b>	<b>100</b>	
GRUPO DE CUSTOS	DESCRIÇÃO DO CUSTO	TIPO DO CUSTO	CUSTO ANUAL	% DOS CUSTOS VARIÁVEIS	% DOS CUSTOS VARIÁVEIS
Despesas com Materiais	GASES MEDICINAIS	VARIÁVEL	R\$ 20.884,05	1	41,86%
	GÊNEROS DE ALIMENTAÇÃO	VARIÁVEL	R\$ 2.684,07	0	
	MEDICAMENTOS	VARIÁVEL	R\$ 481.137,56	27	
	MATERIAL DE EXPEDIENTE E PAPELARIA	VARIÁVEL	R\$ 24.014,58	1	
	MATERIAL DE ACONDICIONAMENTO E EMBALAGEM - DESCARTÁVEIS	VARIÁVEL	R\$ 2.247,24	0	
	MATERIAL DE LIMPEZA E PRODUÇÃO DE HIGIENIZAÇÃO	VARIÁVEL	R\$ 40.015,25	2	

	UNIFORMES, TECIDOS E AVIAMENTOS	VARIÁVEL	R\$ 1.548,24	0
	MATERIAL MÉDICO - HOSPITALAR - DIAGNÓSTICO - ORTES PRÓTESES -	VARIÁVEL	R\$ 444.400,20	25
	MATERIAL DE CONSUMO - OUTROS	VARIÁVEL	R\$ 37.617,79	2
Contrato	TELEFONIA	VARIÁVEL	R\$ 13.588,59	0
	LAVANDERIA	VARIÁVEL	R\$ 87.610,46	5
	GRÁFICA E IMPRENSA	VARIÁVEL	R\$ 20.074,56	1
	FORNECIMENTO DE ALIMENTAÇÃO	VARIÁVEL	R\$ 364.807,16	21
	COMBUSTÍVEIS E LUBRIFICANTES AUTOMOTIVOS	VARIÁVEL	R\$ 6.639,50	0
Despesas de Cu	DIÁRIAS E PASSAGENS	VARIÁVEL	R\$ 4.089,58	0
	SERVIÇOS DE TERCEIROS PESSOA FÍSICA - OUTROS	VARIÁVEL	R\$ 3.392,04	0
	SERVIÇOS DE TERCEIROS PESSOA JURÍDICA - OUTROS	VARIÁVEL	R\$ 90.374,28	5
	EQUIPAMENTO E MATERIAL PERMANENTE	VARIÁVEL	R\$ 89.521,83	5
<b>TOTAL DOS CUSTOS VARIÁVEIS</b>			<b>R\$ 1.734.646,97</b>	<b>100</b>
<b>CUSTOS TOTAIS</b>			<b>R\$ 4.143.845,41</b>	

Fonte: Elaborado pelos autores, 2016.

Conforme se observa na Figura 2 os custos fixos representam uma parcela significativa dos custos totais do Hospital, compreendem 58,14%, enquanto que os custos variáveis equivalem a 41,86%.

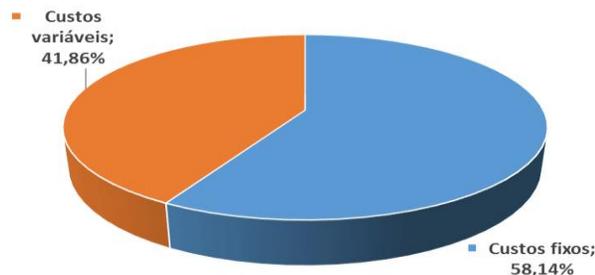


Figura 2 – Percentual dos custos fixos e variáveis do Hupaa no ano de 2015

Fonte: Elaborado pelos autores, 2016.

Após o levantamento dos dados e posterior identificação dos custos fixos, custos variáveis e do total da receita do hospital, observa-se na Tabela 2 a margem de contribuição no valor de R\$ 2.361.354,26, com o ponto de equilíbrio de R\$ 4.178.991,67, apresentando um déficit de receita de R\$ 82.990,43, onde, o déficit da receita do HU não supriu o seu ponto de equilíbrio. Ressalta-se que o elevado custo fixo da instituição, colabora para o aumento do seu ponto de equilíbrio ocasionando riscos para a continuidade da atividade operacional, justificado neste caso pelo seu déficit de receita, sendo imprescindível, um aumento da produção para minimizar tal risco e suprir o déficit.

Tabela 2 – Margem de contribuição, ponto de equilíbrio e déficit de receita do HUPAA - mensal

	DESCRIÇÃO	R\$ (MENSAL)
(A)	TOTAL DE RECEITAS	R\$ 4.096.00
(B)	TOTAL DOS CUSTOS FIXOS	R\$ 2.409.19
(C)	TOTAL DOS CUSTOS VARIÁVEIS	R\$ 1.734.64
<b>D = (A-C)</b>	<b>MARGEM DE CONTRIBUIÇÃO</b>	<b>R\$ 2.361.35</b>
E = (C/A)	% CUSTOS VARIÁVEIS EM RELAÇÃO À RECEITA TOTAL	42,



$F = (100\% - E)$	% DIFERENÇA DE CUSTOS FIXOS EM RELAÇÃO AO CUSTO VARIÁVEL	57,
$G = (B/F)$	<b>PONTO DE EQUILÍBRIO EM RELAÇÃO À RECEITA</b>	<b>R\$ 4.178,99</b>
$H = (G/A)$	% DE EXECUÇÃO DA CAPACIDADE DE EQUILÍBRIO	114,
$I = (G - A)$	<b>DÉFICIT DE RECEITA</b>	<b>R\$ 82,99</b>

Fonte: Elaborado pelos autores, 2016.

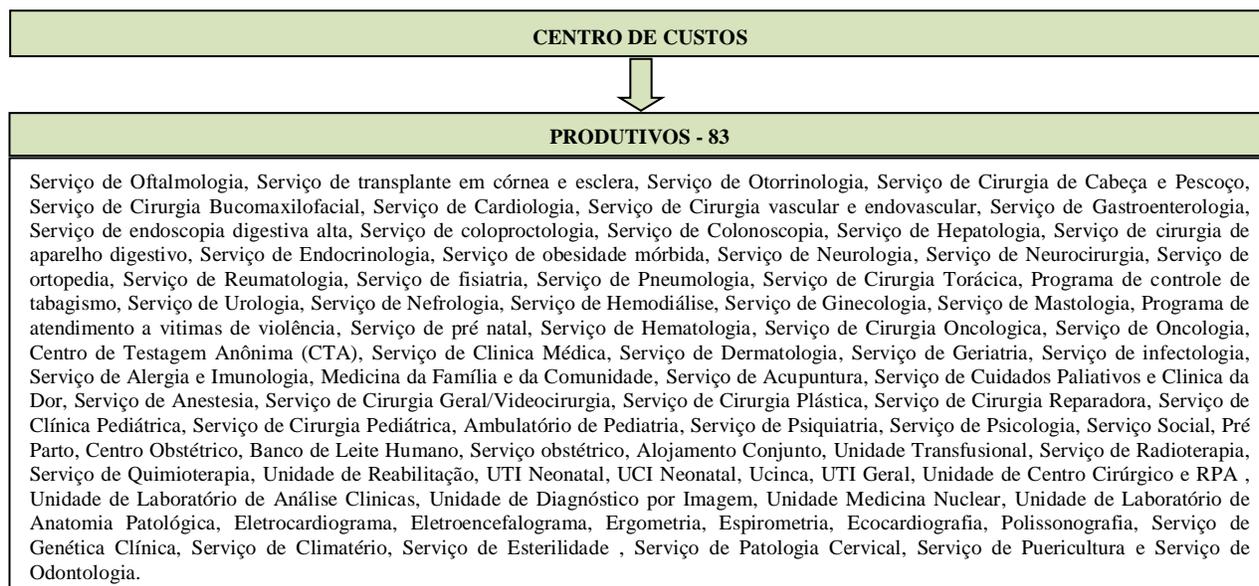
Observa-se na tabela 03, que o resultado bruto encontrado de R\$ 2.409.198,44, resultado da subtração entre o ponto de equilíbrio (R\$ 4.178.991,67) e o percentual do custo variável (42,35%) em relação ao ponto de equilíbrio (R\$ 1.769.793,23) se iguala ao valor correspondente aos custos fixos (R\$ 2.409.198,44) da Instituição, ocasionando um resultado nulo, que indica que Hospital não realiza lucros nem incorre em prejuízo.

**Tabela 03** – Evidenciação do resultado nulo dado ponto de equilíbrio encontrado

	DESCRIÇÃO	R\$ (Mensal)
<b>G</b>	PONTO DE EQUILÍBRIO	R\$ 4.178,99
$J = (G \times E)$	(-) PERCENTUAL DO CUSTO VARIÁVEL (41,01%) EM RELAÇÃO AO PONTO DE EQUILÍBRIO	R\$ 1.769,75
<b>K = (G - J)</b>	(=) <b>RESULTADO BRUTO</b>	R\$ 2.409,19
(B)	(-) CUSTOS FIXOS	R\$ 2.409,19
<b>L = (K - B)</b>	(=) <b>RESULTADO LIQUIDO</b>	R\$

Fonte: Elaborado pelos autores, 2016.

Levando em consideração as especificidades e atividades desenvolvidas na instituição, os centros de custos foram classificados em centros de custos produtivos (83) e não produtivos (82), conforme Figura 3 abaixo.

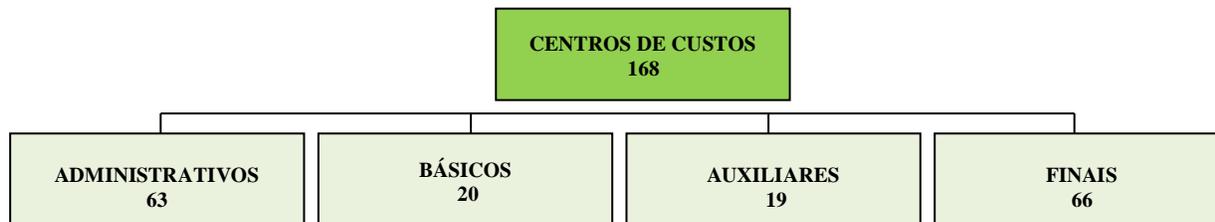


## NÃO PRODUTIVOS - 85

Superintendência, Secretaria da Superintendência, Unidade de Comunicação Social, Auditoria, Ouvidoria, SGTPI, Setor Jurídico, Unidade de Planejamento, Gerência Administrativa, Divisão Administrativa Financeira, Setor de Orçamento e Finanças, Unidade de Programação Orçamentária, Unidade de Liquidação da Despesa, Unidade de Pagamento da Despesa, Setor de Avaliação e Controladoria, Unidade de Contabilidade de Custos, Unidade de Contabilidade Fiscal, Setor de Administração, Unidade de Compras, Unidade de Contratos, Unidade de Licitações, Unidade de Patrimônio, Divisão Logística e Infraestrutura, Setor de Engenharia Clínica, Setor de Infraestrutura Física, Setor de Hotelaria Hospitalar, Setor de Suprimento, Unidade de Almozarifado, Unidade de Abastecimento Farmacêutico, Unidade de Dispensação Farmacêutica, Farmácia Cacon, Farmácia Centro Cirúrgico, Farmácia Ambulatorial, Divisão de Gestão de Pessoas, Unidade de Apoio Operacional, Gerência de Atenção a Saúde, Divisão de Gestão do Cuidado, Unidade Cabeça Pescoço, Unidade do Sistema Cardiovascular, Unidade do Sistema Digestivo, Unidade do Sistema Endócrino, Unidade do Sistema Neuromuscular, Unidade do Sistema Músculo Esquelético, Unidade do Sistema Respiratório, Unidade do Sistema Urinário, Unidade Atenção à Saúde da Mulher, Unidade Hematologia/Oncologia, Unidade Clínica Médica, Unidade Cirurgia Geral, Unidade de Atenção à Saúde da Criança e Adolescente, Unidade Atenção Psicossocial, Setor de Urgência e Emergência, Unidade de Pronto Socorro/Pronto Atendimento, Lactário, Setor de Apoio Terapêutico, Unidade de Radioterapia e Quimioterapia, Unidade Cuidados Intensivos, Central de Material Esterilizado (CME), Unidade de Nutrição Clínica, Serviço de Nutrição clínica, Serviço de Nutrição e Dietética SND, Unidade de Farmácia Clínica, Setor de Apoio Diagnóstico, Unidade de Diagnóstico Métodos Gráficos, Divisão Médica, Divisão de Enfermagem, Setor de Regulação de Saúde, Serviço de Atendimento Médico e Estatística (SAME), Marcação de Consulta, Unidade de Processamento de Informação Assistencial, Admissão e Alta, Setor de Vigilância em Saúde, Serviço de Controle de Infecção Hospitalar, Gerência de Risco, Núcleo Hospitalar de Epidemiologia (NHE), Gerência de Ensino e Pesquisa, Unidade Telessaúde, Setor de Gestão da Pesquisa e Inovação Tecnológica, Setor de Gestão do Ensino, Unidade de Gerenciamento de Atividades de graduação, Unidade de Gerenciamento de Atividades de pós graduação, Serviço de Residência Multiprofissional, Serviço de Residência Médica, Biblioteca Virtual, Gerência do Ambulatório.

**Figura 3** – Classificação dos Centros de Custos em produtivos e não produtivos  
**Fonte:** Elaborado pelos autores, 2016.

Os centros de custos também foram classificados em 4(quatro) grupos, administrativos, básicos, auxiliares e finais, conforme mostra a Figura 4.



**Figura 4** – Classificação dos centros de custos em administrativos, básicos, auxiliares e finais  
**Fonte:** Elaborado pelos autores, 2016.

#### 4. CONCLUSÃO

O Hupaa, sendo um hospital público de ensino, da rede municipal de saúde SUS, e considerado referência em diversos serviços de saúde para o Município de Maceió e Estado de Alagoas, com uma demanda cada vez maior por seus serviços, apresenta um elevado grau de complexidade de seus processos e custos elevados, exigindo uma gestão de custos como condição indispensável para sua satisfatória gestão. Portanto, esse estudo baseou-se na apuração preliminar dos custos do Hospital.

Ressalta-se o elevado custo fixo do Hospital, 58,14%, contribuindo para o aumento do seu ponto de equilíbrio em relação à receita, trazendo riscos para a continuidade da atividade operacional, justificado pelo seu déficit de receita mensal de R\$ 82.990,43, sendo necessário o aumento da produção para minimizar tal risco e suprir o déficit.

O Hospital teve sua principal receita advinda da Contratualização com a Secretaria Municipal de Saúde de Maceió, 42,94%, onde, vinculam-se suas metas de produção assistencial e indicadores de qualidade.



Registra-se pelos autores a necessidade de maior aprofundamento sobre os custos hospitalares, limitado nesse estudo inicialmente pela complexidade do Hospital, onde, utilizou-se o método de custeio variável, tendo em vista a alta complexidade de cálculos em detrimento de tempo para conclusão do trabalho.

## 5. REFERÊNCIAS

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Programa Nacional de Gestão de Custos. Manual técnico de custos – Conceitos e Metodologia. Brasília – DF, 2006.

\_\_\_\_\_. Lei Federal nº 12.550, de 15 de dezembro de 2011. Autoriza o Poder Executivo a criar a empresa pública denominada Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2011-2014/2011/Lei/L12550.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2011/Lei/L12550.htm)>. Acesso em 09/Dez/2015.

MATOS, Afonso José de. Gestão de custos hospitalares: técnicas, análise e tomada de decisão. São Paulo: Editora STS, 2002.

SILVA, E. P. L. S.; COSTA, P. S.; TIBÉRIO, C. S. B. Gestão estratégica de custos: estudo de caso aplicado a hospitais universitários. 2003. Disponível em: <<http://www.intercostos.org/documentos/075.pdf>>. Acesso em: 3 fev. 2014.



ÁREA DE SUBMISSÃO: GESTÃO E ECONOMIA DA SAÚDE - GE 7

## GASTOS FAMILIARES PRIVADOS COM SAÚDE NO BRASIL E EM PERNAMBUCO: UMA ANÁLISE DESCRITIVA COM MICRODADOS DA PESQUISA DE ORÇAMENTOS FAMILIARES

J. M.S.G. ALCOFORADO<sup>1</sup>, I.M.V.S. MEDEIROS<sup>2</sup>, I.C.BARRETO<sup>3</sup>, e J.R.B. NOGUEIRA<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Mestre em Gestão e Economia da saúde, Enfermeira Urgentista, Faculdade de Ciências Humanas de Olinda, Departamento de Enfermagem.

<sup>2</sup> Mestre em Gestão e Economia da saúde, Enfermeira Urgentista, Marinha do Brasil, Hospital Naval Marcílio Dias, Departamento de Enfermagem.

<sup>3</sup> Mestre em Avaliação em Saúde. Enfermeira sanitária, Secretaria Estadual de Saúde Pernambuco

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Sociais Aplicadas, Departamento de Economia

E-mail para contato: irlavida7@gmail.com

*RESUMO – O Brasil é um dos poucos em que o acesso gratuito a medicamentos essenciais é direito dos cidadãos. Porém, análises realizadas nos municípios brasileiros mostram a ocorrência de desabastecimento, descontinuidade da oferta e baixa disponibilidade de medicamentos, o que dificulta o acesso e a continuidade do tratamento. Dessa forma, o gasto com remédios impacta fortemente o orçamento familiar, principalmente das famílias mais pobres. Dessa forma, esse estudo tem como objetivo descrever as desigualdades socioeconômicas no gasto privado com saúde no Brasil e no Estado de Pernambuco, através da análise dos gastos das famílias. O estudo traz uma perspectiva inovadora por fazer uma análise da carga tributária, além de descrever os gastos segundo categorias de medicamentos e apresentar a análise de desigualdades nos dispêndios. Este estudo teve como base os microdados da Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008/2009 tratando-se de um estudo descritivo e estatístico que analisa o comportamento dos domicílios Pernambucanos, em um determinado período de tempo, quanto ao gasto privado com remédios. A análise principal se efetua classificando os domicílios a partir de quintis de renda. A identificação de determinantes do gasto privado e a probabilidade de incorrer em gasto catastrófico em saúde, segue a metodologia da Organização Mundial da Saúde (OMS). Os principais resultados mostram que há desigualdade no gasto com medicamentos em Pernambuco e que a tributação é regressiva, chegando, no Brasil, a comprometer 25% do gasto no primeiro quintil e apenas 11% no último quintil. O índice de Gini calculado para o gasto per capita com medicamentos foi de 0,93%, mostrando uma desigualdade quase que extrema no Brasil.*



*Palavras-chave: Gasto com medicamentos. Desigualdade em saúde. Tributação.  
(um espaço)*

*ABSTRACT- Brazil is one of the few where free access to essential medicines is citizen's right. However, analyzes conducted in Brazilian cities show the occurrence of shortages, supply disruption and low availability of drugs, making it difficult to access and care continuity. Thus, spending on medicines strongly impacts the family budget, especially the poorest families. Thus, this study aims to describe socioeconomic inequalities in private spending on drugs in the state of Pernambuco, through the analysis of household spending. The study brings a new perspective to make an analysis of the tax burden, as well as to describe spending according to categories of medicines and present the analysis of inequalities in expenditures. This study was based on the microdata from the Household Budget Survey (HBS) 2008/2009, being a descriptive and statistical study that analyzes the behavior of Pernambuco households in a given period of time, as private spending on drugs. The main analysis is accomplished by classifying households from quintiles of household gross income and determinants analysis of private spending and the probability of incurring catastrophic health expenditure follows the methodology of the World Health Organization (WHO). The main results show that there is inequality in spending on drugs in Pernambuco and that taxation is regressive, compromising, in Brazil, 25% of expenditure in the first quintile and only 11% in the last quintile. The Gini index calculated for per capita expenditure on drugs was 0.93%, showing almost an extreme inequality in Brazil and the probability of incurring catastrophic health expenditure follows the methodology of the World Health Organization (WHO). The main results show that there is inequality in spending on drugs in Pernambuco and that taxation is regressive, compromising, in Brazil, 25% of expenditure in the first quintile and only 11% in the last quintile. The Gini index calculated for per capita expenditure on drugs was 0.93%, showing almost an extreme inequality in Brazil.*

*Keywords: Expenditure on drugs. Health Inequalities. Taxat*

## **1. INTRODUÇÃO**

O Brasil é um dos poucos países em que o acesso gratuito a medicamentos essenciais é direito dos cidadãos, o que se concretiza por meio de políticas e estratégias, como a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) e a Relação Municipal de Medicamentos Essenciais (REMUME). Dentre outras políticas, estão os medicamentos genéricos, estes foram introduzidos no País em 1999 para reduzir os preços dos medicamentos e facilitar o acesso de toda população. Outra ação ocorreu em 2004, quando o governo federal lançou o Programa Farmácia Popular, que visa diminuir o impacto dos preços dos medicamentos no orçamento familiar a partir do sistema de copagamento, em que o poder público arca com cerca de 90% do valor. Porém, apesar destes avanços, eles não atingem expressiva parte da população (BOING *et al*, 2011).

Dados do Banco Mundial afirmam que, no Brasil, o gasto privado com saúde correspondeu a 57,8% do gasto total com saúde em 2014, valor bem acima quando se compara a países como os Estados Unidos, onde o gasto privado com saúde correspondeu a 22,3% em 2014 (BANCO MUNDIAL, 2014).

Análises realizadas nos municípios brasileiros mostram a ocorrência de desabastecimento, descontinuidade da oferta e baixa disponibilidade de medicamentos no sistema público de saúde, o que dificulta o acesso e a continuidade do tratamento (OLIVEIRA *et al*, 2010; SANT'ANA *et al*, 2011).

O comprometimento de renda com gasto em medicamentos, entre os mais pobres, especialmente os gastos não programados, pode levar famílias a riscos de saúde ainda maiores, como a redução da compra de alimentos, e torná-las mais susceptíveis a outros problemas de saúde, ou, torná-las mais pobres ou até mesmo indigentes. Um maior gasto em saúde pode se tornar catastrófico, caso esse gasto represente pelo menos 40% da renda familiar após o pagamento de seus gastos de subsistência (BOING *et al*, 2011).

No presente estudo, objetivou-se descrever as desigualdades socioeconômicas no gasto privado com saúde no Brasil e em Pernambuco, através da análise dos gastos das famílias com medicamentos. Bem como: Identificar o grupo de medicamentos com maior gasto privado por quintil de renda; Analisar a carga tributária incidente sobre os gastos familiares com esses produtos; e Analisar a desigualdade no consumo de medicamentos através do índice de Gini.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho trata-se de um estudo descritivo e estatístico que analisa o comportamento dos domicílios no Brasil e em Pernambuco, em um determinado período de tempo, quanto ao gasto privado com medicamentos, tendo como fonte de informação os microdados da POF 2008/2009 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Este trabalho trata-se de um estudo descritivo de corte transversal com abordagem quantitativa, com base nos microdados da Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008/2009. A POF permite dimensionar o peso do gasto com saúde em relação aos demais dispêndios familiares. Cujo objetivo é informar acerca da composição do orçamento das famílias brasileiras. O gasto com saúde, objeto desse estudo, nos domicílios pesquisados, é o gasto privado com saúde, ou seja, aquele que é pago diretamente. Assim o gasto privado com saúde, inclui o gasto com consumo final efetivo em serviços médicos, planos de saúde, material médico hospitalar, medicamentos e hospitalização.

A análise de determinantes do gasto privado e a probabilidade de incorrer em gasto catastrófico em saúde segue a metodologia da Organização Mundial da Saúde (OMS) (XU K., 2005). Este deve ser medido através da capacidade de pagamento dos domicílios (diferença entre o gasto total, o gasto de subsistência e o gasto de alimentação). Para este estudo, considerou-se gasto catastrófico como 20%.

Os dados da POF referentes a medicamentos foram inicialmente categorizados em nove grupos de acordo com a classe de medicamentos aos quais pertencem: antibióticos, antidiabéticos, anti-hipertensivos, brônco dilatadores, psicotrópicos, ginecológicos, doenças infectocontagiosas, antialcoolismo e antitabagismo, tratamento do câncer e outros medicamentos.

A renda foi categorizada em quintis, sendo definido o primeiro quintil como o intervalo de renda mais baixa e o último quintil como o intervalo de renda mais alto.

Também foi investigada a participação percentual de grupos de renda no total do gasto com itens selecionados. A participação percentual foi calculada como a proporção dos gastos de cada grupo de renda, em relação ao somatório total do gasto de todas as famílias da amostra, para os grupos de medicamentos descritos acima.

A análise da carga tributária que incide nos domicílios dos tributos indiretos (ICMS, IPI e Outros) dos gastos com saúde, foram obtidos a partir de simulações feitas pelo Grupo de Economia do Setor Público, Decon/UFPE, através do modelo de microsimulação de tributos e benefícios sociais BRAHMS, utilizando a POF 2008-09.

Por último, calculou-se o coeficiente de Gini, que se baseia na curva de Lorenz, que é uma curva de frequências acumuladas que compara a distribuição observada de uma variável com sua distribuição uniforme (de igualdade).

No caso deste estudo, uma situação de desigualdade significaria que as famílias com maior renda absorveriam a maior parcela dos gastos, desonerando as famílias de menor renda. Para o cálculo do coeficiente de Gini da desigualdade nos gastos com medicamentos, foram consideradas todas as famílias, tanto aquelas que tiveram como aquelas que não tiveram gastos com medicamentos.

O processamento computacional dos dados foi realizado por meio do software SPSS Versão 20.

### 3. RESULTADOS

Ao analisar os dados para o Brasil, utilizando os dados da POF 2008-2009, observa-se que os gastos com saúde, aumentam com o aumento do quintil de renda. Além disso, a partir da porcentagem do total de gasto, ou seja, quanto cada quintil gasta em saúde em relação ao total de gastos com saúde, é possível afirmar que existe uma discrepância entre os quintis de renda mais alto e mais baixos, chegando ao ponto do gasto com saúde do quintil mais alto representar 51,9% do total dos gastos com saúde. Em Pernambuco, observa-se no maior quintil 41,4% do total dos gastos com saúde.

No Brasil, ao passar de um quintil de renda mais baixa para um quintil de renda mais alta, o gasto médio com saúde aumenta, chegando a R\$ 8158,69 no quintil de renda mais alta. Ainda, é possível calcular a discrepância que existe entre o gasto do quintil mais alto e o do quintil mais baixo, 8,3 é o número de vezes que os domicílios do quintil mais alto gastam a mais com saúde do que os domicílios com quintil mais baixo. Pernambuco mantém essa mesma tendência. O quintil de renda mais alto apresenta 12,2 vezes o gasto com saúde do quintil mais baixo. Os dados para Pernambuco são condizentes aos dados do Brasil, pois também são crescentes:

É perceptível que, independente do quintil, os gastos com saúde representam quase a mesma parcela do orçamento. Isto corrobora para a hipótese de que o gasto defensivo necessário para a manutenção da saúde é em torno de 10% da renda familiar. Ao analisar por quintil de renda os dados para Pernambuco, percebe-se que estes dados não mudam muito em relação à média nacional, e



que, independente do quintil, os gastos com saúde representam quase a mesma parcela do orçamento, aumentando ligeiramente para 12% no quintil de renda mais alto.

Ao analisar por quintil de gasto total domiciliar com consumo os dados do Brasil, é perceptível que, ao aumentar o nível de consumo, a parcela dos gastos destinada à saúde aumenta ligeiramente, o que demonstra que a parcela destinada aos gastos defensivos com saúde não sofre tanto impacto ao mudar o quintil de análise. Ao analisar os dados de Pernambuco por quintil de gasto total domiciliar com consumo, é perceptível que ao aumentar o nível de consumo, a parcela dos gastos destinada à saúde aumenta ligeiramente.

Os medicamentos foram divididos em nove grupos, de acordo com a sua finalidade terapêutica e a renda foi agrupada em quintis. Pode-se analisar que ao aumentar o quintil de renda no Brasil, os gastos com medicamentos aumentam em quase todos os tipos de medicamento. Os anti-hipertensivos representaram o maior gasto em todos os quintis de renda, seguido dos psicotrópicos, como foi evidenciado por Lima *et al* (2007). Os medicamentos para tratar as doenças infectocontagiosas representaram o menor gasto para o grupo com maior renda, o que pode indicar melhor acesso ao saneamento básico, e as medidas preventivas como: alimentação adequada, boas condições de moradia e acesso a vacinas. Entre os mais pobres os medicamentos destinados ao tratamento do tabagismo e alcoolismo (AA E AT), representaram o menor gasto entre todos os outros grupos de medicamentos.

Vale salientar que despesa privada com saúde no Brasil, conforme retrata a POF, é essencialmente despesa com medicamentos, o que justifica, portanto, baixos valores referentes a outras despesas médicas.

Através dos dados, é possível concluir que no Brasil quanto mais elevado o quintil de renda no país, menor o comprometimento da renda e menor o percentual de domicílios com gasto catastrófico em saúde, o que demonstra a fragilidade social dos domicílios com renda mais baixa no Brasil. Em Pernambuco é possível verificar uma maior fragilidade nos domicílios de mais baixa renda: 25% dos domicílios do quintil mais baixo apresentam gasto catastrófico com saúde.

No país e no Estado de Pernambuco, ao passar do quintil de renda mais baixo para o quintil de renda mais alto, o gasto com saúde aumenta.

Por Pernambuco apresentar a renda per capita mais baixa que a média nacional, é esperada que em todos os quintis, a média nacional de gasto com saúde seja maior que a média de Pernambuco.

Ao analisar a proporção total do imposto indireto em relação à renda domiciliar, é visto que o sistema tributário de impostos indiretos no Brasil, ao se considerar ICMS; IPI e outros; é regressivo, apresentando uma alíquota de 25% nos agentes de quintil mais baixo e 11% no quintil de renda mais elevado. Dessa forma, o sistema de tributação sobre o consumo no Brasil, com base nos dados da POF 2008-2009, causa maior desigualdade de renda na medida em que recai de forma mais intensa naqueles que possuem a menor capacidade de pagamento. Além disso, o imposto indireto que mais impacta contribuindo para este resultado é o ICMS, tendo uma diferença de 9 pontos percentuais. do quintil de renda mais baixo para o de renda mais alto.

Por sua vez, os dados referentes à Pernambuco são condizentes com a média nacional em menor proporção. No quintil mais baixo, a incidência do imposto indireto é de 17%, enquanto que no quintil de renda mais alto é de 13%, tendo o ICMS como principal tributo causador desta diferença. No caso do IPI, os tributos incidentes sobre os dois primeiros quintis são menores do que o terceiro,



quarto e quinto quintil, porém não consegue influenciar inversamente o que o ICMS já o faz. Desta forma, também em Pernambuco, os tributos incidem de forma mais intensiva naqueles com menor capacidade de pagamento, o que, por sua vez, gera uma maior desigualdade econômica.

Quanto mais próximo o índice de Gini for de 1, maior a desigualdade apresentada no indicador. A menor desigualdade é apresentada pelo Gini calculado a partir do gasto total domiciliar, seguido do gasto total domiciliar com consumo, renda total domiciliar e, por fim, gasto total domiciliar com saúde. Este apresenta o valor de 0,93 e representa quase desigualdade extrema, e mostra o quão preocupante é a situação dos gastos com saúde no país. Domicílios com renda mais baixa não têm a capacidade de arcar com o custo alto de planos de saúde e de medicamentos.

O sistema tributário indireto regressivo, apresentada nos indicadores usados para o cálculo do Gini, pode ser, em parte, resolvida. À medida que o sistema tributário indireto apresente a concreta definição de essencialidade quando se refere ao ICMS, e aos demais impostos indiretos.

#### 4. DISCUSSÕES

Neste estudo os medicamentos anti-hipertensivos são os medicamentos com maior gasto privado em todos os quintis de renda, tal afirmação é corroborada por Lima et al (2007) ao analisar a composição dos gastos privados com medicamentos pelos idosos em Minas Gerais, utilizando um inquérito populacional. O percentual de gasto para medicamentos do sistema cardiovascular foi de 26,4%, seguido do sistema nervoso que foi de 24,3%. Nesse estudo, ainda foi possível detectar que apenas 5% do gasto privado com medicamento foi decorrente da compra de medicamentos genéricos. O estudo também sugere que o gasto privado foi maior do que o gasto público com saúde. Santos-Pinto *et al* (2011) afirmam que a análise do consumo dos medicamentos no programa de Farmácia Popular Brasileiro em todas as Regiões, evidenciou que entre os 10 medicamentos mais vendidos 64% são medicamentos que atuam no sistema cardiovascular.

Os psicotrópicos aparecem em segundo lugar, quanto ao gasto privado com medicamentos. Transtornos mentais comuns (TMC) são altamente prevalentes e têm sido consistentemente associados a piores condições socioeconômicas em diferentes países, incluindo-se o Brasil. Pessoas com TMC têm maior probabilidade de buscar atendimento em serviços de saúde, aspecto fundamental no planejamento e execução de políticas públicas voltadas para a saúde. Lima *et al* (2008) num estudo realizado em Botucatu evidenciou que, 18,5% das mulheres e 8,0% dos homens, fizeram uso de ao menos um psicofármaco. Observou-se também uma associação com faixa etária: quanto maior a idade, maior o risco de o sujeito ter feito uso de psicotrópicos. Donas de casa e aposentados também se destacaram dos demais no relato de uso de ao menos um psicotrópico (26,6% e 20,6%, respectivamente). Não se observou associação com renda e com o uso de psicofármacos em geral (LIMA *et al*, 2008).

Medicamentos para o tratamento da dependência de tabaco e álcool apresentaram o menor gasto do primeiro ao quarto quintil de renda. Noto e Galduroz (1999) ressaltam que o álcool, o tabaco e alguns medicamentos psicotrópicos (especialmente ansiolíticos e anfetaminas), embora não tão alardeados, continuam sendo as drogas mais consumidas e as que trazem os maiores prejuízos à população brasileira. Porém, as políticas e estratégias preventivas são pouco consistentes para essas drogas, deixando aberto espaço para campanhas publicitárias cada vez mais sofisticadas para a promoção do consumo que mascaram os inúmeros problemas sociais que envolvem o abuso do álcool e do tabaco.



O gasto catastrófico com saúde também foi menor para os dois quintis de renda mais alto, tanto no Brasil quanto em Pernambuco. O quintil de renda mais baixo no Brasil teve 21% dos domicílios com gasto catastrófico, em Pernambuco esse número foi ainda maior ficando em torno de 25% dos domicílios. Barros e Bertold (2008) num estudo feito com a população assistida pelo Programa de Saúde da família em Porto Alegre com 869 domicílios, identificou que os medicamentos foram responsáveis por 47% do gasto domiciliar privado com saúde e em segundo lugar, os planos de saúde com 22% do gasto. Os mais ricos gastam 70 vezes mais com planos de saúde do que os mais pobres, 26 vezes mais com tratamento odontológico e seis vezes mais com medicamentos. Cerca de 16% das residências gastaram 20% ou mais de sua renda com saúde independentemente da situação econômica e 12% dos domicílios gastaram além de 40% da sua capacidade de pagamento.

Xu *et al* (2003 *apud* BARROS *et al*, 2011), numa análise realizada em vários países, revelou que o gasto catastrófico com saúde é algo preocupante na América do Sul e o Brasil é um dos países que apresentam maior proporção de famílias com gasto catastrófico com saúde no mundo, com cerca de 10% das famílias tendo gasto catastrófico em saúde.

A limitação desse estudo refere-se a não utilização de modelos econométricos. Porém, foi possível, através de uma análise transversal dos dados, a obtenção de resultados contundentes quanto ao acesso de saúde no país, o qual se mostrou bastante excludente.

#### 4. CONCLUSÃO

- Os gastos com saúde aumentam com o quintil de renda;
- O gasto defensivo com saúde é em torno de 10% do orçamento;
- O grupo terapêutico com maior gasto são os anti-hipertensivos seguido dos psicotrópicos;
- O sistema tributário é regressivo;
- O índice de Gini é 0,93, o que representa quase a desigualdade extrema.

#### 5. REFERÊNCIAS

- BANCO MUNDIAL. Out-of-Pocket Health Expenditure (%) of Private Expenditure on Health. 2014 Disponível em: <<http://data.worldbank.org/indicator/SH.XPD.OOPC.ZS>> Acesso em: 01/10/2015.
- BARROS, A. J. D.; BERTOLDI, A. D. Out-of-pocket health expenditure in a population covered by the Family Health Program in Brazil. *International Journal of Epidemiology*. 2008;37:758–765. Disponível em: <<http://ije.oxfordjournals.org/content/37/4/758.full.pdf>> Acesso em: 22/03/2016.
- BOING, A. C.; BERTOLDI, A. D.; PERES, K. G. Desigualdades socioeconômicas nos gastos e comprometimento da renda com medicamentos no Sul do Brasil. *Revista Saúde Pública*. V. 45, n. 5, p. 897-905. São Paulo-SP, 2011. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-89102011000500011&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102011000500011&lng=en&nrm=iso)> Acesso em: 11/10/2015.
- CID, P.C; PRIETO, T. L. El gasto de bolsillo en salud: el caso de Chile. 1997 y 2007. *Rev Panam Salud Publica*. 2012;31(4)310–16.



- IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares- POF 2008/2009. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em :02 out. 2015.
- LIMA, M. G.; RIBEIRO, A.Q.; ACURCIO, F.A.; ROZENFELD, S. KLEIN, C.H. Composição dos gastos privados com medicamentos utilizados por aposentados e pensionistas com idade igual ou superior a 60 anos em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 23(6):1423-1430, jun, 2007.
- LIMA, M. C. P.; MENEZES, P. R.; CARANDINA, L. *et al.* Transtornos mentais comuns e uso de psicofármacos: impacto das condições socioeconômicas. *Rev. Saúde Pública*. 2008;42(4):717-23. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-89102008000400019](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102008000400019)> Acesso em: 19/03/2016.
- NOTO, A.R.; GALDUROZ, J.C. F. O uso de drogas psicotrópicas e a prevenção no Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva*, 4(1):145-151, 1999. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-81231999000100012&script=sci\\_abstract&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-81231999000100012&script=sci_abstract&tlng=pt)> Acesso em: 23/03/2016.
- OLIVEIRA, L. C. F. de; ASSIS, M. M. A.; BARBONI, A. R. Assistência Farmacêutica no Sistema Único de Saúde: da Política Nacional de Medicamentos à Atenção Básica à Saúde. *Revista Ciência e Saúde Coletiva*. V. 15, supl. 3, p. 3561-3567. Rio de Janeiro-RJ: Nov, 2010. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S141381232010000900031&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S141381232010000900031&lng=en&nrm=iso)> Acesso em: 11/10/2015.
- SANT'ANA, J. M. B.; PEPE, V. L. E.; OSORIO-DE-CASTRO, C. G. S; VENTURA, M. Essencialidade e Assistência Farmacêutica: Considerações sobre o Acesso a Medicamentos Mediante Ações Judiciais no Brasil. *Rev Panam Salud Publica*. v. 29, n. 2, p. 138-144. Washington – EUA: Fev., 2011 . Disponível em: <[http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1020-49892011000200010&lng=en&nrm=iso](http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1020-49892011000200010&lng=en&nrm=iso)> Acesso em: 11/10/2015.
- XU K. Distribucion del Gasto em salud y gastos catastróficos. Discussion paper nº 2. Genebra, Suiza: WHO, 2005.



ÁREA DE SUBMISSÃO: GESTÃO, ECONOMIA E SAÚDE - GE 9

## COMPRA CENTRALIZADA DE MEDICAMENTOS: UMA ECONOMIA DA SAÚDE EFICIENTE?

D. M. BARREIRA FILHO<sup>1</sup>, K. B. N. T. BARROS<sup>1</sup>, E. M. RODRIGUES NETO<sup>1</sup>, R. M. S. PRADO<sup>1</sup>,  
M.G. BARREIRA<sup>1</sup>, J. L. S. SOBRINHO<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro Universitário Católica de Quixadá, Professor do Curso de Farmácia

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Professor do Curso de Farmácia

E-mail para contato: donatomileno@unicatolicaquixada.edu.br

*RESUMO - O trabalho tem como objetivo analisar o modelo de compra centralizada de medicamentos da atenção básica de Banabuiú/CE frente a outros municípios que utilizam o modelo de compra descentralizado. Trata-se de um estudo retrospectivo e comparativo entre a Programação Pactuada e Integrada de Medicamentos de 2012 de Banabuiú/CE, com o Relatório Anual de Gestão da Assistência Farmacêutica do Estado de Pernambuco de 2012. Foi possível concluir que é vantajoso o uso da compra centralizada para a aquisição dos medicamentos da atenção básica em municípios com características, de população e índices econômicos, semelhantes ao município em análise, pois adquire o medicamento por um menor preço.*

*Palavras-chave: CEME. Política Nacional de Medicamentos. RENAME. Assistência Farmacêutica. SUS.*

*ABSTRACT - The work aims to analyze the centralized purchasing of medicines model of the primary care from Banabuiú CE, compared to other municipalities that use the decentralized purchasing model. It is a retrospective and comparative study between the Agreed and Integrated Programming of Medicines of 2012 from Banabuiú CE, with the annual Pharmaceutical Care Management Report from the State of Pernambuco of 2012. It was possible to conclude that the use of centralized purchasing is advantageous for the purchase of medicines of the primary care in municipalities with characteristics of population and economic indices, similar to the municipality under analysis, because we can acquire the medication for a lower price.*

*Keywords: CEME. National Medicines Policy. RENAME. Pharmaceutical Care. SUS.*



## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS), é apontado como uma grande conquista da sociedade, tendo em vista o seu caráter de política estatal que promoveu ampla inclusão social. O SUS, criado pela Constituição Federal de 1988 (BRASIL, 2007) e institucionalizado pela Lei Orgânica da Saúde (BRASIL, 2008), é reconhecido em decorrência de seus princípios de universalidade e igualdade no atendimento e de integralidade das ações e serviços de saúde. A integralidade pressupõe que as ações de promoção, proteção e recuperação da saúde não podem ser separadas; assim, as unidades prestadoras de serviço devem contemplar os vários graus de complexidade da assistência à saúde (Brasil, 1990).

A assistência terapêutica integral, incluindo a assistência farmacêutica, também é área de atuação do SUS (BRASIL, 2008). A Política Nacional de Medicamentos (PNM) definiu a assistência farmacêutica como um grupo de atividades relacionadas com o medicamento, destinadas a apoiar as ações de saúde demandadas por uma comunidade (Brasil, 1990). De acordo com Marin *et al.* (2009) esclarecem que, “para o Brasil, o termo Assistência Farmacêutica envolve atividades de caráter abrangente, multiprofissional e intersetorial, que situam como seu objeto de trabalho a organização das ações e serviços relacionados ao medicamento em suas diversas dimensões, com ênfase à relação com o paciente e a comunidade na visão da promoção da saúde”. Em 2004, o Conselho Nacional de Saúde publicou o documento da Política Nacional de Assistência Farmacêutica (PNAF), que reforça a idéia de que a assistência farmacêutica é parte do cuidado à saúde individual ou coletiva, tendo no medicamento o insumo essencial, cujo acesso deve ser garantido com uso racional (Brasil, 2009).

Desta forma, o SUS é a forma constitucional brasileira de o cidadão ter garantido o acesso a ações e serviços de saúde, o que inclui a assistência farmacêutica (Brasil, 1990; Carvalho *et al.*, 1995; BÉrmudez *et al.*, 1999). O medicamento é um insumo importante para o bem-estar das populações e deve ser encarado como um meio, uma possibilidade a ser usada tanto para prevenir agravos, quanto também para recuperar a saúde. Nessa perspectiva, a ênfase deve ser no usuário do medicamento e devem ser pensadas ações individuais e coletivas para promover o acesso aos fármacos necessários (Ferraes *et al.*, 2002).

Visando normalizar a participação das três esferas de governo no financiamento da assistência farmacêutica (AF), o Ministério da Saúde (MS) emitiu a Portaria Nº 176/99 estabelecendo critérios e requisitos para habilitar municípios e estados ao Incentivo à Assistência Farmacêutica Básica (IAFB), incluído no Piso de Atenção Básica (PAB). A portaria relata que os recursos deveriam ser disponibilizados, a cada mês, na conta do Fundo Municipal de Saúde ou do Fundo Estadual de Saúde, de acordo com pacto realizado no âmbito da Comissão Intergestores Bipartite /CIB/ (Brasil, 1999, 2000, 2001, 2002).

Seguindo o processo de descentralização do SUS, a aquisição dos medicamentos essenciais passou a ser de responsabilidade dos municípios, com as mesmas dificuldades inerentes à sua operacionalização. Além disso, a despeito do orçamento público finito, o custo dos medicamentos tem aumentado ao longo dos anos (Vieira, 2009).

O presente estudo tem como objetivo analisar o modelo de compra centralizada de medicamentos da atenção básica de Banabuiú/CE, realizada pela Coordenadoria de Assistência

Farmacêutica do Estado do Ceará (COASF/CE), através do comparativo do custo de aquisição destes medicamentos da atenção básica, fazendo um comparativo com a compra descentralizada os municípios da Assistência Farmacêutica do Estado de Pernambuco.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

É um estudo retrospectivo, da Programação Pactuada e Integrada de Medicamentos (PPI de medicamentos), do ano de 2012, fundamentado na pesquisa do Relatório Anual de Gestão da Assistência Farmacêutica do Estado de Pernambuco de 2012 (RAG/AF/PE/2012) e documental. Foi realizado na Assistência Farmacêutica de Banabuiú/CE, e na Assistência Farmacêutica do Estado de Pernambuco, no período de junho de 2013 à abril de 2014. O nosso banco de dados foi resultado dos medicamentos adquiridos, quantidades, valor monetário unitário e modelo de compra (centralizado ou descentralizado), foram realizados a partir de notas fiscais emitidas pelo COASF/CE à Assistência Farmacêutica de Banabuiú/CE e pelo Relatório Anual de Gestão da Assistência Farmacêutica do Estado de Pernambuco de 2012 (RAG/AF/PE, 2012).

Nossa amostra foi obtida a partir da curva ABC do componente básico da Assistência Farmacêutica de Banabuiú/CE do ano de 2012. Onde foi calculado a partir da quantidade pactuada (comprada) e do valor unitário de cada medicamento da atenção básica que compôs a Relação Municipal de Medicamentos (REMUME) de Banabuiú/CE.

A comparação do custo de aquisição pela Assistência Farmacêutica Básica de Banabuiú/CE através da compra centralizado realizado pelo COASF/CE, com a compra descentralizada de medicamentos, somente foi possível através da utilização do RAG/AF/PE, 2012 fornecido pela Assistência Farmacêutica do Estado de Pernambuco. Utilizamos a curva A do ano de 2012 da Assistência Farmacêutica Básica de Banabuiú, onde foi possível verificarmos o modelo mais eficiente de compra (centralizado ou descentralizado). O RAG/AF/PE/2012 foi enviado ao pesquisador, com os municípios distribuídos em quatro macrorregionais do Estado de Pernambuco. Dos 185 municípios, incluindo Fernando de Noronha, somente 65 municípios enviaram o RAG/AF/PE/2012.

O critério utilizado para a escolha dos municípios Pernambucanos, foi que cada macrorregional fosse contemplado com um município e que este possuísse características de população e índices econômicos semelhantes ao município de Banabuiú/CE, conforme tabela 1.

Tabela 1- Comparativo da população e dos índices econômicos dos municípios do Estado de Pernambuco escolhidos

Municípios	População	IDH	Renda percapta (R\$)	Índice de Gin
Banabuiú/CE	17.775	0,606	229,99	0,55
São Vicente Ferrer/PE	17.151	0,549	257,47	0,56
Camocim de São Félix/PE	17.405	0,588	305,53	0,53
Carnaíba/PE	18.707	0,583	229,87	0,53
Cedro/PE	10.964	0,615	269,64	0,56

Fonte: ATLAS BRASIL, 2013

A análise estatística foi realizada para que fosse possível afirmar que as características de população e índices econômicos dos municípios pernambucanos fossem estatisticamente relevantes quando comparado ao município de Banabuiú/CE. Utilizamos o Teste t de Student ou Teste t, onde consiste em formular uma hipótese nula ( $H_0$ ) e consequentemente uma hipótese alternativa ( $H_1$ ). Fizemos o estudo da média das populações e dos índices econômicos, onde  $H_0$  = as médias são iguais e  $H_1$  = as médias são diferentes, conforme tabela 2.

Tabela 2- Análise estatística da população e dos índices econômicos dos municípios do Estado de Pernambuco com Banabuiú/CE

	Banabuiú/CE	Cidades de PE	T calculado	T crítico
População	17.775	16.056,000	-0,9928087	$-3,182 \leq t \leq 3,182$
IDH	0,606	0,580	-1,919	$-3,182 \leq t \leq 3,182$
Renda percapta (R\$)	229,99	265,620	2,27112686	$-3,182 \leq t \leq 3,182$
Índice de Gini	0,55	0,540	-1,1547005	$-3,182 \leq t \leq 3,182$

Através desta análise estatística, foi possível afirmar que o T calculado não pertence à região crítica, em nenhum dos casos; portanto aceita-se  $H_0$ . Logo, as características consideradas, população e índices econômicos são estatisticamente relevantes.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A REMUME da atenção básica de Banabuiú/CE do ano de 2012, constou de 116 itens. Foi realizada uma curva ABC, onde foi possível a seguinte análise e trabalhamos a Curva A de cada ano, conforme tabela 3.

Tabela 3 - Análise do custo da compra de medicamentos da atenção básica

AF/BNB	2012
Custo da compra centralizada (R\$)	151.884,88
Total de itens da curva A	34
% de itens da curva A	29,3
Valor da curva A (R\$)	99.473,59
% do custo da curva A	65,5

Realizamos o comparativo do custo de compra dos medicamentos da Assistência Farmacêutica Básica de Banabuiú/CE utilizando a curva A de medicamentos da atenção básica de Banabuiú do ano de 2012, que possui 34 itens, e fizemos o comparativo com o modelo de compra descentralizado de medicamentos da atenção básica dos quatro municípios entregaram RAG/AF/PE/2012 e que foram selecionados de acordo com a tabela 4.

Tabela 4- Municípios selecionados da Assistência Farmacêutica de Pernambuco

Município	População (ha)	Número de itens comuns da Curva A/2012 de Banabuiú
São Vicente Ferrer	17.151	25



Camocim de São Félix	17.405	25
Carnaíba	18.707	16
Cedro	10.964	19

Os municípios escolhidos pertencem às 1ª, 2ª, 3ª e 4ª macrorregional, respectivamente, e todos possuem população próxima a do município de Banabuiú, cerca de 17.775 habitantes (IBGE, 2014), com exceção do município de Cedro, que foi escolhido, por ser o único município com população inferior a 20.000 habitantes da 4ª macrorregional que enviou a RAG/AF/PE/2012.

A análise de preços da compra centralizada dos medicamentos do componente básico de Banabuiú com os municípios de compra descentralizada do Estado de Pernambuco foi iniciado com o município de São Vicente Ferrer da 1ª Macroregião/PE, que adquiriu em 2012, segundo a RAG/AF/PE/2012, 25 itens dos 34 itens da Curva A/2012 de Banabuiú. Foi realizado um comparativo do custo monetário para aquisição dos 25 itens comuns aos dois municípios onde foi constatado que a compra centralizada de Banabuiú foi de R\$ 78.075,78 e a compra descentralizada de São Vicente Ferrer custou R\$ 116.491,00. É possível verificar que a diferença da compra centralizada para a compra descentralizada foi de R\$ 38.415,22 nos leva a afirmar que com a compra centralizada obteve uma economia de 49,2%.

A segunda análise foi com o município de São Félix, que pertence a 2ª macrorregião do estado de Pernambuco. Dos 25 itens adquiridos, pelo município de São Félix, em 2012, segundo a RAG/AF/PE/2012, fazendo o comparativo do custo monetário para aquisição dos 25 itens comuns, Banabuiú desembolsou R\$ 80.290,18 e com a compra descentralizada de São Félix R\$ 216.072,60. Portanto, houve uma economia de R\$ 135.782,42

O município de Carnaíba foi o outro município escolhido e pertence a 3ª macrorregional de PE. Utilizamos 16 itens adquiridos, pelo município, em 2012, segundo a RAG/AF/PE/2012, fazendo o comparativo de preços com os 16 itens em comum do município de Banabuiú, foi possível uma terceira análise da compra descentralizada, que nos revelou que a compra centralizada de Banabuiú gastou R\$ 54.061,21 e na compra descentralizada de Carnaíba R\$ 178.593,50 gerando uma economia de R\$ 124.532,29 representando uma diminuição dos custos pela compra centralizada, em torno de 230,3%.

Na 4ª macrorregional do estado de Pernambuco o único município com população menor que 20.000 habitantes e que enviou a RAG/AF/PE/2012 foi o município de Cedro, que possui uma população de 10.964 habitantes (IBGE, 2010), inferior que a população de Banabuiú. Logo, Cedro foi o município que utilizamos para o estudo dos modelos de compra centralizado e descentralizado. O comparativo de preços de compra do município de Cedro constou com os 19 itens em comum ao município de Banabuiú, que custou R\$ 63.434,70 na compra descentralizada realizada de Cedro teve um custo de R\$ 339.310,00. Portanto, o município de Cedro obteve a maior diferença do custo para a aquisição dos medicamentos comparados ao município de Banabuiú, revelando uma diferença de R\$ 275.875,30 o que representa um acréscimo de 434,8% mais caro realizar a aquisição destes medicamentos pela compra descentralizada.

#### 4. CONCLUSÃO

Através do Relatório Anual de Gestão da Assistência Farmacêutica do Estado de Pernambuco/2012 (RAG/AF/PE/2012) foi realizado o comparativo entre a compra centralizada de Banabuiú/CE com os quatro municípios pernambucanos, São Vicente Ferrer, Camocim de São Félix, Carnaíba e Cedro, que realizaram a compra descentralizada, e concluímos que a redução dos custos de aquisição dos medicamentos em estudo pela compra centralizada foi de 49,2%, 169,1%, 230,3% e 434,8%, respectivamente.

Desta forma, foi possível concluir que o custo de aquisição de medicamentos da atenção básica para municípios com características semelhantes ao município em análise, Banabuiú/CE, é vantajoso o uso da compra centralizada, pois adquire o medicamento com um menor preço.

## 5. REFERÊNCIAS

ATLAS BRASIL. Atlas do desenvolvimento humano no Brasil 2013. Disponível em: <[http://atlasbrasil.org.br/2013/perfil\\_print/cedro\\_pe](http://atlasbrasil.org.br/2013/perfil_print/cedro_pe)>. Acesso em: 10 Set. 2016.

BERMUDEZ, J. A. Z.; BONFIM, J. R. de A. *Medicamentos e a reforma do setor saúde*. São Paulo: Hucitec, Sobravime, 1999.

BRASIL. Constituição (1988). Constituição da República Federativa do Brasil: promulgada em 5 de outubro de 1988. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 1988.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Lei nº 8080 de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 1990.

\_\_\_\_\_. Lei 8 080/1990. Disponível em: <[planalto.gov.br/ccivil\\_03/Leis/L8080.htm](http://planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L8080.htm)>. Acesso em: 18 ago. 2008.

\_\_\_\_\_. Lei Federal n. 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para promoção, proteção, recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. Brasília, DF, 1990.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Política Nacional de Medicamentos. Brasília, DF, 1999. Disponível em: <[bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica\\_medicamentos.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_medicamentos.pdf)>. Acesso em: 18 ago. 2009.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria Executiva. Departamento de Programas Estratégicos em Saúde. Registro nacional de preços de medicamentos e correlatos: produtos disponíveis no Banco de Preços em Saúde. Brasília, DF, 2000a. Relatório extraído do sistema SAA da Subsecretaria de Assuntos Administrativos. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/banco/>>. Acesso em: 18 Out. 2016.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Gerência Técnica de Assistência Farmacêutica. Incentivo à assistência farmacêutica básica: o que é e como funciona. Brasília, DF, 2001.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Gerência Técnica de Assistência Farmacêutica. Assistência farmacêutica na atenção básica: instruções técnicas para sua organização. Brasília, DF, 2002.

\_\_\_\_\_. Portaria GM no 176/99. Estabelece critérios e requisitos para a qualificação dos municípios e estados ao incentivo à assistência farmacêutica básica e define valores a serem transferidos. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/doc/portariagm176/gm.htm>>. Acesso em: 20 Set. 2016.



\_\_\_\_\_. Senado Federal. Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília: Senado Federal/Subsecretaria de Edições Técnicas, 2007.

CARVALHO, G. I. de; SANTOS, L. Comentários à Lei Orgânica de Saúde (Lei 8.080/90 e Lei 8.142/90): Sistema Único de Saúde. São Paulo: Hucitec, 1995.

FERRAES, A. M. B.; CORDONI JUNIOR, L. O medicamento, a farmácia, o farmacêutico e o usuário: novo século, novas demandas. *Revista Espaço para Saúde*, Londrina, v. 4, n. 1, dez. 2002. Disponível em: <[www.ccs.uel.br/espacoparasaude/v4n1/index.htm](http://www.ccs.uel.br/espacoparasaude/v4n1/index.htm)>. Acesso em: 12 set. 2005.

IBGE. Senso 2010. Disponível em: <<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/home.php>>. Acesso em: maio 2016.

MARIN, N. *et al.* Assistência Farmacêutica para gerentes municipais. Brasília: OPAS; OMS, 2003.

VIEIRA, F. S. Gasto do Ministério da Saúde com medicamentos: tendência dos programas de 2002 a 2007. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 43, n. 4, p. 674-81, 2009.



ÁREA DE SUBMISSÃO: GESTÃO, ECONOMIA E SAÚDE - GE 10

## SEGURANÇA DO PACIENTE SOB A ÓTICA DA DIMENSÃO DO CUIDADO DE SAÚDE

J.A SILVA<sup>1</sup>; F.C.M. PINTO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, Núcleo de Saúde Coletiva.  
josysilvamacedonia@hotmail.com

**RESUMO** - *Este trabalho teve por objetivo avaliar o padrão de cumprimento das normas de Segurança do Paciente na Clínica Médica (UCM) de um hospital de ensino. Foi utilizada a metodologia quantitativa de natureza descritiva, por meio da análise dos indicadores do Plano de Segurança do Paciente (PSP) da Instituição de saúde. Para coleta dos dados utilizou-se um formulário adaptado da EBSEH. A coleta foi conduzida por meio de visualização direta das condições apresentadas tanto na estrutura quanto nos processos de trabalho das equipes da UCM. Os parâmetros usados para auxiliar na análise foram abordados em três grandes áreas: Cultura Organizacional; Funcionamento do Núcleo de Segurança do Paciente e Gestão de Riscos. Com base na Joint Commission International (JCI) foi estabelecido o Índice de Conformidade (IC) ideal  $\geq 80\%$  para todos os indicadores descritos, ou seja, o percentual de adequação que reflete a segurança em relação à assistência prestada. Tendo como principais resultados: Quanto a Cultura Organizacional observou-se um IC de 60,97%. Quanto aos Processos de Gestão de Risco teve um IC de 60,0%, e quanto ao Núcleo de Segurança do Paciente na UCM, trazendo um IC de 56,25%. Desta forma conclui-se a necessidade da implementação de medidas que assegurem a instituição de uma cultura voltada para a segurança do paciente, identificando erros, adequando processos e promovendo melhorias e incentivos, na busca pela qualidade da assistência à saúde.*

**Palavras chave:** *Gestão da Qualidade; Segurança do Paciente; Gestão de Riscos em Saúde.*

**ABSTRACT** - *The object of this study was to evaluate the standard of compliance with patient safety standards in Internal Medicine (UCM) at the Clinical Hospital in Pernambuco. It was used the quantitative methodology, through the analysis of Patient Safety Plan indicators (PSP) of the Clinical Hospital. To data collection was used an adapted form of EBSEH. The collection was conducted through visualization direct the conditions presented in both the structure and the work processes of the teams of UCM. The parameters used to perform the analysis were divided in three areas: organizational Culture; Safety Core operation of the Patient; and Risk Management. Based on the Joint Commission International (JCI) was*



*established Conformity Index (CI) ideal  $\geq 80\%$  for all indicators described, i.e. the adequacy percentage that reflects the safety for the assistance provided. Its main results: The Organizational Culture there was a CI of 60.97%. As for the Risk Management Process had an IC 60.0%, and for the Patient Safety Center at UCM, bringing an IC 56.25% . This way concludes the need to implement measures to ensure the establishment of a culture focused on patient safety, identifying errors, adapting processes and promoting improvements and incentives in the search for quality health care.*

*Keywords: Quality Management; Patient safety; Health Risk Management.*

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos o tema Segurança do Paciente (SP) vem sendo amplamente discutido na busca da melhoria da qualidade da assistência a saúde, pois eventos adversos (EA) relacionados à assistência são frequentes, tornando a SP como um componente crítico de melhoria da qualidade do cuidado de saúde em todo o mundo, visto que constitui globalmente um grave problema de saúde pública (Reis, 2013).

Estudos indicam que pelo menos um em cada dez pacientes que recebem cuidados assistenciais em hospitais sofre danos ou lesões decorrentes dos mesmos. As consequências desses danos podem ser graves ou fatais, gerando altos gastos para suas vítimas e para os sistemas de saúde (Fragata, 2011).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a segurança do paciente é definida como a redução, a um mínimo aceitável, do risco de dano desnecessário associado ao cuidado de saúde (Mendes, 2012).

Antigamente não se possuía uma assistência especializada e mesmo assim não era permissivo errar, isso pode ser justificado pela afirmação de Hipócrates (460-377.a.C) “*Primum non nocere*” (do latim, *primeiro não cause dano*) e também por Florence Nightingale (1859) “(...) Talvez pareça estranho enunciar como primeiro dever de um hospital não causar mal ao paciente”.

Contudo, séculos se passaram e com frequência são notificados incidentes com ou sem danos ao paciente. Incidente pode ser definido como um evento ou circunstância que poderia ter resultado, ou resultou, em dano desnecessário ao paciente. Incidentes podem ser oriundos de atos não intencionais ou intencionais, e são classificados como: *Near Miss* (ou quase falha), incidente que não atinge o paciente; Incidente sem dano é o incidente que atinge o paciente, mas não causa dano; e Incidente com dano (eventos adversos), aquele que atinge o paciente e resulta em lesão. O evento sentinela é um incidente envolvendo óbito, qualquer lesão física ou psicológica ou o risco de sua ocorrência. O evento sentinela é, portanto, um incidente com repercussões mais graves que o adverso (Duarte, 2015).

A publicação do relatório sobre erros relacionados com a assistência à saúde, *Errar é humano: construindo um sistema de saúde mais seguro*, em 1999, apontando a elevada ocorrência de eventos adversos nos hospitais, sendo 44.000 a 98.000 óbitos evitáveis por ano nos EUA (Estados Unidos da América), causados por erro médico, veio como um marco para mobilização do movimento mundial sobre a SP, tendo como seu primeiro desafio global infecções relacionadas à assistência “Uma assistência limpa é uma assistência segura” (Anvisa, 2011).

Como resposta aos fatos e consequências decorrente de erros humanos a *Joint Commission International (JCI)* lançou em 2011 a quarta edição da *Standards Lists Version* onde no capítulo sobre os Objetivos Internacionais para a Segurança do Paciente (*International Patient Safety Goals* -



IPSG) existem seis metas. São elas: 1) Identificar os pacientes corretamente; 2) Melhorar a comunicação eficaz; 3) Melhorar a segurança dos medicamentos de alto risco; 4) Assegurar sítio, procedimentos e pacientes corretos nas cirurgias; 5) Reduzir o risco de infecções associadas aos cuidados de saúde; e, 6) Reduzir o risco do paciente de danos resultantes de quedas (Jci, 2011).

Esta proposta de pesquisa tem origem na participação da autora na disciplina eletiva “Gerenciamento de Risco e Segurança do Paciente” e em um projeto de Extensão Qualis mais Saúde: Análise de Indicadores e Processos para Gestão de Qualidade. Considerando a magnitude do tema SP e sua relevância na dimensão do cuidado em saúde e na qualidade da assistência, torna-se fundamental o desenvolvimento de estudos que permitam avaliar a relação entre os processos de cuidado em saúde e os resultados provenientes dele, na garantia de melhorar a qualidade assistencial na rede hospitalar.

Esta é uma proposta inovadora por estudar sobre a SP sob a ótica da dimensão do cuidado na Clínica Médica de um Hospital de ensino no Estado de Pernambuco permitindo uma compreensão abrangente acerca da adaptação da instituição de saúde em relação aos riscos humanos e operacionais relacionados ao processo de trabalho.

Avaliar a SP no hospital permite identificar e gerir antecipadamente questões relevantes de segurança nas rotinas de trabalho. Com base nos pressupostos necessários, mais estudos na temática em questão com o intuito de atingir os seguintes objetivos: “Avaliar o padrão de cumprimento das normas de segurança do paciente na clínica médica de um hospital de ensino em Pernambuco; Mensurar os riscos inerentes aos processos de trabalho no setor de clínica médica, considerando as metas internacionais de segurança do paciente, definidas pela *Joint Commission International*;

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Estudo de natureza descritiva e abordagem quantitativa, por meio da análise dos indicadores do Plano de Segurança do Paciente (PSP), buscando melhorar suas fragilidades e maximizar suas potencialidades para uma maior qualidade na assistência a saúde. Tendo como cenário do estudo uma Unidade de Clínica Médica (UCM) de um Hospital de Ensino Federal, um órgão suplementar à Universidade, e gerenciado desde 2013, pela Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares (EBSERH).

O Hospital conta com um Núcleo de Segurança do Paciente (NSP), constituído formalmente em Julho de 2014, seguindo as normatizações da Portaria/MS N°529, de 1º de Abril de 2013 que institui o Programa Nacional de Segurança do Paciente (PNSP), e de Resolução da Diretoria Colegiada-RDC N°36, de 25 de Julho de 2013 que institui ações para segurança do paciente em serviços de saúde, com o intuito de promover e apoiar a implementação das Metas de Segurança, a fim de reduzir, a um mínimo aceitável, o risco de dano desnecessário associado à atenção à saúde (PORTARIA N529/2013; RDC N36/2013).

Por este motivo, a UCM foi escolhida como local de estudo. A UCM está localizada na parte frontal do Hospital, no 11º andar, possui 13 enfermarias e 26 leitos.

Para coleta dos dados Foi utilizado um formulário previamente adaptado do Roteiro para diagnósticos das filiais EBSERH. De acordo com este roteiro, os parâmetros usados para auxiliar esta análise foram abordados em três grandes áreas: Cultura Organizacional; Funcionamento do Núcleo de Segurança do Paciente e Gestão de Riscos.

A coleta de dados ocorreu durante o mês de setembro de 2016 pela própria pesquisadora. A mesma foi conduzida por meio de visualização direta das condições apresentadas tanto na estrutura quanto nos processos de trabalho das equipes da Unidade de Clínica Médica do Hospital de Ensino. Utilizando o formulário, cada variável foram minuciosamente observadas e detalhadas de forma

descritiva, para que não houvesse precipitação na análise das mesmas, tendo em vista a segurança e efetividade da pesquisa. Os dados foram registrados em planilhas eletrônicas no programa Microsoft Excel, versão 2010, para formação de um banco de dados para serem tabulados, conforme a escala utilizada no roteiro de pesquisa: SIM (1), NÃO (2), EM PARTE (3).

Com base na *Joint Commission International* (JCI) foi estabelecido o Índice de Conformidade (IC) ideal  $\geq 80\%$  de conformidade para todos os indicadores descritos, ou seja, o percentual de adequação que reflete a segurança em relação à assistência prestada (JCI, 2008). O IC ideal ( $\geq 80\%$ ) foi balizado no Índice de Positividade (IP) proposto por Saupe e Horr (1982), que estabelece os seguintes parâmetros: 100% de positividade significam que para o quesito analisado houve 100% de acerto ou conformidade, o que corresponde a uma assistência desejável; de 99 a 90% assistência adequada; de 89 a 80% assistência segura; de 79 a 70% assistência limítrofe e menor que 70% assistência indesejada ou sofrível.

Esta pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética Institucional (CEP/CCS/UFPE) e aprovada conforme Parecer de N° 1.763.733.

## 2.RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Avaliação dos riscos inerentes aos processos de trabalho no setor de clínica médica

Foi realizado o mapeamento dos riscos inerentes aos processos de trabalhos de modo que possibilite a detecção, prevenção e atenuação de erros e Eventos Adversos (EA), porém está em processo de implantação. A Avaliação Preliminar dos Riscos (APR) assistenciais na unidade já foi construída e encaminhada para as chefias.

Desta forma na UCM erros podem ocorrer em função da não existência do mapa de risco, tornando assim o ambiente susceptível a falhas sabendo que sua prevenção está na capacidade do sistema evitar. Contudo, ressaltamos que erros são esperados mesmo nas organizações de excelência, pois errar é inerente ao ser humano e não é possível muda-lo, mas é possível mudar as condições em que os indivíduos trabalham, podendo assim mitigar os erros.

Referente ao uso de protocolos foi evidenciado que a UCM não está em consonância com o documento de referência para segurança do paciente, que destaca o uso de protocolos básicos estabelecidos pela Portaria MS/GM nº 529/2013. Isto pode ser justificado pelo fato de a UCM não possuir protocolos referentes à: registros completos nos prontuários do paciente e higienização das mãos; Estímulo à participação do paciente na assistência prestada; Orientações para comunicação no ambiente dos serviços de saúde.

Tais protocolos constituem instrumentos para construir uma prática assistencial segura e são componentes obrigatórios dos planos (locais) de segurança do paciente dos estabelecimentos de Saúde, a que se refere à RDC nº 36, de 25 de julho de 2013 da Anvisa.

Alguns protocolos em fase de apreciação pela gerencia, foram elaborados de acordo com o perfil da UCM e segue em avaliação para aprovação. Destacamos: a prevenção de úlcera por pressão; uso seguro de equipamentos e materiais; transferências de pacientes entre pontos de cuidado; e prevenção de quedas, este já esta com o POP ( Procedimentos Operacional Padrão), este esta como projeto piloto na UCM, mas com fragilidade, pois a unidade ainda oferece deficiências estruturais que comprometem a excelência deste POP.

Ressaltamos alguns protocolos em uso na UCM e com excelência como a prevenção de infecções hospitalares (IH); administração de sangue e hemocomponentes, é um dos mais antigos e tem um nível muito alto de controle. A identificação correta e inequívoca dos pacientes é um dos

protocolos com muito êxito, a UCM está sendo utilizando a tripla checagem dos pacientes/clientes: o prontuário, a pulseira e a placa de identificação no leito.

A Figura 1 traz uma visão sobre a existência de protocolos dentro da UCM, e observamos uma paridade nos valores entre SIM e NÃO de (35,75%). EM PARTE, ou seja, protocolos que estão em processo de avaliação e aprovação pela gerência hospitalar foi (28,57%), este valor nos remete a necessidade de serem analisados com urgência os protocolos já elaborados, tendo em vista uma melhoria na assistência a saúde, reduzindo assim os risco em potencial de EA e contribuindo para SP na UCM.

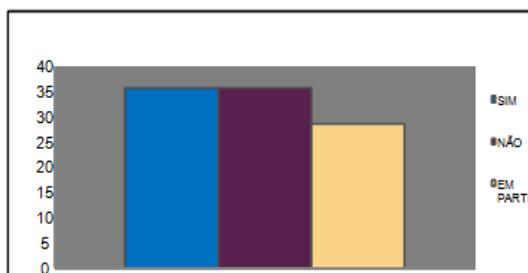


Figura 1- Existência de protocolos na Unidade de Clínica Médica.

Várias estratégias tem sido implementadas dentro da UCM, para mitigar os riscos inerentes aos processos e trabalho entre elas destacam-se a implementação das metas de segurança do paciente e campanhas educativas que abrangem toda unidade hospitalar, tendo forte adesão dos profissionais.

### 3.1.1 Quanto a Cultura Organizacional

A avaliação da cultura é essencial, porque são os hábitos (dos profissionais) que determinam as ações que se vai ter no serviço, tendo em vista que os hábitos dos profissionais dentro de uma esfera pública ainda são muito pautados em práticas antigas, muitas vezes com resistência a modificação, tornado-se essencial esta avaliação nas organizações de saúde.

Avaliar cultura de segurança possibilita identificar e gerir questões relevantes de segurança nas rotinas e condições de trabalho. Esta abordagem permite acessar informações dos funcionários a respeito de suas percepções e comportamentos relacionados à segurança, identificando pontos fracos e fortes de sua cultura de segurança e as áreas mais problemáticas para que se possa planejar e implementar intervenções (REIS, 2013).

Com base na observação direta da equipe do NSP na UCM e análise dos dados do formulário, observou-se que 60,97% obteve resposta SIM, como apresentado na Figura 2, mesmo com o percentual de positividade mais elevado que os demais, ainda não conseguiu atingir o IC preconizado pela JCI que é de  $\geq 80\%$  para se ter uma assistência segura, neste caso a assistência está indesejada ou sofrível pois teve um índice inferior a 70%.

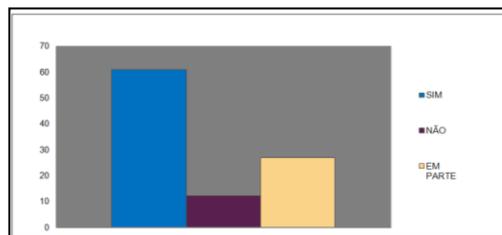


Figura 2- Quanto a Cultura Organizacional.

### 3.1.2 Quanto ao Funcionamento dos Núcleos de Segurança do Paciente

O Figura 3 apresenta os resultados referentes ao funcionamento do Núcleo de Segurança do Paciente na UCM, trazendo um percentual de 56,25% de conformidade. O padrão de conformidade instituído pela *JCI* para se ter uma assistência segura é de  $\geq 80\%$ , neste caso a UCM está com uma assistência indesejada ou sofrível pois teve um índice inferior a 70%. Este percentual leva a equipe da unidade a um estado de alerta para a gestão e qualidade, que implicam diretamente na SP, sendo necessário reavaliar as estratégias utilizadas quanto a SP.

O capítulo do formulário referente ao funcionamento do NSP inclui: o Plano de Segurança do Paciente; implementação dos protocolos de segurança; promoção de ambiente seguro; monitoramento de eventos adversos e incidentes; avaliação, análise e tratamento dos riscos.

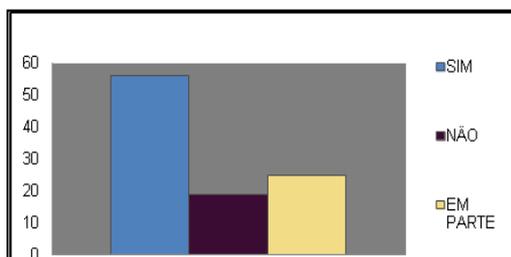


Figura 3- Quanto ao Funcionamento dos Núcleos de Segurança do Paciente

Para uma assistência segura faz-se necessário um planejamento no qual sejam definidas as estratégias que impliquem diretamente na qualidade da assistência. Devem ser levados em consideração à implementação de protocolos; os riscos assistenciais; as barreiras que impeçam a comunicação efetiva; a mitigação de EA e a mudança de cultura organizacional;

### 3.1.3 Os processos de gestão de riscos relacionados às tecnologias de Saúde

A Figura 4 traz o panorama referente aos processos de Gestão de Risco relacionados às Tecnologias em Saúde, enfatizando as ações e serviços desenvolvidos pelo NSP dentro da unidade hospitalar, apresentando um IC 60.0%, estando ainda com uma assistência indesejada ou sofrível.

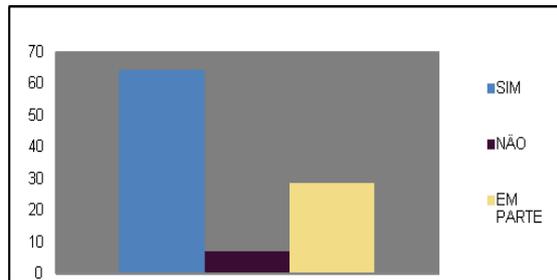


Figura 4- Quanto Os processos de gestão de riscos relacionados às tecnologias

Os processos de gestão de riscos relacionados às tecnologias estão alocados na CCIH, Gerência de Riscos, Gerência de Atenção a Saúde, Divisão de Enfermagem e Divisão Médica, executando as ações de tecnovigilância e farmacovigilância, sendo a engenharia clínica responsável por fazer de forma maneira preventiva e curativa e a equipe de enfermagem faz a checagem dos equipamentos , mas não existe documentos formalizados neste sentido.

Trabalha em parte, erros de medicação e reações adversas a medicamentos já estando em implementação na UCM a meta de número 3 (três) que é “melhorar a segurança na prescrição, no uso e na administração de medicamentos”, quaisquer intercorrências neste sentido a equipe farmacêutica entra em contato com gerência da UCM; o serviço de hemovigilância e reações transfusionais e demais incidentes, são serviços com um padrão de qualidade grande, tendo padrões de indicadores de acompanhamento destas ações.

O serviço tem a prerrogativa de solicitar a suspensão tanto do uso quanto da compra de marcas e fabricantes dos produtos-problema e já recolheu soro que estava com corpo estranho, já recolheu medicação que não tiveram um efeito anestésico.

#### 4. CONCLUSÃO

Melhorias na segurança do paciente são conseguidas com sucesso quando as instituições de saúde constituem e incorporam uma cultura de segurança. Cultura de segurança pode ser definida como um comportamento individual e organizacional, que busca continuamente estabelecer um compromisso com a segurança do paciente e a qualidade dos serviços prestados.

Observa-se a necessidade da implementação de medidas que assegurem a instituição de uma cultura voltada para a segurança do paciente, identificando erros, adequando processos e promovendo melhorias e incentivos, na busca pela qualidade da assistência à saúde.

Diante do exposto, o Hospital de Ensino, possui deficiências que dificultam o processo de trabalho e comprometem a integralidade, a segurança e a qualidade da assistência aos pacientes. Porém, esforços estão sendo empregados para reverter o quadro, garantindo assim uma assistência segura.

#### 5. REFERÊNCIAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Acreditação: a busca pela qualidade nos serviços de saúde*. Rev Saúde Pública, São Paulo, v.38, n. 2, p. 335-336, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rsp/v38n2/19800.pdf>. Acesso em: 11 nov. 2011.



DUARTE, Sabrina da Costa Machado *et al* . Eventos adversos e segurança na assistência de enfermagem. *Rev. Bras. Enferm.*, Brasília , v. 68, n. 1, p. 144-154, Feb. 2015 Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-71672015000100144&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-71672015000100144&lng=en&nrm=iso)>. acesso em 22 Maio 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/0034-7167.2015680120p>.

FRAGATA, J. Segurança dos doentes: uma abordagem prática. Lisboa: Lidel, 2011.

JCI. *Joint Commission International Accreditation Standards for Hospitals: Standards Lists Version*, Region Hovedstaden, 2011 Disponível em: [http://www.jointcommissioninternational.org/common/pdfs/jcia/IAS400\\_Standards\\_Lists\\_Only.pdf](http://www.jointcommissioninternational.org/common/pdfs/jcia/IAS400_Standards_Lists_Only.pdf).

Acesso em: 11 nov. 2011.

Portaria nº 529, de 1º de abril de 2013. Institui o Programa Nacional de Segurança do Paciente (PNSP). Diário Oficial da União, 2 abr 2013. 7. Brasil.

Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RESOLUÇÃO - RDC Nº 36, DE 25 DE JULHO DE 2013, *Institui ações para a segurança do paciente em serviços de saúde e dá outras providências.* Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0036\\_25\\_07\\_2013.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0036_25_07_2013.html)> acesso em 15 de outubro de 2016.

Reis CT. A cultura de segurança do paciente: validação de um instrumento de mensuração para o contexto hospitalar brasileiro [tese de doutorado]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca; 2013. 217 p.

## 6. AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos à UFPE- Universidade Federal de Pernambuco e ao CCS/UFPE- Centro de Ciências da Saúde, pela realização deste trabalho.

Não houve financiamento.



ÁREA DE SUBMISSÃO: GESTÃO, ECONOMIA E SAÚDE - GE 11

## IMPACTO DA LEI MARIA DA PENHA SOBRE OS ANOS POTENCIAIS DE VIDA PERDIDOS DAS MULHERES.

A. L.G. ALBUQUERQUE<sup>1</sup>, F E. C. V. FERNANDES<sup>2</sup> e A F CALDAS Jr<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Cirurgiã-Dentista, Mestrado em Gestão e Economia da Saúde – Universidade Federal de Pernambuco.

<sup>2</sup>Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco

<sup>3</sup>Professor Adjunto do Departamento de Clínica e Odontologia Preventiva da Universidade Federal de Pernambuco. Professor do Mestrado em Gestão e Economia da Saúde – Universidade Federal de Pernambuco

E-mail para contato: magalhaesanalucia@yahoo.com.br

*RESUMO – Esse artigo teve como objetivo analisar a tendência histórica temporal de mulheres vítimas de morte violenta na Região do Recife e Região Metropolitana e verificar o impacto que esses óbitos têm sobre o indicador Anos Potenciais de Vida Perdidos (APVP) da amostra, ocorridos no período entre 2000 a 2012. Foi realizado um estudo de série temporal para o período de 2000 a 2012, tendo como unidade de análise os municípios de abrangência do Instituto de Medicina Legal Antônio Persivo Cunha. As informações foram digitadas em planilha de Excel, para a formação de um Banco de Dados, sendo em seguida transferido ao programa Stata 12. Para a análise dos dados foram elaboradas tabelas com as distribuições de frequências dos óbitos por causa morte, média da idade, APVP1 (70 anos), e APVP2 (80 anos). Observou-se que, dos óbitos de mulheres registrados, os homicídios passaram de 52,93%, antes da Lei, para 41,84% depois da Lei Maria da Penha, representando uma redução dessa causa morte. A média da idade dessas mulheres ficou em 29,93 anos. Em relação ao APVP1 houve uma diminuição nos anos potencialmente perdidos de 41,61 anos, para 40,23 anos e o APVP2 a redução foi de 51,46 anos, para 49,49 anos, ambos depois da lei. A maioria das mulheres vítimas de homicídios, no período analisado, são adultas jovens, com uma diminuição dos APVP, tanto para a expectativa de vida aos 70, como aos 80, depois da Lei, indicando um ganho de vida produtiva.*

*Palavras-chave: APVP, Homicídios em mulheres, Violência.*



*ABSTRACT - This article aims to analyze the historical trend over time of women who are victims of violent death in the Region of Recife and the Metropolitan Region and to verify the impact these deaths have on the indicator Potential Years of Life Lost (PYLL) of the sample which occurred in the period between 2000 and 2012. There was a study of time series for the period 2000 to 2012, taking as the unit of analysis the municipalities of coverage of the Institute of Legal Medicine Antonio Persivo Cunha. The information were entered into an Excel spreadsheet for the formation of a Database and then transferred to the program in Stata 12. The data analysis was elaborated with a table for the distributions of frequencies of deaths by mean age, APVP1 (70 years), and APVP2 (80 years). It was noted that of the deaths of women registered after the Maria da Penha Law, 41.84% were homicides and the average age of the women whose cause of death was homicide was 29.93 years, after the law. In relation to the APVP1 there has been a decrease in the years potentially lost to 40.23 years and in relation to the APVP2 the reduction was 49.49 years. Most of the women homicide victims during the period analyzed are young adults with a decrease in the PYLL for both the life expectancy to 70 to 80. this indicates a gain of a productive life.*

*Keywords: PYLL, women Death, Violence.*

## 1. INTRODUÇÃO

A violência contra mulheres representa de um fenômeno complexo, com características próprias, requerendo ações interdisciplinares (Santos, 2011; Fonseca, 2012.). Segundo Acosta (2013), o conhecimento sobre sua dinâmica se faz necessário, pelo impacto que causa na perda da qualidade de vida tanto da vítima, como também dos seus familiares e da sociedade.

Essa forma de violência vem sendo amplamente estudada, principalmente em sua articulação com a saúde e se inclui no tipo de infração com pouca visibilidade social, pela dificuldade desses atos tornarem-se públicos, por apresentar certas especificidades das relações de gênero, tais como seu caráter privativo e íntimo entre a vítima e o agressor.

Além das consequências para a saúde física e mental dos indivíduos, a violência representa um custo econômico para a sociedade, pelos gastos com serviços de saúde, sociais, policiais e legais, além da perda de produtividade de suas vítimas, conforme relata Filipe (2013).

O impacto desse tipo de violência, segundo Brasil (2011), sobrecarrega o sistema de saúde seja em relação aos recursos econômicos e humanos, quanto em custos sociais, como consequência da produtividade perdida para a sociedade em geral.

A violência, na sua forma mais extrema, leva à mulher a morte. E quando ela ocorre em uma etapa potencialmente produtiva, irá afetar tanto o indivíduo e seus familiares, como também toda a sociedade, que será privada do seu potencial econômico e intelectual.



Com o objetivo de coibir e prevenir a violência doméstica e familiar, bem como punir os agressores, foi criada a Lei Maria da Penha (Brasil, 2006). A Lei sancionada em 07 de agosto de 2006, entrando em vigor no dia 22 de setembro do mesmo ano, é considerada um marco legal no combate à violência contra a mulher. Ela estabelece o novo conceito de violência doméstica e familiar, como qualquer ação ou omissão baseada no gênero que cause morte, lesão, sofrimento físico, sexual ou psicológico e dano moral ou patrimonial à mulher, passando a ser considerada uma violação aos direitos humanos (Cnj, 2013).

As mortes por causas externas estão intimamente relacionadas ao indicador Anos Potenciais de Vida Perdidos - APVP, que apresentam maiores riscos de acometer pessoas jovens, roubando-lhes, portanto, anos de vida potencialmente úteis (Taulil; Lima, 2010). De acordo com Gardner (1990), esse indicador tem por objetivo mensurar o impacto do óbito, nos anos em o indivíduo deixou de viver e que indiretamente causou uma perda na sua produção, pela morte prematura.

Considerando a importância das estatísticas de mortalidade para nortear a tomada de decisões na área da saúde, foram analisados os APVP em mulheres vítimas de homicídios na Região Metropolitana do Recife/PE no período de 2000 a 2012. A estimativa do APVP também pode servir na elaboração de políticas públicas de prevenção e controle da violência contra a mulher.

Esse artigo teve como objetivo analisar a tendência histórica temporal de mulheres vítimas de morte violenta no Recife e Região Metropolitana e verificar o impacto que esses óbitos causam sobre o indicador APVP da amostra, ocorridos no período entre 2000 a 2012.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

Foi realizado um estudo de série temporal para o período de 2000 a 2012, tendo como unidade de análise os municípios de abrangência do Instituto de Medicina Legal Antônio Persivo Cunha (IMLAPC). O material de estudo constituiu a totalidade dos óbitos por causas não naturais ou externas, como os suicídios, acidentes e homicídios com intencionalidade registrada (homicídio doloso) ocorridos no período compreendido entre 2000 e 2012, cujas necropsias tenham sido feitas na sede do IMLAPC. A área estudada foram os municípios que encaminharam os corpos ao IMLAPC, na cidade de Recife, localizada na região Nordeste do Brasil, com uma população estimada pelo censo do ano de 2010 em 8.796.448 habitantes (IBGE,2010).

As informações foram digitadas em planilha de Excel, para a formação de um Banco de Dados, sendo em seguida transferido ao programa Stata 12. Para a análise dos dados foi elaborada uma tabela com as distribuições de frequências dos óbitos por média da idade, APVP1 (70 anos), e APVP2 (80 anos).

Foram incluídos todos os laudos necroscópicos, de mulheres vítimas de morte por causa externas, do IMLAPC, no período de 2000 a 2012. Foram excluídos os laudos com subnotificação.

Homicídio	2000 a 2012	Antes da Lei	Depois da Lei	P-valor*
-----------	-------------	--------------	---------------	----------

### Anos Potenciais de Vida Perdidos

O APVP indica o número de anos que teoricamente uma determinada população deixa de viver se morrer prematuramente. Existem diversas maneiras de calcular o indicador APVP, sendo que a escolha de cada método deverá ser adequada ao objetivo do estudo. As divergências entre esses métodos dizem respeito à definição das idades nas quais as perdas sociais e econômicas têm seu início e fim (Gardner; Sanborn, 1990).

Trata-se de um método de fácil entendimento, permitindo o seu uso de forma sistemática no planejamento em saúde, cuja técnica aplicada foi a proposta por Romeder; Mcwhinnie (1977).

A fórmula para o cálculo de APVP é expressa por:

$$APVP = \sum_{i=1}^k a_i \cdot d_i$$

k = número de faixa etária

$a_i$  = número de anos de vida restantes correspondente à enésima faixa etária. Por definição,  $a_i$  é a diferença, entre idade limite em anos e o ponto médio da enésima faixa etária.

$d_i$  = número de mortes.

- Realizou-se a distribuição dos óbitos por faixa etária;
- Os limites superiores de idade foram 70 anos e 80 nos.
- O limite inferior de idade foi de 1 ano.

A verificação da diferença de média foi realizada pelo teste t de Student ao nível de significância de 5% e intervalo de confiança de 95%.

Foi garantida a confidencialidade das fontes de informação, sem identificação de qualquer sujeito participante no estudo, de qualquer profissional ou instituição de saúde envolvida. Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos da UFPE e foi aprovado (CAAE: 0012.0.097.000-10).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando a evolução dos óbitos por causas externas no período de 2000 a 2012, observa-se uma pequena queda do número de homicídios, em 2007, provavelmente pela insuficiência das Políticas Públicas direcionadas ao combate da violência feminina, logo após a promulgação da Lei Maria da Penha, conforme descrito por Andrade (2012). A partir de 2009, observa-se uma tendência à queda, com variações mais significativas até o final do período, podendo representar um reflexo do compromisso público no enfrentamento da violência contra as mulheres, quando foi instituída a Política Nacional de Enfrentamento à Violência Contra as Mulheres (Waiselfisz, 2012), implantada em alguns estados, inclusive Pernambuco. Os acidentes começam a superar os homicídios em 2008, mantendo essa tendência até 2012. Os suicídios apresentaram crescimento especialmente após 2006, conforme mostra a Figura 1.

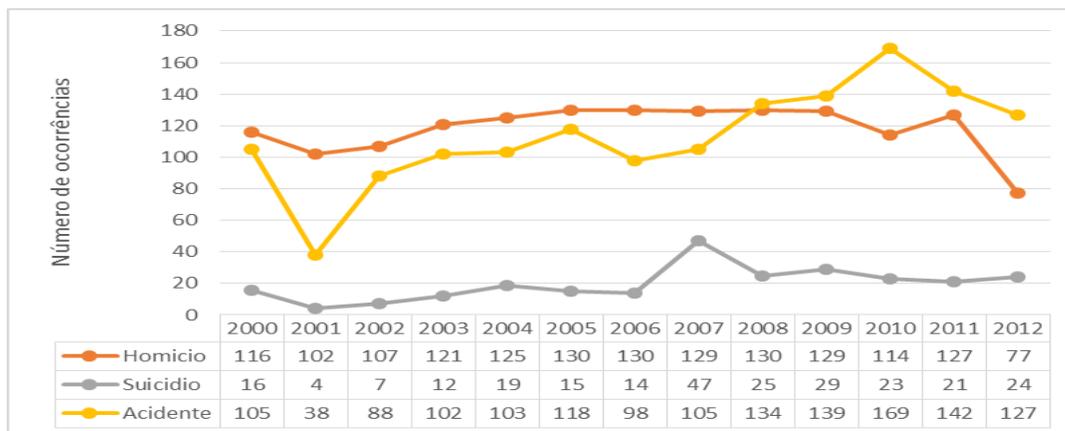


Figura 1- Evolução dos óbitos por causas externas, no período de 2000 a 2012. Recife, 2016.

A média da idade das mulheres cuja causa do óbito foi homicídio, ficou em 29,93 anos (IC 95% 29,24 – 30,61), quando analisado o período de 2000 a 2012. Observou-se, também, um aumento na média da idade das mulheres vítimas de homicídio. Antes da Lei a média foi de 29,09 anos (IC 95% 28,19 – 30,00) passando para 30,91 anos (IC95% 29,88 – 31,95;  $p = 0,0000$ ) após a Lei (Tabela 1). Quanto à idade, a literatura aponta que mulheres jovens tendem a sofrer mais violência do companheiro (Gadoni-Costa, 2010; Labronici *et al.*, 2010; Andrade, 2012). Segundo Rabello (2007) e Moura (2012), isso mostra que, provavelmente, a agressão às mulheres no âmbito familiar está relacionada à vida sexual ativa e produtiva.

Em relação ao APVP, com uma expectativa de vida aos 70 anos, a média para todo o período, ficou em 40,98 anos (IC95% 40,38 – 41,59). Contudo, observou-se uma diminuição nos anos potencialmente perdidos, passando de uma média de idade de 41,61 anos (IC95% 40,80 – 42,43) antes da lei, para 40,23 anos (IC95% 39,33 – 41,13;  $p = 0,0256$ ) depois da Lei, em relação às vítimas de homicídios. Quando verificado para os APVP levando em consideração uma expectativa de vida aos 80 anos, a média para todo o período foi de 50,55 anos (IC95% 49,91 – 51,19), com uma redução de 51,46 anos (IC 95% 50,62 – 52,29) antes da Lei, para 49,49 anos (IC 95% 48,51 – 50,47;  $p = 0,0026$ ) depois da Lei, conforme tabela 1. Analisando os APVP, foi observada uma diminuição APVP1 e APVP2, contribuindo para um ganho social e econômico.

Tabela 1. Distribuição da média da idade, APVP1 e APVP2, dos homicídios em todo período, antes e depois da Lei Maria da Penha. Recife, 2016.

Homicídio	2000 a 2012			Antes da Lei			Depois da Lei			p-valor*
	Média	EP	IC 95%	Média	EP	IC 95%	Média	EP	IC 95%	

<b>Idade</b>	29,93	0,35	29,24	30,61	29,09	0,46	28,19	30,00	30,91	0,53	29,88	31,95	0,0000
<b>APVP (70 anos)</b>	40,98	0,31	40,38	41,59	41,61	0,42	40,80	42,43	40,23	0,46	39,33	41,13	0,0256
<b>APVP (80 anos)</b>	50,55	0,33	49,91	51,19	51,46	0,42	50,62	52,29	49,49	0,50	48,51	50,47	0,0026

No período de 2000 a 2012 os homicídios de mulheres no município do Recife e Região Metropolitana responderam por 1.537 (47,13%) das necropsias registradas no IMLAPC, superando os acidentes que ficou com 1.468 (45,02%), de um total de 3.261 óbitos. Os dados encontrados apontam uma redução nos homicídios, passando de 831 (52,93%) dos óbitos, para 706 (41,75%) depois da lei, confirmando análise de outros estudos que colocam o Estado de Pernambuco e sua capital como unidades da Federação que tiveram diminuição nas taxas de homicídios femininos (Waiselfisz, 2015). Os acidentes depois da Lei representam 816 (48,26%) dos óbitos (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição de frequência e percentual da causa do óbito, por causa morte no período de 2000 a 2012, antes e depois da implantação da Lei Maria da Penha. Recife, 2016.

Causa da morte		2000 a 2012	Antes da Lei	Depois da lei
Homicídio	N	1.537	831	706
	% linha	100	100	100
	% coluna	47,13	52,93	41,75
Suicídio	N	256	87	169
	% linha	100	100	100
	% coluna	7,85	5,54	9,99
Acidente	N	1.468	652	816
	% linha	100	100	100
	% coluna	45,02	41,53	48,26
Total	N	3.261	1.570	1.691
	% linha	100	100	100
	% coluna	100	100	100
Valor de p		$\chi^2= 14,5021$ $p = 0,001$	$\chi^2= 12,8418$ $p = 0,002$	$\chi^2= 4,7237$ $p = 0,094$

Os resultados dos óbitos de mulheres por causas externas no Recife e Região Metropolitana, mostraram uma tendência da redução de homicídios depois da Lei Maria da Penha, sendo a maioria delas adultas jovens, ou seja, estão em idade reprodutiva, com uma diminuição dos APVP, tanto para a expectativa de vida aos 70, como aos 80, indica um ganho de vida produtiva.

## 5. REFERÊNCIAS



- ACOSTA, D F; GOMES, V L O; BARLEM, E L D. *Perfil das ocorrências policiais de violência contra a mulher*. Acta Paulista de Enfermagem., São Paulo , v. 26, n. 6, p. 547-553, 2013 . Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-21002013000600007&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-21002013000600007&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 10 Jun. 2015.
- ANDRADE, S S C A et al . *Perfil das vítimas de violências e acidentes atendidas em serviços de urgência e emergência selecionados em capitais brasileiras: Vigilância de Violências e Acidentes*, 2009. Epidemiologia e Serviços de Saúde, Brasília, v. 21, n. 1, mar. 2012. Disponível em: <[http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1679-49742012000100003&lng=pt&nrm=iso](http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742012000100003&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em: 05 Ago. 2015. <http://dx.doi.org/10.5123/S1679-49742012000100003>.
- BRASIL. Lei N. 11.340, de 07 de agosto de 2006. Dispõe sobre a violência doméstica e familiar contra a mulher [online]. 2006. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2004-2006/2006/lei/111340.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2006/lei/111340.htm). Acesso em: 10 Jun. 2015.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Prevenção e tratamento dos agravos resultantes da violência sexual contra mulheres e adolescentes: norma técnica. 3 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.
- CONSELHO NACIONAL DE JUSTIÇA. *Violência contra a Mulher (Lei Maria da Penha)*. 2013. Sobre a Lei Maria da Penha. Disponível em: <http://www.cnj.jus.br/programas-e-acoess/lei-maria-da-penha/sobre-a-lei-maria-da-penha>. Acesso em: 01 Jun. 2015
- FILIPPE, S A. *Modelos percebidos de causalidade da violência entre parceiros íntimos*. Universidade de Lisboa-Faculdade de Psicologia. Mestrado Integrado em Psicologia 2013. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10451/10440> Acesso em: 20 Ago. 2015.
- FONSECA, D H; RIBEIRO, C G; LEAL, N S B. *Violência doméstica contra a mulher: realidades e representações sociais*. Psicologia e Sociedade, Belo Horizonte , v. 24, n. 2, p. 307-314, 2012 .Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S010271822012000200008&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010271822012000200008&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 10 Jun. 2015.
- GADONI-COSTA, L. *Violência doméstica: Vitimização e enfrentamento*. Dissertação de Mestrado em Psicologia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2010.
- GARDNER, J W, JILL S. SANBORN. "Years of Potential Life Lost (YPLL)-What Does it Measure?" Epidemiology 1.4 (1990): 322-329.1990.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Sinopse do Senso Demográfico de 2010. Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/estimativa2011>. Acesso em: 20 Ago 2015.
- LABRONICI, L.M., FERRAZ, M.I.R., TRIGUEIRO, T.H. & FEGADÓLI, D. *Perfil da violência contra mulheres atendidas na Pousada de Maria*. Revista Escola de Enfermagem USP, 44(1), 126-33, 2010.
- LIMA, J S T. *Estratégias de enfrentamento em mulheres que sofrem violência por seus parceiros*. 2013. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Saúde e Ambiente). Universidade Tiradentes. Aracaju, Sergipe.
- MOURA, M A V; NETTO, L A; SOUZA, M H N. *Perfil sociodemográfico de mulheres em situação de violência assistidas nas delegacias especializadas*. Esc. Anna Nery, Rio de Janeiro, v. 16, n. 3, p. 435-442, Sept. 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo>.



- php?script=sci\_arttext&pid=S1414-81452012000300002&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 11 Ago. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S1414-81452012000300002>.
- RABELLO, P M, CALDAS JR, A F. "*Violência contra a mulher, coesão familiar e drogas.*" Rev. Saúde Pública 41.6 (2007): 970-8.
- RABELLO, P M, CALDAS JR, A F. "*Lesões faciais de mulheres agredidas fisicamente. Paraíba-Brasil.*" Odontologia Clínico-Científica 5.4 (2007): 321-325.
- ROMEDER, J. M., MCWHINNIE, J. R. "*Potential years of life lost between ages 1 and 70: an indicator of premature mortality for health planning*". International journal of epidemiology 6.2 (1977): 143-151.
- SANTOS, A C W; MORE, C L O. *Impacto da violência no sistema familiar de mulheres vítimas de agressão.* Psicologia, Ciência e Profissão., Brasília , v. 31, n. 2, p. 220-235, 2011 .Disponível em:[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S141498932011000200003&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S141498932011000200003&lng=en&nrm=iso). Acesso em 03 Jun 2015.
- WASELFISZ JJ. Mapa da Violência 2012. Atualização: *Homicídios de Mulheres no Brasil*. São Paulo, Instituto Sangari. Disponível em:[http://www.mapadaviolencia.org.br/mapa2012\\_mulheres.php](http://www.mapadaviolencia.org.br/mapa2012_mulheres.php). Acesso em 15 Jun. 2015.
- TAUIL, P. L.; LIMA, D. D. *Aspectos éticos da mortalidade no Brasil*. Disponível em: <http://www.cfm.org.br/revista/bio2v4/aspecto.html> acesso em 05. nov. 2015.



ÁREA DE SUBMISSÃO: GESTÃO, ECONOMIA E SAÚDE - GE 12

## SUSTENTABILIDADE NAS COMPRAS PÚBLICAS: UM ESTUDO DE CASO NUMA UNIDADE HOSPITALAR DO ESTADO DE PERNAMBUCO

A. P. M. da ROCHA<sup>1</sup>, F. de S. RAMOS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Sociais Aplicadas, Departamento de Economia

ap\_mrocha@hotmail.com

*RESUMO - Através de estudo de caso, avaliou-se em que medida critérios de sustentabilidade ambiental vêm sendo implementados nos processos licitatórios de uma unidade hospitalar de Pernambuco, bem como analisados os fatores que facilitam e dificultam essa prática. Além da pesquisa bibliográfica e da legislação pertinente ao tema, foi desenvolvida pesquisa exploratória com coleta de dados por meio de entrevistas realizadas com os profissionais da unidade hospitalar que atuavam diretamente nos processos licitatórios. Através de pesquisa documental, foram levantados processos licitatórios concluídos do período de 2011 a 2013 com o propósito de identificar critérios de sustentabilidade em sua estrutura. Os resultados mostraram pouco conhecimento sobre desenvolvimento sustentável, licitações sustentáveis e legislação correlata. Os resultados obtidos permitiram concluir que as compras sustentáveis do hospital estudado se resumem a ações pontuais e sem planejamento institucional, muito mais por características individuais dos servidores envolvidos no processo do que por propósitos institucionais estabelecidos.*

*Palavras-chave: Licitações sustentáveis. Administração Pública. Saúde.*

*ABSTRACT - Through a case study it was assessed to what extent environmental sustainability criteria has been implemented in the bidding processes of a hospital unit of Pernambuco, and analyzed the factors that facilitate and hinder this practice. Besides the literature and pertinent legislation, an exploratory research was developed with data collection through interviews with professionals from the hospital who worked directly in the bidding process. Through a documentary research bidding processes completed in 2011 to 2013 for the purpose of identifying been raised sustainability criteria in its structure. The results showed little knowledge about sustainable development, sustainable procurement and related legislation. The results showed that the sustainable procurement of the hospital comes down to specific actions and without institutional planning, much more by individual characteristics of the servers involved in the process than by established institutional purposes.*

*Keywords: Sustainable bids. Public Administration. Health.*



## 1. INTRODUÇÃO

A introdução de critérios de sustentabilidade ambiental nas contratações públicas representa uma nova forma de agir do Estado, que responde a um anseio social de viver com menor impacto no meio ambiente (Bliacheris, 2013, p.137). Tudo começou nas últimas décadas quando o Brasil e o mundo observaram desastres ambientais provocados pelos efeitos nocivos do homem ao meio ambiente. Diante dessa problemática e das discussões ocorridas na primeira Conferência das Nações Unidas, de 1972, em Estocolmo, que a Comissão Mundial sobre o Meio Ambiente e Desenvolvimento (CMMAD), criada em 1983 pelas Nações Unidas, elaborou o Relatório Brundtland (O Nosso Futuro Comum), no qual a expressão desenvolvimento sustentável foi disseminada e alertou o mundo para a necessidade urgente de alterar o desenvolvimento econômico em direção à sustentabilidade, com um menor impacto nos recursos naturais e no meio ambiente (Câmara, 2009). O relatório trouxe a proposta de um desenvolvimento equilibrado, no qual a exploração dos recursos naturais se desse de forma que pudesse perdurar para as gerações futuras e atender às necessidades do presente. Assim, o desenvolvimento sustentável consiste em colocar lado a lado as atividades produtivas, a utilização racional dos recursos naturais e atuação junto à sociedade, gerando, portanto, a necessidade de as organizações elaborarem estratégias com o propósito de atingir esse objetivo. Essa proposta do desenvolvimento sustentável foi ganhando força e, na segunda Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e Desenvolvimento, realizada em 1992, no Rio de Janeiro, foi gerado o documento chamado Agenda 21 (Cúpula da Terra), considerado o marco definitivo para o conceito de desenvolvimento sustentável nas políticas governamentais (Câmara, 2009). Ocorre que foi com o capítulo 4º da Agenda 21 Global que se destacou a importância do papel desempenhado pelos governos como consumidores, como ocupantes de posição dominante na economia e com o poder de exercer importante papel indutor sobre as decisões empresariais e as opiniões da população (Alencastro *et al.*, 2014, p. 213). Esmiuçou-se o cerne das licitações sustentáveis: a mudança dos padrões de consumo, propondo as compras públicas sustentáveis como política pública visando a influenciar o empresariado e a sociedade como um todo (Bliacheris, 2013, p. 139).

Para Carvalho Filho (2008, p. 217), a “licitação é um procedimento administrativo vinculado” (aquele em que o agente público está vinculado ao que determina a lei) por meio do qual a Administração Pública convoca, estabelecendo condições em edital, empresas interessadas na apresentação de propostas para o oferecimento de bens e serviços que almeja adquirir. As licitações sustentáveis são aquelas que dão preferência à aquisição de produtos que, no seu ciclo de vida (produção, consumo e descarte), gerem menos impacto ao meio ambiente, por exemplo, gasto de menos água ou energia na produção; se o produto possui em sua composição material menos poluente, etc. (Ferreira, 2012a, p.31-32).

A Lei n.º 12.349, de 15/12/2010, alterou a redação do caput do art. 3º, da Lei n.º 8.666/93 (chamada Lei Geral de Licitações e Contratos) e acrescentou mais uma finalidade da licitação: o desenvolvimento nacional sustentável (Brasil, 2010), que deve ser buscado junto com o princípio da isonomia e a seleção da proposta mais vantajosa para a administração. Agora, com a promoção do desenvolvimento nacional sustentável explícito como finalidade a ser atendida nos processos licitatórios, surge a seguinte pergunta: a Administração Pública vem implementando critérios de sustentabilidade ambiental em seus processos licitatórios de forma a atender à finalidade de promover o desenvolvimento nacional sustentável?

Sob a perspectiva da licitação sustentável, as aquisições de qualquer instituição pública, dentre elas as aquisições de uma instituição pública de saúde (equipamentos, insumos,

serviços, etc.) devem exigir em seus editais licitatórios critérios mínimos ambientais (por exemplo, que o licitante gaste menos água ou energia em sua produção) e, dessa forma, utilizar seu poder de compra como instrumento de promoção do mercado interno em saúde. Assim, a possibilidade de demandas de bens e serviços do setor público, associado à multiplicação do nível de atividade, geração de emprego e renda, efeito na arrecadação de tributos e o desenvolvimento e inovação tecnológica realizados no país, acabam por promover o desenvolvimento nacional sustentável (Bliacheris, 2013, p. 142). Ainda, torna-se imprescindível a Administração Pública adequar-se à nova sistemática, exigindo-se também dos órgãos de consultoria e controle um posicionamento, uma vez que possuem papel relevante na condução e orientação das compras públicas, contribuindo para a consolidação desse processo.

Pensando assim, um hospital público foi escolhido como forma de perceber o comportamento de uma instituição desse tipo em relação à sustentabilidade em suas aquisições de bens e serviços. Como objetivo geral buscou-se avaliar em que medida os critérios de sustentabilidade ambiental vêm sendo implementados nos processos licitatórios da unidade de saúde em estudo, analisando os fatores que facilitam ou dificultam essa prática. Especificamente, procurou-se identificar o nível de conhecimento do gestor, dos setores requisitantes de bens e serviços e dos servidores da área de Compras, Licitações e Contratos da unidade de saúde quanto as práticas de sustentabilidade nas aquisições públicas, através de entrevistas e pesquisa documental (editais licitatórios), bem como verificar de que forma os departamentos de consultoria jurídica e controle estão subsidiando as práticas de sustentabilidade nas aquisições, através de entrevistas. Em razão do potencial poder de compra que essas unidades de saúde possuem, seja de produtos e serviços comuns ou de “produtos industriais em saúde” (Viana; Elias, 2007, p. 1771), quando se pensa em licitações sustentáveis de produtos e serviços de saúde, além dos benefícios oferecidos para a saúde humana por meio da lógica da preservação do meio ambiente, podem-se associar tais benefícios à força gerada pelo Complexo Industrial da Saúde nos desenvolvimentos econômico e social nacional.

A relevância do tema advém do impacto financeiro que as compras públicas acarretam, estimado em torno de 20% do Produto Interno Bruto (PIB), de acordo com o IBGE (Brasil, 2013) e no poder de mercado que o Governo tem, podendo contribuir de forma eficiente na melhora do meio ambiente, para a saúde humana e para o desenvolvimento nacional, trazendo a necessidade de ampliar as discussões e investigações de como se vem dando a execução das licitações nesse contexto. O PIB registra a participação do complexo industrial da saúde no percentual de 5%, sendo que 30% da renda gerada ficam com a iniciativa pública (Viana; Elias, 2007; Brasil, 2011), demonstrando a importância desse setor.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia do trabalho caracteriza-se como qualitativa. Para possibilitar o alcance dos objetivos estabelecidos, além da pesquisa bibliográfica e da legislação pertinente ao tema (Marconi; Lakatos, 2002), foi desenvolvida uma pesquisa exploratória, com coleta de dados por meio de entrevista estruturada (Marconi; Lakatos, 2002) dos profissionais da unidade hospitalar em estudo que atuavam diretamente no processo licitatório e que aceitaram participar da pesquisa. O local estudado não foi identificado para evitar constrangimentos aos entrevistados. Ainda, através de uma pesquisa documental (Marconi; Lakatos, 2002) na unidade estudada, foi levantada a quantidade de processos licitatórios concluídos da unidade

hospitalar no período de 2011 a 2013, separados por objeto e extraídos do sistema Rede Compras (Pernambuco. S.A.), através de consulta ao site, uma amostra de editais e termos de referência correspondentes a contratos de fornecimento de equipamentos gerais e eletrodomésticos e de prestação de serviços com fornecimento de equipamentos, de forma a buscar identificar critérios de sustentabilidade/socioambientais em sua estrutura (na especificação técnica do objeto, nos requisitos de habilitação e nas obrigações impostas à contratada) e cotejar com os resultados obtidos nas entrevistas, tomando-se como referência a legislação estadual no que diz respeito à conservação e eficiência de energia e o Guia Prático de Compras Públicas Sustentáveis AGU – 3ª edição (Csipai, 2013), especialmente no tocante a aparelhos elétricos em geral e aparelhos eletrodomésticos. O período foi escolhido em razão da data da publicação da Lei n.º 12.349 de 16/12/2010 até o ano de 2013.

2.1 Participantes: quatro requisitantes; todos os quatro funcionários do setor de Compras e Contratos, dois servidores e dois terceirizados; os dois servidores do setor de Licitações e o único Assessor Jurídico, que trabalha na sala do setor de Licitações, totalizando onze participantes, dentre eles três homens e oito mulheres.

2.2 Procedimentos: 2.2.1 Entrevistas: a coleta de dados foi realizada no primeiro semestre de 2014 por meio da aplicação de roteiro específico para os requisitantes e setores de Compras, Licitações e Contratos como para o Assessor Jurídico, contendo as seguintes partes: a) caracterização do participante (sexo, grau de escolaridade, nível do cargo que ocupa, quanto tempo na instituição e quanto tempo na função); b) do conhecimento quanto às práticas de sustentabilidade nas aquisições públicas; c) aplicabilidade das práticas de sustentabilidade nas aquisições públicas; d) fatores que facilitam; e) fatores que dificultam; e) do subsídio do setor jurídico e de controle quanto às práticas de sustentabilidade nas aquisições públicas. Os relatos transcritos ao longo desse estudo, para evitar identificação do participante, seguirá a numeração de P1 a P11. 2.2.2 Editais: No hospital estudado, no período de 2011 a 2013, foram totalizados 158 processos licitatórios, considerando todas as modalidades, inclusive as dispensas e inexigibilidades de licitação, que, apesar de exceção à licitação, também se desenvolvem através de um procedimento e exigem condições contratuais. Corresponderam ao valor total de R\$ 23.727.103,45 (vinte e três milhões setecentos e vinte e sete mil cento e três reais e quarenta e cinco centavos). Foram escolhidos editais em que, possivelmente, poderiam ter inseridos bens ou serviços socioambientais na especificação técnica do objeto, nos requisitos de habilitação ou nas obrigações impostas à contratada, ou seja: aquisição de equipamentos gerais e eletrodomésticos e prestação de serviços. Escolhidos cinco editais e três termos de referência, com valor total de R\$ 5.032.641,43 (cinco milhões trinta e dois mil seiscentos e quarenta e um reais e quarenta e três centavos), que representa uma amostra acima de 20% do valor licitado entre 2011 e 2013.

### 3. RESULTADOS

3.1 Entrevistas: inicialmente, quanto às características dos participantes, pode-se destacar que seis dos onze participantes são pós-graduados e ocupantes de cargo de nível superior, que nove entre os onze estão a mais de dez anos na instituição, mas do total de onze participantes os que estão na função há menos de um ano ou entre um e três anos concentram-se nos setores de compras (Dois – há menos de um ano e um – entre um e três anos), licitações (um – há menos de um ano) e contratos (um – há menos de um ano). As compras sustentáveis exigem a observância da proposta que atribui mais vantagem para a administração. Para tanto, devem associar a ótica econômica e a proteção ambiental, sem



deixar de respeitar o princípio da isonomia para todos os participantes. Diante da complexidade que envolve as compras sustentáveis, o primeiro questionamento que se faz é se os servidores envolvidos no processo de compras estão preparados para absorver essa política e todas as suas exigências. As observações realizadas e as respostas coletadas dos participantes, apesar do pequeno número, revelaram pouco conhecimento sobre desenvolvimento sustentável, licitações sustentáveis e legislação correlata, assim como o pouco conhecimento sobre critérios de sustentabilidade ambiental na escolha e especificação técnica do objeto. Entre aspas constam trechos recolhidos nas entrevistas, na ocasião em que o participante desejou detalhar mais sobre itens constantes do roteiro: “a escolha e especificação técnica de bens e serviços com critérios de sustentabilidade não é utilizado como uma regra, quando ocorre é em condição pontual” [P9]; “as especificações são feitas pelos requisitantes através do que está cadastrado no e-fisco, só que o sistema não distingue as especificações sustentáveis” [P9]; “o e-fisco não separa por bens e serviços sustentáveis, a lista é geral” [P3]. Observada a existência de algumas práticas sustentáveis nos processos licitatórios e que foi reforçada com os seguintes trechos: “quando vou cotar busco produtos com menor preço, mas que consumam menos energia e também são mais duráveis” [P7]; “aquisição de ar-condicionado e refrigeradores com selo Procel” [P2]; “as vezes não é exigido no edital critérios sustentáveis, mas a empresa já oferece materiais que são recicláveis” [P9]. Ao mesmo tempo, levantado o pouco acompanhamento em relação a resultados e impactos obtidos por meio de alguma prática de sustentabilidade adotada nas licitações, corroborando o seguinte trecho: “Existe uma pessoa da manutenção que fica responsável por observar o consumo de água e energia” [P7]. Quanto aos fatores que facilitam a implementação das práticas de sustentabilidade nas licitações, destacou-se aos seguintes trechos: “Importante o Estado fazer o monitoramento voltado para a sustentabilidade. Criação de incentivos para a instituição que faz licitação sustentável” [P2]; “Importante a questão ambiental ensinada nas escolas de forma mais reforçada” [P3]; “as pessoas que participam do processo licitatório, especialmente os requisitantes, ajudam quando tem formação adequada no universo da atividade hospitalar” [P3]. Para os fatores que dificultam, reforçou-se com os trechos: “A ausência de conhecimento dificulta muito a implantação das práticas sustentáveis” [P2]; “Muito importante produtos que apresentem sustentabilidade sejam ofertados ao consumo/comércio em menor custo, otimizando a aquisição dos mesmos e maior adesão à causa da compra sustentável” [P4]; “os produtos que preservam o paciente, o enfermeiro e o médico são mais caros e para a lei que disciplina o processo de licitação o menor preço é o mais importante” [P1]; “no processo licitatório o que prevalece é o menor preço” [P8]; “se for preciso fazer uma especificação com critérios de sustentabilidade que não conste no e-fisco tem que solicitar autorização para o sistema, se acatada, a especificação é cadastrada junto as já existentes na lista. Isso dá trabalho e normalmente ninguém faz. O hospital nunca fez.” [P9]; “no hospital, se existem processos licitatórios com critérios sustentáveis, eles ocorreram por acaso, pois, na prática, não há planejamento nesse sentido” [P9]; “o preço é muito relevante e o requisitante, quando vai especificar produtos que são sustentáveis, tem que justificar e, se no e-fisco houver o produto que atenda e que seja mais barato e não sustentável, ele tem medo de se responsabilizar, assim é mais fácil pedir o produto mais barato da lista do e-fisco” [P5]; “o menor preço é critério que prevalece” [P7]; “o mercado tem que oferecer o produto sustentável” [P7]; “não tem preparo técnico, nem capacitação” [P2]; “nem sempre tenho conhecimento técnico” [P3]; “as auditorias e procuradoria jurídica não ajudam na questão da sustentabilidade” [P1]. No que diz respeito ao setor jurídico e órgãos de controle, auxiliam pouco com ações além da verificação legal, como elaboração de

cartilhas, manuais, treinamentos que contribuam para uma melhor implementação de critérios de sustentabilidade nas licitações da instituição, detalhado além do roteiro pelos seguintes trechos: “alerto sempre para o cumprimento do disposto na legislação. Os critérios de sustentabilidade vêm atrelados às exigências legais obrigatórias” [P11]; “o parecer é opinativo” [P11]; “espero ser demandado” [P11]; “quando tento inovar e orientar para a aquisição de produtos/bens de melhor qualidade, mesmo com as justificativas, sou chamado à atenção porque a cultura de aquisições é a política do menor preço” [P11].

3.2 Editais: da análise dos editais selecionados foi possível perceber a existência de alguns critérios ambientais, especialmente quanto à exigência de produto desenvolvido e concedido pelo Programa Nacional de Conservação e Energia Elétrica (PROCEL), nas aquisições de equipamentos, bem como em prestações de serviço. O Selo PROCEL tem por objetivo orientar o consumidor no ato da compra, indicando os produtos que apresentam os melhores níveis de eficiência energética dentro da categoria. Normalmente, os produtos contemplados com esse selo são caracterizados na faixa “A” da Etiqueta Nacional de Consumo de Energia (ENCE), conforme mencionado no guia de compras públicas sustentáveis para a administração federal (Brasil. M.P.O.G., p. 43).

#### 4. DISCUSSÃO

Com base no resultado das entrevistas, foi observado que os servidores envolvidos nos processos licitatórios não têm pleno conhecimento do que seja uma licitação sustentável e quais os propósitos de sua utilização, das principais legislações estaduais que tratam da área ambiental, nem o que são critérios de sustentabilidade ambiental na escolha e especificação técnica do objeto, e, por disposição legal, relacionam as especificações constantes nos termos de referência e editais com base nos itens constantes no cadastro de materiais e serviços do Sistema E-Fisco. Em seu estudo, Santos e Barki (2013, p. 264) “consideram que, em grande parte das vezes, os órgãos da Administração não possuem, em seus quadros profissionais, servidores com preparo e conhecimento especializado na área ambiental”. Ademais, no hospital pesquisado, foi observado que mais da metade dos participantes (seis deles) são recentes na função, com menos treino/experiência, sendo quatro com menos de um ano (um requisitante, dois de compras e um de contratos) e dois entre um a três anos na função (de licitação e de compras). Apesar do pouco conhecimento sobre critérios de sustentabilidade e da prevalência da aquisição de bem ou serviço com menor preço: “no processo licitatório o que prevalece é o menor preço” [P8], foi percebida a existência da inclusão de alguns critérios de sustentabilidade nos processos licitatórios, especialmente quanto à maior eficiência energética. Corroborando para esse resultado, nos termos de referências e editais analisados, confirmou-se a inclusão de critérios de sustentabilidade nas aquisições de aparelhos elétricos em geral e aparelhos eletrodomésticos que utilizam energia elétrica, como *freezers* e condicionadores de ar com Selo PROCEL. Da análise dos termos de referências e editais observou-se que a inclusão de critérios ambientais não se deu de forma uniforme, mas apenas em alguns equipamentos, evidenciando que houve uma fragilidade no planejamento da licitação, quando da elaboração técnica do objeto, para que todos os itens adquiridos trouxessem características de proteção ao meio ambiente. Destaque-se, ainda, que nos de prestação de serviço não foi exigido como obrigação da contratada o uso de equipamentos elétricos e eletrodomésticos com maior eficiência energética. A ocorrência da situação apresentada se justifica porque, contrariando o comum de o produto sustentável ser um pouco mais caro que o convencional, em muitos casos a alternativa mais sustentável está disponível



pelo mesmo preço de compra que os produtos convencionais, especialmente os eficientes sob o ponto de vista energético, que, geralmente, não são mais caros que as alternativas menos eficientes, mesmo ignorando os custos reduzidos durante o uso (Biderman, 2008, p. 42). No caso, como em toda aquisição do Estado está atrelada aos itens cadastrados no E-Fisco e esse não se distingue dos materiais e serviços sustentáveis e convencionais, é possível que o produto tenha sido escolhido pelo critério de menor preço, apenas, e não porque trazem características de proteção ambiental. Percebeu-se pouco acompanhamento em relação a resultados e impactos obtidos por meio de alguma prática de sustentabilidade adotada nas licitações. Evidenciou-se que o hospital contratante faz o controle do consumo de energia elétrica da contratada apenas para abater do consumo geral da unidade e deduzir da fatura mensal da contratada. A falta de conhecimento técnico faz com que não se saiba estabelecer e justificar critérios ambientais adequados para cada tipo de objeto ou serviço, fazendo prevalecer apenas a exigência do menor preço (valor econômico) nas aquisições, deixando-se de considerar, segundo Bliacheris (2013, p.142) que “a proposta mais vantajosa não é aquela de menor valor, como se poderia apressadamente se concluir, mas aquela que melhor atende o interesse público”, ainda, “é aquela de menor valor, mas que também está de acordo com as especificações técnicas necessárias para sua utilização, escolhida em processo isonômico de livre e ampla competição”. Ao se considerar a capacitação e o preparo técnico dos servidores envolvidos no processo de compras, amplia-se a perspectiva na ação de implementação das compras sustentáveis (Meneguzzi, 2013, p. 27). Revelou-se que o setor jurídico do hospital estudado atende ao que diz respeito à análise jurídica dos editais. Quanto aos critérios de sustentabilidade, apenas quando vêm atrelados aos dispositivos legais obrigatórios. Não exerce atividade proativa no sentido de estimular a inclusão de critérios sustentáveis nas licitações através de outras formas de orientação como palestras e formulação de cartilhas.

#### 4. CONCLUSÃO

-Os resultados obtidos permitiram concluir que as compras sustentáveis do hospital estudado se resumem a ações pontuais e sem planejamento institucional, muito mais por características individuais dos servidores envolvidos no processo do que por propósitos institucionais estabelecidos.

-O setor jurídico atende ao que diz respeito à análise jurídica dos editais, mas não exerce atividade proativa no sentido de estimular a inclusão de critérios sustentáveis nas licitações.

#### 5. REFERÊNCIAS

ALENCASTRO, M. A. C.; SILVA, E. V. da; LOPES, A. M. D. Contratações sustentáveis na administração pública brasileira: a experiência do Poder Executivo federal. *Revista de Administração Pública*, Rio de Janeiro, v. 48, n.1, p. 207-235, jan./fev. 2014. Disponível em: <<http://bibliotecadigital.fgv.br/ojs/index.php/rap/article/view/16072>>. Acesso em: 4 ago. 2014.

BARKI, T. V. P. Direito internacional ambiental como fundamento jurídico para as licitações sustentáveis no Brasil. In: SANTOS, M. G.; BARKI, T. V. P. (Coords.). *Licitações e contratações públicas sustentáveis*. Belo Horizonte: Ed. Fórum, 2013. p. 39 – 65.

BIDERMAN, R. et al. (Org.). *Guia de compras públicas sustentáveis: uso do poder de compra do governo para a promoção do desenvolvimento sustentável*. 2. ed. ICLI – Governos



Locais pela Sustentabilidade, Secretariado para América Latina e Caribe (LACS), São Paulo, 2008. Disponível em: <<http://www.iclei.org/index.php?id=7089>>. Acesso em: 4 ago. 2014.

BLIACHERIS, M. W. Licitações sustentáveis: política pública. In: SANTOS, M. G.; BARKI, T. V. P. (Coords.). *Licitações e contratações públicas sustentáveis*. Belo Horizonte: Ed. Fórum, 2013. p. 137 – 152.

BRASIL. Lei n.º 12.349, de 15 de dezembro de 2010. Altera as Leis n.ºs 8.666, de 21 de junho de 1993, 8.958, de 20 de dezembro de 1994, e 10.973, de 2 de dezembro de 2004; e revoga o § 1º do art. 2º da Lei nº 11.273, de 6 de fevereiro de 2006. Brasília, 2010. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2007-2010/2010/Lei/L12349.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2010/Lei/L12349.htm)>. Acesso em 14 dez. 2013.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Informativo do Ministério do Meio Ambiente como notícia de título Nova Mentalidade. *Gestores públicos têm papel importante no processo de compras*: e precisam ser sensibilizados sobre as questões ambientais. 2013. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/informma/item/9381-nova-mentalidade>>. Acesso em: 14 de dez. 2013.

BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. *Guia de compras públicas sustentáveis para a administração federal*. Disponível em: <<http://cpsustentaveis.planejamento.gov.br/wp-content/uploads/2010/06/Cartilha.pdf>>. Acesso em: 14 maio 2014.

CÂMARA, R. P. de B.. Desenvolvimento sustentável. In: ALBUQUERQUE, J. de L. (Org.). *Gestão ambiental e responsabilidade social: conceitos, ferramentas e aplicações*. São Paulo: Atlas, 2009. p. 70 – 92.

CARVALHO FILHO, J. dos S. *Manual de Direito Administrativo*, 25. ed. São Paulo: Atlas, 2012.

CSIPAI, L. P. et al. *Guia prático de licitações sustentáveis da Consultoria Jurídica da União no Estado de São Paulo*. 3. ed. Brasília: Advocacia Geral da União – AGU, 2013. Disponível em: <[http://www.agu.gov.br/page/content/detail/id\\_conteudo/138067](http://www.agu.gov.br/page/content/detail/id_conteudo/138067)>. Acesso em: 28 ago. 2014.

FERREIRA, M. A. S. de O. Apontamentos sobre a gestão socioambiental na administração pública brasileira. In: BLIACHERIS, M. W.; FERREIRA, M. A. S. de O. F. (Coord.). *Sustentabilidade na administração pública: valores e práticas de gestão socioambiental*. Belo Horizonte: Ed. Fórum, 2012a. p. 21 – 43.

MARCONI, M. de A.; LAKATOS, E. M. *Técnicas de pesquisa*. 5. ed. São Paulo: Atlas, 2002.

MENEGUZZI, R. M. Conceitos de licitação sustentável. In: SANTOS, M. G.; BARKI, T. V. P. (Coords.). *Licitações e contratações públicas sustentáveis*. Belo Horizonte: Ed. Fórum, 2013. p. 19 – 38.

PERNAMBUCO. Secretaria de Administração. Governo do Estado. *Gestão de compras, contratos e licitações: sistema rede compras*. Disponível em: <<http://www.portais.pe.gov.br/web/seadm>>. Acesso em: 24 mar. 2014.

SANTOS, M. G.; BARKI, T.V. P. (Coords.). *Licitações e contratações públicas sustentáveis*. Belo Horizonte. Ed. Fórum, 2013<sup>a</sup>.

VIANA, A. L. D.; ELIAS, P. E. M. Saúde e Desenvolvimento. *Ciência & Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro, v. 12, nov. 2007. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-81232007000700002](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232007000700002)>.

Acesso em: 7 set. 2013.



ÁREA DE SUBMISSÃO: GESTÃO, ECONOMIA E SAÚDE – GE 13

## IMPACTO DO PROGRAMA NACIONAL DE MELHORIA DO ACESSO E DA QUALIDADE NAS AÇÕES DE RASTREIO DO CÂNCER DE COLO UTERINO EM ALAGOAS

M.F.M., DIAS<sup>1</sup>, J.L., SOARES SOBRINHO<sup>2</sup> e R.G., de ARRUDA<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Mestre em Gestão e Economia da Saúde.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Economia da Saúde.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Doutorando em Economia.

E-mail para contato: maazinnhha@hotmail.com

*RESUMO – Este artigo teve o objetivo de avaliar o impacto do Programa Nacional de Melhoria do Acesso e da Qualidade sobre o indicador de rastreamento precoce do câncer de colo do útero no estado de Alagoas, no período de 2011 a 2014. Para mensurar este efeito utilizou o método estatístico chamado Diferenças em Diferenças e as análises estatísticas foram realizadas através do Software STATA versão 12.0 Special Edition. Os resultados mostraram que o quantitativo de exame/mulher realizados obteve um aumento médio percentual em média de 50% devido ao programa e este efeito captado foi estatisticamente significativo a 1%. Neste sentido, o estudo apontou boas perspectivas para o fortalecimento da atenção básica através desta nova estratégia consolidadora e atribuiu ao programa os movimentos quantitativos positivos identificados, de forma que este potencializou as mudanças no processo de rastreamento precoce no Estado. E os resultados corroboram com a perspectiva imposta pelo programa, o qual induz a melhoria do acesso oportuno e qualidade assistencial, assim este expressa a efetivação do programa ao rastreamento precoce e na indução da redução dos gastos em saúde ao tratamento tardio do câncer de colo uterino.*

*Palavras-chave: PMAQ. Avaliação de impacto do PMAQ. Rastreamento precoce. Câncer do colo de útero.*

*ABSTRACT – This article aims to evaluate the impact of the National Programme for Improving Access and Quality of the early screening indicator of cervical cancer in the state of Alagoas, in the period from 2011 to 2014. To measure this effect used the method statistical called Differences in Differences and statistical analyzes were performed using STATA software version 12.0 Special Edition. The results showed that the quantitative examination/female performed obtained an average percentage increase on average by 50% due to the program captured and this effect was statistically significant at 1%. In this sense, the study pointed out good prospects for strengthening primary health care through the new consolidator strategy and gave the*



*program the positive quantitative movements identified, so that the potentiated program changes in the early screening process. And the results corroborate the approach imposed by the program, which leads to improving timely access and quality of care and this expresses the realization of the program of early screening and inducing the reduction of health expenditures to late treatment of cervical cancer.*

*Keywords: PMAQ. Evaluation of PMAQ impact. Early detection. Cervical cancer.*

## 1. INTRODUÇÃO

A literatura tem discutido no Brasil a importância do amadurecimento gradual de estratégias que consolidam o Sistema Único de Saúde (SUS) (Fadel *et al.*, 2009). E a busca do aprimoramento do SUS vem mediante as crescentes políticas públicas lançadas pelo Ministério da Saúde (MS), como em 2011, o ministério lançou um programa que instiga os municípios brasileiros à melhoria do acesso oportuno e da qualidade assistencial prestada pela Atenção Básica (AB), através da Estratégia da Saúde da Família (ESF), este nomeado de Programa Nacional de Melhoria do Acesso e da Qualidade (PMAQ) o qual representa um impulso estratégico a porta de entrada preferencial da rede de serviços de saúde e de acesso universal mediante aos indicadores propostos, os quais foram baseados pelo Pacto pela Vida de 2006 (Brasil, 2011c).

Neste sentido, o programa nacional estabeleceu a otimização da melhoria do acesso e da qualidade aos usuários do sistema a partir do acompanhamento dos 47 indicadores instituídos pela política, dentre eles de natureza de uso caracterizado como indicador de monitoramento e de desempenho, impulsionando a avaliação do impacto do PMAQ a um dos indicadores de desempenho da área da saúde da mulher, o qual referencia ao rastreamento precoce do Câncer de Colo do Útero (CCU) (Brasil, 2011c). Pois, sabe-se que no Brasil a maioria dos estudos realizados sobre a temática da cobertura do exame citopatológico focaliza-se nas grandes cidades das Regiões Sul e Sudeste e estes ainda são considerados baixos (Martins; Thuler; Valente, 2005). Assim, intensificando a necessidade de mais pesquisas direcionadas as outras Regiões do país, tendo vista que a real pesquisa direcionou-se ao cenário do estado de Alagoas, na Região Nordeste.

Com isto, justifica-se que a incorporação de práticas avaliativas de impacto de programas nacionais aos serviços de saúde pública e sua organização é uma necessidade que se afigura nas políticas públicas, pois avaliar o desempenho da AB é uma iniciativa relevante para o SUS e para a população brasileira. Por isso a necessidade de observar o real posicionamento do PMAQ sobre a temática do rastreamento precoce a fim de obter dados os quais configurem a melhoria assistencial as mulheres usuárias do sistema de saúde brasileiro acesso oportuno na realização do exame citopatológico, pois o Brasil vem lutando na perspectiva de minimizar a incidência de CCU através do rastreamento precoce.

Nesse contexto, o rastreamento precoce traduz-se para a área da economia da saúde como um instrumento indispensável para a gestão em saúde e alocação dos serviços em busca de alternativas mais eficientes e racionais no manejo da prevenção, não esperando apenas a mulher procure o serviço, mas se faz necessários métodos de recrutamento para maior adesão (BRASIL, 2012).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado no estado de Alagoas. E desenvolvido utilizando os dados do indicador, proposto pelo PMAQ, Razão entre os exames citopatológico do colo do útero, nomeado de *Razão*, no período de 2011 a 2014. Estimou-se o impacto do PMAQ ao indicador e observou-se a diferença entre os municípios beneficiados pela implantação do PMAQ nos dois ciclos de pactuação e os não beneficiados. Para mensurar este impacto utilizou-se o método estatístico chamado Diferenças em Diferenças (DID) e as análises estatísticas foram realizadas através do Software STATA versão 12.0 *Special Edition*. O método DID, que foi muito utilizado por Card e Krueger (1994) nos mais famosos estudos por DID, este é indicado para avaliação de políticas públicas em que estejam disponíveis experimentos naturais e requer observações em diferentes momentos do tempo.

Para mensurar o efeito médio do PMAQ sobre as ações de rastreamento precoce do CCU utilizou-se o método estatístico DID com efeito fixo (fi) para dados em painel, o modelo de efeito fixo adotado pretendeu controlar as características individuais dos municípios da amostra que não variaram e permaneceram constantes ao longo do tempo. Pois, uma das grandes preocupações tomada neste estudo foi com relação ao fato dos municípios que optaram em pactuar ao programa desde 1º ciclo, por decisão do gestor municipal, pudessem ter sido influenciados por outras condições municipais para mudança positiva do indicador.

A definição das unidades amostrais foi constituída por dois grupos, os quais se diferenciam pelo contexto do processo de pactuação municipal ao PMAQ, uma vez que foram necessárias a implantação do PMAQ no 1º e 2º ciclos e apenas no 2º ciclo para compor grupo de intervenção e controle, respectivamente. Foram excluídos do estudo os municípios alagoanos que não realizaram pactuação a política em nenhum dos ciclos do programa ou apenas ao primeiro ciclo, foram os municípios de Colônia Leopoldina e Senador Rui Palmeira. Esses municípios foram excluídos para caracterizar uma melhor e maior semelhança entre as unidades amostrais.

A base de dados adotada nesse trabalho consiste de variável resposta e independentes compiladas para os 100 municípios de Alagoas em dois períodos distintos, os anos de 2011 e 2014. Assim, a pesquisa utilizou a variável dependente *Razão* por mil habitantes para os resultados serem bem mais observados, conforme a Tabela 1.

**Tabela 1** - Descrição da variável dependente e sua fonte

<b>Cod. Variável</b>	<b>Descrição</b>	<b>Fonte</b>	<b>Anos</b>
Razão	Produção e a oferta de exames citopatológico do colo do útero em relação à população feminina com 15 anos ou mais (determinado local e período).	SIAB/ Datusus	2011, 2014

Fonte: Elaboração própria, 2016.

Este indicador, *Razão*, foi escolhido como variável explanatória diante dos 47 indicadores instituídos pela política do PMAQ devido a problemática do câncer de colo do útero ser uma das prioridades preventivas brasileiras e este caracterizado como um problema de saúde pública no

Brasil, de forma que a minimização da incidência de casos e da mortalidade se faz através do rastreamento precoce.

E como controle para as estimações foram utilizados as variáveis independentes para o estudo de impacto, haja vista que esses fatores pudessem interferir no aumento e/ou redução do rastreamento precoce do câncer de colo do útero. Dessa maneira, tais informações relativas à base de dados das variáveis independentes foram resumidas na Tabela 2.

**Tabela 2** - Descrição das variáveis independentes e suas fontes

Cod. Variável	Descrição	Fonte	Anos
Pop	População geral residente no município	IBGE	2011, 2014
PIB	Produto Interno Bruto.	IBGE	2011, 2014
Tx_ido	Taxa de idoso residente no município.	Datasus	2011, 2014
Ieduc	Índice de Firjan de Educação.	Índice Firjan	2011, 2014
Rmm	<i>Dummy</i> Região Metropolitana Maceió.	IBGE	2011, 2014
Rma	<i>Dummy</i> Região Metropolitana Agreste.	IBGE	2011, 2014
Despesa	Despesa total com saúde.	Datasus	2011, 2014
Cobertura	Proporção de cobertura populacional estimada.	P Datasus	2011, 2014
Isaude	Índice de Firjan de Saúde.	Índice	2011, 2014
Água	Abastecimento de água da rede pública	Firjan Datasus	2011, 2014

Fonte: Elaboração própria, 2016.

Essas variáveis independentes foram escolhidas devido à existência de estudos por Albuquerque *et al.* (2009) relacionados à baixa cobertura de exames citopatológicos serem interferidos por fatores de características socioeconômicas, demográficas e de saúde. Enfatizando a necessidade de serem inserido a fim de controlar tais vetores que pudessem viesar indiretamente o quantitativo de exames citopatológicos e o efeito captado ter sido de fato atribuído a política do PMAQ.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A primeira seção apresentou os resultados para o modelo Diferenças em Diferenças com efeito fixo e a segunda foram os testes de robustez realizados a fim de garantir maior credibilidade dos resultados principais.

A Tabela 3 mostrou os resultados da estimação mais estruturada do estudo (3) e sabe-se que a equação estimada utilizou erros padrões robustos e foi especificada com um número de 200 observações ao modelo estruturado estimado. Dessa forma, a regressão apresentou a *Razão* como a variável dependente do efeito da política sobre o grupo dos tratados e seu contra factual. E o impacto foi dado pelo coeficiente da variável "DID", através do modelo utilizado, a Diferenças em Diferenças.

**Tabela 3 - Estimações das equações Diferença em Diferenças**

<b>Variável</b>	<b>Modelo da Estimação</b>
<b>Razão</b>	<b>(3)</b>
<b>Tempo</b>	-4.261697*(2.060691)
<b>Tratamento</b>	-14.25722*(105.2648)
<b>DID</b>	5.049422*(1.678067)
<b>Controles Socioeconômicos e Demográficos</b>	Sim
<b>Controles de Saúde</b>	Sim
<b>Aumento Médio Percentual</b>	50%
<b>Observações</b>	200

Fonte: Elaboração própria através do programa *Stata*, 2016. \*significante a 1%.

Em média o efeito do PMAQ contribuiu com um aumento médio percentual de 50% nas ações de rastreamento precoce do Câncer de Colo do Útero no estado. Justificando que o programa ministerial incentivou nas ações de rastreio precoce, a qual ainda se faz restrita no Brasil, e que esse aumento médio percentual apresentado aos municípios dos tratados foram mediante as melhorias assistenciais prestadas as mulheres usuárias do SUS adstritas a cada EAB e este efeito influenciará a futura minimização das taxas de incidência e mortalidade, tendo vista a ocorrência da melhoria de ações de rastreamento precoce.

Assim, enfatizou-se que, o programa conseguiu o aumento do quantitativo de mulheres que realizaram exames a cada município tratado, intensificando o crescimento da promoção a saúde da mulher e esse impacto positivo corrobora com o real objetivo da política do PMAQ, a qual prioriza a viabilidade do acesso a prevenção com qualidade assistencial e assegurou que o PMAQ, como uma estratégia consolidadora do SUS, fortaleceu ainda mais a AB, quando o programa estabeleceu o aumento oportuno da oferta dos exames citopatológicos e da demanda das mulheres.

Conforme evidenciou a estimação (3), equação mais estruturada do estudo, esta além de considerar as variáveis socioeconômicas e demográficas, considerou a inclusão das variáveis explicativas relacionadas à saúde. Dessa forma, ao considerar essas variáveis, o efeito do programa



encontrado foi de 5.049, estatisticamente significativa a 1%, o que representou um efeito de 5.049 exames/mulher a mais que o contra factual. Assim, mostrou que o impacto do PMAQ foi positivo e este auxilia positivamente no rastreamento do câncer de colo de útero no grupo dos municípios tratados, pois o modelo mais estruturado do estudo ajustou um ganho médio percentual de 50% às ações de rastreamento precoce ao CCU, modificando os índices de rastreio precoce no estado de Alagoas e potencializando as ações de prevenção do CCU e ocorrendo uma quebra ao paradigma pela política dos fatores limitantes a adesão pelas mulheres a realização das ações de rastreio precoce.

Dessa forma, tal regressão torna evidente que o PMAQ aumentou de forma significativa o quantitativo de exames citopatológicos realizados aos municípios tratados. E o efeito médio do programa PMAQ sobre o rastreamento precoce ao serem inseridos os principais desfechos como variáveis independentes verificou-se que o programa conseguiu alcançar positivamente, no estado de Alagoas, o seu intento maior que foi o intuito de assegurar as mulheres usuárias do SUS, especificamente da Atenção Básica a garantia da melhoria do acesso oportuno ao rastreamento precoce.

Nessa perspectiva o aumento do coeficiente dos municípios dos tratados em relação aos municípios caracterizados como controle satisfaz o contexto da estratégia em estudo na dimensão estadual, pois, remete ao fato desses gestores municipais terem adotado medidas e decisões favoráveis ao acesso oportuno e qualidade dos serviços de saúde ofertados a população-alvo, e honrarem os compromissos pactuados entre a própria gestão, EABs e o MS.

Visto que, a gestão do sistema de saúde realizado pela atenção básica na maioria dos municípios alagoanos enfrenta desafios para atender a demanda de problemas de saúde que são recentes, representados pela convivência com doenças infecto-parasitárias, problemas de saúde reprodutiva, causas externas e doenças crônicas (Mendes, 2010).

Portanto, a avaliação da implantação do PMAQ no estado alagoano sobre esse indicador tornou-se estimulador ao contexto observado em alguns estados do Brasil, os quais estudos revelaram que fatores socioeconômicos e demográficos foram como maior estimativa de risco para não realização dos exames, enquanto estes não estabeleceram relação ao PMAQ. Em estudos, Albuquerque *et al.* (2009), mostraram que, em Pernambuco, a baixa escolaridade, com ensino fundamental incompleto, estava entre os fatores associados a não realização do exame de rastreamento; na cidade de Rio Branco/AC, Borges *et al.* (2012), constataram que um dos fatores de maior risco para a não ocorrência do rastreamento precoce foram mulheres com baixa renda e a escolaridade até o ensino fundamental.

Por fim, para melhor inferir o comportamento do programa PMAQ, alguns testes de robustez foram realizados de modo a verificar as estimações feitas anteriormente, esses testes econométricos foram utilizados no intuito de examinar a consistência dos resultados obtidos de modo a garantir maior credibilidade a pesquisa.

Ao primeiro teste a Tabela 4 mostrou que os municípios tratados foram divididos em dois grupos, utilizando como separação a mediana da população. O primeiro grupo apresentou as menores populações e no segundo, as maiores. Dessa maneira, foram estimadas as regressões de modo a verificar em qual delas o efeito do PMAQ se evidenciava da maior forma, e, a partir disso, foi visto que aos grupos por população, o efeito do PMAQ sob a *Razão* apresentou algumas diferenças. No primeiro grupo, o efeito do PMAQ foi positivo e aumentou em 5.947 o quantitativo de exames/mulher, ao nível de significância de 1%. E no segundo grupo o efeito do PMAQ apresentou

insignificativo. Contudo, tal divisão por mediana da população não elimina o efeito positivo anteriormente apresentado, pois nesse contexto apenas se faz observar em qual grupo de populações ocorreu maior efetivação do programa, ou seja, pode-se afirmar que o efeito sobre municípios com menores populações foi mais evidente, em média o resultado apresentado se fez mais robusto e o rastreamento precoce se mostrou mais eficiente ao grupo de menores populações.

**Tabela 4 - Teste de Robustez por Mediana da População**

Variável Razão	Mediana da População	
	Grupo 1	Grupo 2
<b>Tempo</b>	-4.773269* (4.070112)	-4.88074 (3.471186)
<b>Tratamento</b>	-4.568843* (69.96064)	-1.995854 (121.8588)
<b>DID</b>	5.947244* (3.394011)	3.817993 (2.357832)
<b>Controles Socioeconômicos e Demográficos</b>	Sim	Sim
<b>Controles de Saúde</b>	Sim	Sim
<b>Observações</b>	100	100

Fonte: Elaboração própria através do programa *Stata*, 2016. \* significante a 1%.

Além da inferência robusta realizada, foram feitos outros testes de robustez de modo a validar o efeito positivo do PMAQ, usou os modelos estatísticos para estimação através da Regressão Poisson e Negativo Binomial. Ambos os modelos estatísticos mostraram condizentes com as estimações apresentadas anteriormente, de maneira estatisticamente significativa a 1% e mostrando que o programa é eficiente. Essas regressões foram utilizadas visto que, a variável dependente foi uma razão.

#### 4. CONCLUSÃO

O estudo atribuiu ao PMAQ os movimentos quantitativos positivos identificados aos municípios tratados na pesquisa e a potência nas mudanças no processo de rastreamento precoce. A pesquisa permitiu identificar de maneira estatisticamente significativa o efeito médio do PMAQ sobre a Razão entre exames citopatológicos do colo do útero no estado de Alagoas.

Neste sentido, apontou boas perspectivas para o fortalecimento da AB através dessa nova estratégia considerada consolidadora do SUS. E justificou que os municípios com maior tempo de pactuação puderam se reestruturar, adaptando ao cenário desejável, com a melhoria do índice da



média do indicador estudado. Estima-se que tal medida influenciará na diminuição das taxas de incidência e mortalidade, devido ao aumento do quantitativo de mulheres que realizaram o exame e a possível detecção precoce da doença.

Acredita-se que este possa contribuir para a reflexão sobre implantação do PMAQ aos gestores municipais de saúde e colaboradores da atenção básica. E que novos estudos sobre a óptica do impacto do PMAQ na otimização das ações de saúde sejam realizados, pois há carência de estudos sobre a efetivação de estratégias públicas de saúde no âmbito do SUS.

## 5. REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, K. M. et. al. Cobertura do teste de Papanicolau e fatores associados à não realização: um olhar sobre o Programa de Prevenção do Câncer do Colo do Útero em Pernambuco, Brasil. *Cad.SaúdePública*, v.25, n.2, p. 301-309,2009.

BORGES, M. F. S.O. et. al. Prevalência do exame preventivo de câncer do colo do útero em Rio Branco, Acre, Brasil, e fatores associados à não-realização do exame. *Cad.SaúdePública*,v.28, n.6, p. 1156-1166,2012.

BRASIL. *Núcleos de Economia da Saúde: orientações para implantação*. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos) (Série Gestão e Economia da Saúde ; v. 1). DF: Editora do Ministério da Saúde, 2012. 36 p.: Il.

BRASIL. *Programa Nacional de Melhoria do Acesso e da Qualidade da Atenção Básica*, DF: Ministério da Saúde, 2011c. Disponível em <[http://189.28.128.100/dab/docs/publicacoes/geral/manual\\_instrutivo\\_pmaq\\_site.pdf](http://189.28.128.100/dab/docs/publicacoes/geral/manual_instrutivo_pmaq_site.pdf)>. Acesso em: Maio 2015.

FADEL, C. B. et. al. Administração pública: o pacto pela saúde como uma nova estratégia de racionalização das ações e serviços em saúde no Brasil. *Rev. Adm. Pública*, vol.43, n.2, p. 445-456, 2009.

MARTINS L. F. L.; THULER L. C. S.; VALENTE J. G. Cobertura do exame de Papanicolau no Brasil e seus fatores determinantes: uma revisão sistemática da literatura. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, 1.27, n.8, p. 485-492, 2005.

MENDES, E.V. As Redes de Atenção à Saúde. *Ciência & Saúde Coletiva*, v.15, n.5,p.2297-23-5, 2010.

## 6. AGRADECIMENTO

A UFPE, ao PPGGES e as instituições vinculadas ao favorecimento desta pesquisa.



ÁREA DE SUBMISSÃO: GESTÃO, ECONOMIA E SAÚDE - GE 14

## A EFICIÊNCIA DA ATENÇÃO PRIMÁRIA À SAÚDE NO ESTADO DE PERNAMBUCO

M. R. FRAGOSO<sup>1</sup>, P.H. VAZ<sup>2</sup>, L. EMANUEL<sup>3</sup> e R.S. LEMOS<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Mestre em Gestão e Economia da Saúde

<sup>2</sup> Universidade Federal do Pernambuco, Departamento de Economia

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Doutorando em Economia

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Mestre em Gestão e Economia da Saúde

E-mail para contato: mariahrosafragoso@gmail.com

**RESUMO** – *Avaliar o desempenho da assistência à saúde na Atenção Primária, aprimorar a eficiência técnica nos processos é, atualmente, imprescindível para a gestão dos sistemas de saúde, assim como para a qualidade da assistência ofertada aos usuários. Diante disso, objetiva-se analisar o nível de eficiência da Atenção Primária à saúde nos municípios do Estado de Pernambuco mediante a Análise Envoltória de Dados. Aplicou-se a metodologia Data Envelopment Analysis (DEA), com o modelo desenvolvido por Banker, Charnes e Cooper, através da orientação produto. O trabalho utilizou de informações disponíveis na base de dados do DATASUS, na qual foram selecionados indicadores de números de equipes de saúde da família, números de agentes comunitários de saúde, gastos per capita com saúde, população SUS dependente e número de leitos SUS como insumos. Já as variáveis selecionadas como produto foram estabelecidas como o inverso do número de óbitos infantis e inverso de internação por causas sensíveis a atenção primária e à produção médica. Os resultados demonstram que entre os 184 municípios menos da metade é eficiente tecnicamente e que a região que mais apresentou municípios eficientes compõe a faixa espacial da Região Metropolitana de Recife. Dessa forma, os resultados exibidos podem ser vistos como fatos estilizados para futuras investigações na atenção primária à saúde, assim como subsidiar os gestores e usuários nas políticas públicas.*

**Palavras-chave:** *análise de eficiência, DEA, Atenção Primária à Saúde, Atenção Básica.*

**ABSTRACT** – *Performance evaluation of the primary health care is indispensable to improve technical efficiency in the management of health systems, as well as the quality of service offered to users. Therefore, the objective is to analyze the level of efficiency of primary care given to the health of users in the municipalities of the state of*



*Pernambuco by data envelopment analysis (DEA). It was applied a BCC model developed by Banker, Charnes and Cooper, with product orientation. The study used information available in the DATASUS database, which were selected indicators of numbers of family health teams, number of community health workers, per capita spending on health, population dependent on SUS, number of NHS beds dependent as inputs. The variables selected as outputs were established as the inverse of the number of infant deaths and inverse of hospitalization for causes sensitive to primary production and medical attention. The results show that among the 184 municipalities less than half are technically efficient and the region that showed efficient municipalities make up the spatial range of the Metropolitan Region of Recife. The displayed results can be seen as stylized facts for future research in primary health care as well as support managers and users in public policy*

*Keywords: efficiency analysis, DEA, Primary Health Care, Primary Care.*

## 1. INTRODUÇÃO

A Atenção Primária em Saúde (APS) é um marco nos sistemas de saúde. Essa mudança no modelo assistencial é vista como primordial para o avanço da sustentabilidade econômica, qualidade e resolutividade dos sistemas de saúde (Pelone *et al.*, 2012). No cenário internacional, a APS é conhecida como uma estratégia de organização à saúde, por focalizar no nível primário de saúde e assistir as populações de baixa renda.

No Brasil, após o surgimento do Sistema Único de Saúde (SUS) através da Constituição Federal (CF) de 1988, a APS incorporou os princípios da Reforma Sanitária e a estratégia de atenção à saúde passou a ser inserida de forma universal, regionalizada, integral, resolutiva, equânime e descentralizada. Atualmente, existe a necessidade de estudos direcionados à avaliação do desempenho da assistência à saúde na Atenção Básica, como forma de subsidiar a gestão no planejamento e, conseqüentemente, fazer com que os recursos da saúde sejam melhores destinados e mais efetivos.

Sabe-se que a organização dos serviços da Atenção Básica por meio da Estratégia de Saúde da Família (ESF) define como prioridade a promoção, proteção e recuperação de saúde. Nesse contexto, é notório que os impactos na saúde sejam visualizados através de seus indicadores, como os de mortalidade infantil e morbidade. Conseqüentemente, entende-se que quanto menor a Taxa de Mortalidade Infantil (TMI) e a Taxa de Internações por Causas Sensíveis a Atenção Primária (ICSAP), melhor será o desempenho e a eficiência da AB.

O objetivo do presente estudo é analisar o nível de eficiência relativa da Atenção Primária prestada à saúde dos usuários dos municípios do estado de Pernambuco, no período de 2014, incorporando a importância das quantidades de Equipes de Saúde da Família (ESF) e Agentes Comunitários de Saúde (ACS) neste cenário. Desta forma, os municípios pernambucanos serão situados no cenário estadual em relação a sua eficiência técnica, apontando as unidades municipais que possam servir de referência para a qualidade da assistência ofertada aos usuários. A fim de alcançar este objetivo, será utilizada a metodologia da Análise Envoltória de Dados (DEA), que consiste em um método empírico não paramétrico, que utiliza programação matemática linear.

Com base na pesquisa realizada, verificou-se que o presente estudo é o primeiro a utilizar tal metodologia para medir a eficiência técnica dos municípios pernambucanos. Dessa forma, infere-se que tal análise é de suma relevância ao mapear a eficiência da Atenção Primária dos municípios do estado de Pernambuco, levantando os primeiros fatos estilizados sobre este tema na região. Além disso, enfatiza-se que a inserção de práticas de avaliação dos serviços de saúde pública é uma necessidade que se configura nas políticas públicas, uma vez que a avaliação da eficiência da AB é uma iniciativa relevante para o SUS e para a população brasileira.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

O universo da pesquisa ocorreu nos municípios do estado de Pernambuco no ano de 2014, por ser o período mais recente com disponibilidade completa de informações. A unidade amostral totalizou em 184 municípios pernambucanos, tomando como referência as regiões de saúde que as compõem, conforme o processo de regionalização dos serviços de saúde do Estado. A utilização do estudo por essa divisão territorial justificou-se pela razão de que, em muitas regiões do estado, o serviço de saúde acontece de forma compartilhada e que alguns fatores favorecem a concentração de serviços de saúde em um município que assume uma maior demanda. Foi excluído do estudo o distrito de Fernando de Noronha, município participante da I região de saúde do estado de Pernambuco, por se tratar de um distrito estadual com natureza de autarquia territorial.

O Ministério da Saúde foi a fonte de dados para a obtenção das informações, sendo todos os dados secundários de domínio público. Os dados foram coletados por meio de sítios eletrônicos da Agência Nacional de Saúde (ANS) e no site oficial do DATASUS que fornece informações sobre indicadores de recursos, produção e resultados da saúde do Brasil.

O critério para selecionar os Inputs (entrada) e Outputs (saída) para o modelo DEA foram os relacionados à prestação dos serviços básicos de saúde à população dos municípios trabalhados. Tais informações relativas à base de dados das variáveis de entrada são resumidas na Tabela 1.

**Tabela 1** - Descrição das variáveis de Insumos/*Inputs* e suas fontes

Variáveis	Descrição	Fonte	Ano
<b>Insumos/ <i>Inputs</i></b>			
<b>ESF</b>	Número de equipes de saúde c família.	CNES/ DATASUS	2014
<b>Leitos/SUS</b>	Número de leitos SUS	CNES/ DATASUS	2014
<b>Despesa</b>	Gasto per capita com saúde.	SIOPS/DATASUS	2014
<b>ACS</b>	Número de Agentes Comunitários de Saúde.	CNES/ DATASUS	2014
<b>Pop</b>	Cobertura população SUS dependente	ANS	2014

Esse conjunto de variáveis descritas acima foram escolhidas como insumos pois englobam boa parte das ferramentas utilizadas pelos serviços ofertados a população. Dentre estas variáveis, destaca-se, principalmente, a relevância da inclusão das variáveis que captam a atividade do principal programa nacional de atenção primária de saúde, o Programa Saúde da Família (PSF). Dessa forma, o nível de eficiência dos municípios será construído considerando a intensidade de atuação desse programa nos municípios por meio do número de agente comunitários de saúde (ACS) e do número de equipes de saúde da família (ESF). Já as variáveis que representam as informações relativas aos produtos na base de dados estão resumidas na Tabela 2.

**Tabela 2** - Descrição das variáveis de Produtos/*Outputs* e suas fontes

Variáveis	Descrição	Fonte	Ano
<b>Produtos/ Outputs</b>			
<b>Sobrevida</b>	Inverso do número de óbitos infantis	SIM/DATASUS	2014
<b>ICSAP</b>	Inverso de Internação por causas sensíveis a atenção primária p município	SIA-SUS e SIH-SUS/DATASUS	2014
<b>Produção Med</b>	Produção médica anual	DATASUS	2014

A escolha das duas primeiras variáveis da tabela acima como produto para a análise da eficiência da atenção primária foi decorrente de Alfradique *et al.* (2009), que apontam que estes indicadores representam o desempenho da Atenção Básica, sendo classificados, respectivamente, como resultados em saúde – indicadores de qualidade e refletem a qualidade e eficácia dos serviços ofertados na atenção básica. Ricketts *et al.* (2001) mostra também que a proporção de internações hospitalares consideradas evitáveis é um indicador utilizado para avaliar acessibilidade e efetividade do cuidado primário, abordado nos Estados Unidos nos anos 80. Cabe salientar que a variável internação por causas sensíveis da APS refere-se ao município de residência do paciente, mesmo que este usuário seja internado em outro município. Dessa forma os dados coletados refletem a fragilidade da Atenção Básica no município de sua residência. Por fim, a produção de saúde foi incorporada com o intuito de capturar alguma heterogeneidade quanto ao nível de desempenho das equipes em relação ao que cada uma conseguiu produzir.

Miclos, Calvo e Colussi (2015) identificaram através de revisão da literatura na base de dados eletrônica PUBMED no período dos últimos dez anos, estudos sobre a APS que utilizaram a ferramenta DEA para avaliar o desempenho do setor saúde. Nessa pesquisa foram achados 1045 artigos, destes 194 referem-se a esse setor. Observa-se que os insumos e produtos aplicados nas pesquisas foram variados, a partir dos interesses específicos dos estudos e das unidades tomadoras de decisão. Dessa maneira, os insumos foram classificados em recursos materiais, recursos humanos e



recursos financeiros, e os produtos foram relacionados em ações realizadas na atenção básica; resultados da atenção básica; e desempenho da atenção básica.

O método de Análise Envoltória de Dados (DEA) surgiu com o estudo de Farrell (1957), sendo depois estendido por Charnes *et al.* (1978). A ideia básica do DEA baseia-se no modelo de uma função de produção (fronteira tecnológica), ou seja,  $y = f(x)$ , onde  $y$  representa o produto gerado e  $f(x)$ , a função que combina os insumos para gerar tal produto. Dessa forma, o DEA, por meio de programação linear, busca gerar uma fronteira de eficiência com base nas combinações de insumos e produtos de cada unidade tomadora de decisão (*Decision Making Unit – DMU*), sendo o resultado desta combinação eficiente (sobre a fronteira) ou ineficiente, (abaixo da fronteira).

Considera-se que cada DMU realiza tarefas similares, se diferenciando uma das outras pelas quantidades dos insumos que consomem e dos produtos que resultam (Sampaio, Guimarães, 2009). No presente contexto analisado, cada município pernambucano representou uma DMU distinta e a eficiência relativa refere-se ao desempenho obtido como função de características dos insumos e dos produtos de saúde analisados. A programação linear modela como esses insumos se transformam nesses produtos. Dessa forma, aquelas unidades que apresentarem um valor da variável de decisão 1 (um) no cálculo do escore de eficiência serão os *benchmarks* para a unidade observada. Nesse sentido, serão expostas as DMUs que estarão na fronteira de eficiência e as outras que estarão abaixo da fronteira de produtividade, as ineficientes.

Vale reforçar que a eficiência gerada por este método é relativa, sendo as DMUs que apresentam melhor desempenho tornam-se referência para as demais, de modo que todas as outras unidades sejam comparadas a elas.

Utilizou-se a orientação produto, que busca a máxima taxa de produtos (*Outputs*) gerados para dada quantidade de insumos (*Inputs*) utilizados (Lins; Meza, 2000). Quanto ao tipo de retorno, o modelo DEA adotado no estudo foi o BCC. Este tipo assume uma fronteira côncava, na qual um aumento no uso dos insumos isoladamente, apesar de gerar aumento da produção, não acontece de forma linear, mas com retornos decrescentes. Dessa forma, a não utilização do modelo CCR fundamentou-se por não acreditar que se dobrar o quantitativo de insumos, os produtos iriam cair pela metade e, assim, inferir numa melhor eficiência produtiva ao município e uma maior efetividade das ações na minimização da TMI e ICSAP.

A análise foi realizada de dois modos diferentes. A primeira análise considerou o efeito de cada município em relação a todo o estado, obtendo assim um índice de eficiência global. A segunda análise investigou o efeito de cada município em relação a Geres da qual ela faz parte, criando, assim, uma fronteira local de eficiência para cada Geres. Em seguida, foi feita uma razão entre os coeficientes de eficiência obtidos na fronteira global e fronteira local, de modo a tentar limpar o efeito da Geres em que o município pertence sobre o nível de eficiência, sendo este indicador chamado aqui de eficiência corrigida. Matematicamente:

$$\text{Theta corrigido por DMU} = \frac{\text{Coeficiente de Eficiência Global}}{\text{Coeficiente de Eficiência Local}}$$

Nesse contexto, o *Theta* corrigido para cada DMU atende a observação de que cada Região de Saúde pode ter um comportamento diferente e para melhor comparar um município com o outro independente da Região de Saúde.

Como forma de melhor avaliar a questão da eficiência nos municípios, foram utilizadas todas as variáveis de insumos descritas na tabela 1 e todos os produtos atribuídos ao estudo. Dessa forma evidenciou-se a melhor fronteira de eficiência para o Estado de Pernambuco, tanto na visão qualitativa assistencial pelas taxas utilizadas quanto uma visão quantitativa atribuída às produções médicas corrigida de todos os municípios que compõe cada uma das Regiões de Saúde.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através dessa estimação encontram-se o indicador  $EF_1$  corresponde à eficiência global dos municípios em relação a todos os municípios do Estado de Pernambuco. Em seguida estimou-se  $EF_2$ , correspondendo à eficiência local a dado município em relação aos municípios da mesma Região de Saúde. Por fim,  $EF_3$  apresenta a eficiência corrigida, relacionando a eficiência global pela local. Assim, a partir dos resultados encontrados foi possível analisar e discutir o nível de eficiência à AP nos municípios pernambucanos, identificando as potencialidades e fragilidades presentes nos municípios.

Segundo o mapa (a) da Figura 1, um total de 27 DMUs apresentaram o nível máximo de Eficiência Global ( $EF_1$ ), correspondendo a 14,67% dos municípios do estado de Pernambuco. Os resultados de eficiência ao nível global em relação aos municípios pernambucanos proporcionam a Atenção Primária boa fonte de informação para formulação de políticas públicas, buscando melhorar a eficiência e a qualidade da atenção à saúde. Pode-se afirmar nessa especificação que os municípios atingiram a máxima de produtividade, ao minimizar os índices de ICSAP como também a TMI e maximizar a produção médica.

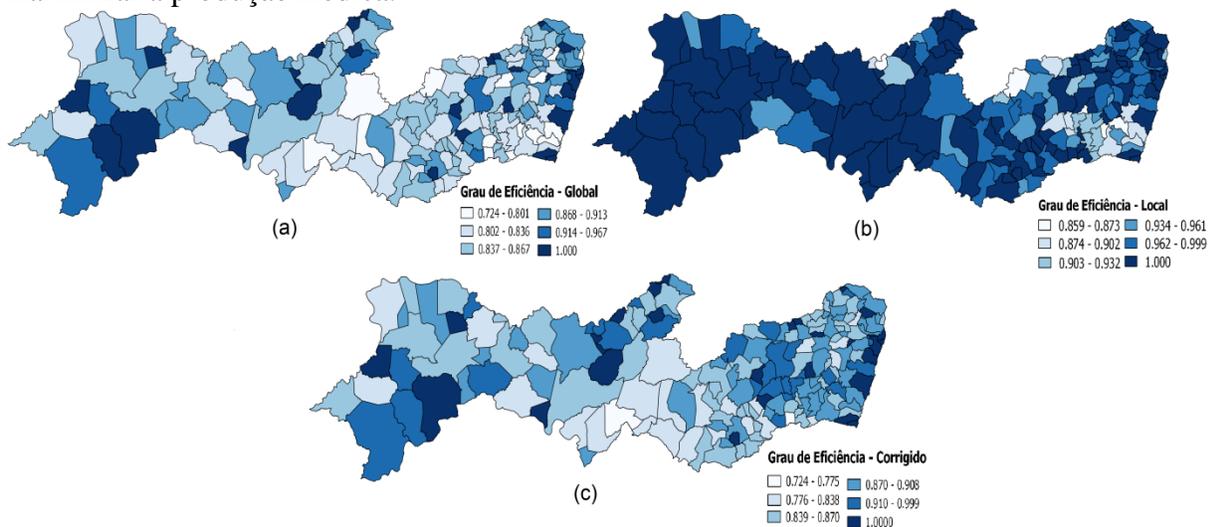


Figura 1 – Mapas com o Grau de Eficiência global, local e corrigido.



Já o mapa (b) da Figura 1, apresenta o nível de eficiência local da especificação 3, sendo 106 municípios, perfazendo um total de 57,60% das DMUs, localmente eficientes. Nesse cenário, observou-se que os municípios pernambucanos ao serem analisados sua eficiência com todas as variáveis do estudo, conseguiram minimizar as taxas de mortalidade infantil e morbidade através do aumento da produção médica. Em tempo, todos os municípios ditos eficientes ao nível global também foram eficientes por Região.

Ao limpar o efeito de eficiência de cada Região de Saúde na especificação 3, conforme apresentado no mapa (c) da Figura 1, a eficiência corrigida apresentou 27 municípios pernambucanos na fronteira de eficiência, um total de 14,67% das DMUs eficientes.

Pode-se perceber que há uma série variada de resultados entre os municípios, mas a análise dos resultados permitem conjecturar, que os municípios que compõem a faixa espacial da Região Metropolitana do Recife possuem um maior quantitativo de DMUs eficientes. O valor mais abaixo da fronteira de produção foi o município de São Benedito do Sul com o valor de 0,72, equivalente a 72%. E 27 municípios do estado de Pernambuco foram Benchmarks, atingindo 100%. Ademais, os municípios eficientes na especificação 3 ao nível de eficiência global foram eficientes ao serem corrigidos seu efeito por Região.

Notou-se que 85% dos municípios pernambucanos não atingiram a fronteira de produtividade ao nível de eficiência por Região de Saúde corrigido. Assim, é necessário a ampliação da eficiência técnica dos municípios pernambucanos.

#### 4. CONCLUSÃO

Através dos resultados apresentados neste trabalho, pode-se inferir uma necessidade de maior fiscalização e avaliação dos serviços de saúde na Estratégia de Saúde da Família. Subentende-se que os municípios que não atingiram a eficiência máxima desejada podem possuir uma má administração dos recursos, acarretando em prejuízo aos usuários do SUS. Mais especificamente, esta ineficiência pode ser decorrente de uma possível deficiência no acesso as Redes de Atenção Básica, assim como pouca resolutividade da APS, corroborando com alguns dos problemas nas quantidades de atendimentos/procedimentos aos usuários do sistema. De outra forma, essa produção máxima poderia refletir na diminuição das taxas de mortalidade infantil, assim como nas internações por causas sensíveis à atenção primária.

Uma constatação a partir dos resultados obtidos é a forte correlação entre o número de municípios apontados como eficiente e a riqueza das regiões aos quais fazem parte. As microrregiões com melhores resultados foram a Região Metropolitana de Recife, área de maior relevância econômica para o Estado (Brito e Rocha, 2011).

No campo da Economia da Saúde, a Estratégia de Saúde da Família, quando eficiente, reduz os custos em saúde, uma vez que a prevenção, educação, promoção e reabilitação em saúde sejam preservados.

#### 5. REFERÊNCIAS

ALFRADIQUE, M.E.; BONOLO, P.F.; DOURADO, I.; LIMA-COSTA, M.F.; MACINKO, J.; MENDONÇA C.S.; OLIVEIRA V.B.; SAMPAIO, L.F.R.; DE SIMONI, C.; TURCI, M.A. *Lista*



*brasileira de internações por condições sensíveis à atenção primária: uma nova ferramenta para medir o desempenho do serviço de saúde.* Cad. Saúde Pública. 2009; 25: 1337-49.

BRASIL, Ministério da Saúde. *Banco de dados do Sistema Único de Saúde-DATASUS*. Disponível em <http://www.datasus.gov.br> [Acessado em 10 de novembro de 2015]

CHARNES, A.; COOPER, W.W.; RHODES, E. *Measuring the efficiency of decision making units.* European Journal of Operational Research, v. 2, n. 6, p. 429–444, 1978.

FARRELL, M. J. *The measurement of productive efficiency.* Journal of the Royal Statistical Society, vol. 120, series A, p. 253-290, 1957.

LINS, M. P. E.; MEZA, L. *A análise envoltória de dados e perspectivas de integração no ambiente de apoio à decisão.* Rio de Janeiro: COPPE/UFRJ, 2000.

MICLOS, Paula Vitali; CALVO, Maria Cristina Marino; COLUSSI, Claudia Flemming. Avaliação do desempenho da atenção primária em saúde através da análise envoltória de dados. *Gestão e Saúde*, v. 6, n. 2, p. Pag. 1749-1763, 2015.

PELONE, F.; KRINGOS, D. S; VALERIO, L.; ROMANIELLO, A.; LAZZARI, A.; RICCIARDI, W.; BELVIS, A. G. *The measurement of relative efficiency of general practice and the implications for policymakers.* Health Policy. 2012; 107: 258– 268.

Ricketts TC, Randolph R, Howard HA, Pathman D, Carey T. *Hospitalization rates as indicators of access to primary care.* Health Place 2001; 7:27-38.

ROCHA, R. M.; GATTO, M. F; SILVA, A. L; *A Indústria da Transformação do Agreste Pernambucano*; In Anais da VI SOBER Nordeste, 2011.

SAMPAIO, Breno; GUIMARÃES, Juliana. Diferenças de eficiência entre ensino público e privado no Brasil. *Economia Aplicada*, v. 13, n. 1, p. 45-68, 2009.

## 6. AGRADECIMENTOS

A UFPE, ao PPGGES, assim como às instituições que contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa.



ÁREA DE SUBMISSÃO: GESTÃO, ECONOMIA E SAÚDE - GE 16

## IDENTIFICAÇÃO DO PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DAS VÍTIMAS DE ACIDENTES DE TRANSPORTE TERRESTRE NO BRASIL E PERNAMBUCO A PARTIR DE MICRODADOS DA PESQUISA NACIONAL DE SAÚDE 2013.

<sup>1</sup> I. de C. BARRETO, I.M.V de MEDEIROS <sup>2</sup> J.M. da S.G ALCOFORADO<sup>3</sup>, J.R.B. NOGUEIRA<sup>4</sup> e V.M. da S MORAES<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Mestre em Avaliação em Saúde. Enfermeira sanitarista, Secretaria Estadual de Saúde Pernambuco.

<sup>2</sup> Mestre em Gestão e Economia da Saúde. Enfermeira urgentista e licenciada em enfermagem, Marinha do Brasil, Departamento de Enfermagem, Hospital Marcílio Dias.

<sup>3</sup> Mestre em Gestão e Economia da Saúde. Enfermeira urgentista, e licenciada em Enfermagem, Docente da Faculdade de Ciências Humanas de Olinda, Departamento de Enfermagem.

<sup>4</sup> Doutor em Economia. Docente da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Sociais Aplicadas, Departamento de Economia.

<sup>5</sup> Mestre em Gestão e Economia da Saúde. Enfermeira intensivista, docente da Faculdade de Ciências Humanas de Olinda, Departamento de Enfermagem.

E-mail para contato: [josialcoforado@hotmail.com](mailto:josialcoforado@hotmail.com)

**RESUMO** – *Este estudo tem como objetivo identificar o perfil epidemiológico das vítimas de acidentes de transporte terrestre no Brasil e Pernambuco. Trata-se de um estudo descritivo, de base populacional e corte transversal com abordagem quantitativo, utilizando microdados da Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) 2013. Dentre os resultados observou-se que os indivíduos mais acometidos por acidente de trânsito são do sexo masculino entre 18 a 35 anos, utilizando motocicleta como meio de transporte, a maioria dos acidentados sofreu de 1 a 3 acidentes nos últimos 12 meses, as sequelas e internações ocorreram com maior frequência quando os acidentados estavam na faixa de idade 18 a 59 anos. Os homens se acidentam mais, no entanto as mulheres ficam mais internadas e são mais acometidas por sequelas. Os homens adotam quatro vezes mais o comportamento de dirigir após ingerir bebida alcoólica. Conclui-se que os acidentes de trânsito no Brasil são um problema de saúde pública, pois geram uma perda anual de capital humano para o país, além gerar custos econômicos ao setor saúde e previdência pública.*

*Palavras-chave: Acidentes de trânsito. Perfil epidemiológico. Causas externas. Acidentados.*



*ABSTRACT - This study aims to identify the epidemiological profile of victims of road accidents in Brazil and Pernambuco. This is a descriptive study, a population-based and cross-sectional with quantitative approach, using microdata from the National Health Survey (PNS) 2013. Among the results it was observed that most individuals affected by traffic accidents are male between 18-35 years using motorcycle as transportation, most suffered one to three accidents in the last 12 months, the after-effects and hospitalizations occurred more frequently when the accident victims were in the age range 18-59 years. The men are injured more, though women are more hospitalized and are more affected by sequelae. Men adopt four times the behavior of driving after drinking alcohol. It is concluded that traffic accidents in Brazil are a public health problem, because they generate an annual loss of human capital for the country, and generate economic costs to the public health and welfare sector.*

*Keywords: Traffic accidents. Epidemiological profile. External causes. Wounded.*

## 1. INTRODUÇÃO

Os acidentes de trânsito no Brasil são a causa de uma grande quantidade de mortes anualmente, segundo dados do Ministério da Saúde, os acidentes causaram cerca de 40 mil mortes no ano de 2013, e estes dados de mortalidade apresentam uma tendência crescente dos anos de 2002-2013 (Oms, 2009).

A concentração dos acidentes e das violências é mais significativa nas áreas urbanizadas, que acumulam cerca de 75% do total das mortes por causas violentas, contudo na área rural as características das violências e acidentes estão relacionadas com conflitos de terra, envenenamento por agrotóxicos, trabalho escravo entre outras causas. Estas causas externas são resultantes de ações ou omissões humanas e de condicionantes técnicos e sociais, trata-se de um fenômeno complexo e de difícil intervenção (Brasil, 2005).

O Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA) estima os custos dos acidentes de automóvel, levando em consideração desde gastos hospitalares até a perda de capital humano, este último relacionado aos acidentes que podem deixar os indivíduos incapacitados ou levá-los ao falecimento, este custo foi calculado em algo em torno de 1% do PIB do Brasil para 2011 (Ipea, 2003).

Por sua vez, os acidentes de trânsito têm especial relevância entre as externalidades negativas produzidas pelo trânsito, não somente pelos custos econômicos provocados, mas sobretudo pela dor, sofrimento e perda de qualidade de vida imputada às vítimas, aos seus familiares e à sociedade como um todo (Ipea, 2003).

Os acidentes e as violências geram agravos à saúde, estes estão subdivididos em causas consideradas não intencional, aquelas relacionadas ao trânsito, trabalho, quedas, envenenamentos, afogamentos; e os classificados como de causas intencionais apontados como as agressões e lesões autoprovocadas, gerando desdobramentos que vão desde lesões reversíveis, sequelas irreversíveis até óbito (Brasil, 2005).

As estratégias para enfrentamento no âmbito das políticas de saúde no país ocorreram em 2001, quando foi instituída a Política Nacional de Redução da Morbimortalidade por Acidentes e



Violências, através da Portaria nº 737, de 16 de maio de 2001. Esta política tem elencado princípios, diretrizes, objetivos, estratégias de implantação e mecanismos de avaliação e atenção às vítimas de causas externas com vistas à promoção da saúde (Brasil, 2006).

É importante destacar a regulamentação da Lei 12.760, conhecida como Lei Seca que entrou em vigor em 2012 com o objetivo de reduzir o número de acidentes. Além disso, o controle da velocidade de circulação de veículos, tanto nas vias urbanas quanto rurais, está sendo realizado de forma progressiva. Estes dois instrumentos têm como objetivo combater as principais causas de acidentes: ingestão de bebidas alcoólicas e excesso de velocidade (Pechansky *et al*, 2014).

É relevante destacar a necessidade de estudar o perfil epidemiológico dos acidentados como medida coadjuvante na formulação de estratégias de enfrentamento desse grave problema de saúde pública, pois os acidentes de trânsito geram como consequência uma perda anual de capital humano para o país, custos hospitalares, custos para sociedade em geral, além de custos pessoais e familiares.

Dessa maneira, o presente trabalho teve como objetivo identificar o perfil epidemiológico das vítimas de acidentes de transporte terrestre a partir de uma análise comparativa dos resultados da PNS em âmbito nacional com o estado de Pernambuco. Dessa forma, a análise poderá subsidiar gestores na implementação das políticas públicas que visem diminuir a morbimortalidade relacionada aos acidentes de transporte terrestre no estado.

Cabe ressaltar, que dada a importância de analisar as características socioeconômicas da população em estudo, inicialmente, estava previsto utilizar variáveis relacionadas ao Módulo E (Trabalho dos moradores do domicílio) e o Módulo F (rendimentos domiciliares) da PNS, no entanto, não foi possível devido o banco com os microdados não ter sido disponibilizado pelo IBGE.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho trata-se de um estudo descritivo, de base populacional e corte transversal com abordagem quantitativa, a partir de uma amostra de microdados da Pesquisa Nacional de Saúde - PNS. O tamanho amostral da PNS 2013 foi de 81.167 domicílios para o Brasil, destes 81,7% estão na área urbana, 205.556 pessoas e 60.202 indivíduos na proporção de 48, 3% homens para 51,7 % de mulheres. Em Pernambuco a amostra foi de 3.598 domicílios, destes 78,4% estão na área urbana, 8.705 pessoas e 2591 indivíduos distribuídos entre os sexos com 48% de homens e 52% de mulheres.

A base de dados utilizada foi a Pesquisa Nacional de Saúde (PNS), estudo de base domiciliar denominado inquérito, que teve o propósito de obter estimativas com grau de precisão relevante através de amostragem de uma parcela representativa da população, foram aplicados questionários subdivididos em três partes, o domiciliar, o de todos os moradores do domicílio e o individual (Szwarcwald *et al*, 2014).

Para análise e apresentação dos dados, foi utilizado o programa SPSS versão 20.0, a partir do agrupamento das variáveis selecionadas referentes ao perfil sociodemográfico (sexo, faixa etária, cor/raça, escolaridade e região censitária), a variável idade foi agrupada em quatro grupos estando o primeiro agrupamento (0 a 17 anos), o segundo de (18 a 35 anos), o terceiro entre (36 a 59 anos) e por último o quarto agrupamento a partir dos (60 anos), esta divisão foi proposta a fim de melhor identificar por segmento de idade os perfis dos indivíduos envolvidos em acidentes de trânsito. Ainda foram selecionadas variáveis relacionadas as características comportamentais no trânsito (uso de veículo automotor, uso de equipamento de segurança obrigatório, envolvimento em acidentes, acesso

aos serviços de saúde, internamento, sequelas e etc.) e de estilo de vida (frequência e intensidade do uso de bebida alcoólica, uso de bebida concomitante com direção de veículo e etc.). Todas as variáveis foram provenientes dos arquivos de domicílio e de pessoas, variáveis de identificação e controle e variáveis derivadas do morador, além das informações presentes nos seguintes módulos: A - Informações do domicílio; C - Características gerais dos moradores; I - Cobertura de plano de saúde; O - Acidentes e violências; e P - Estilos de vida da PNS 2013. Para fins de critério de exclusão do estudo foi eliminado da análise o grupo de indivíduo com idade menor de 18 anos.

### 3. RESULTADOS

Na tabela 1 os homens apresentam duas vezes mais envolvimento em acidentes com lesões no âmbito nacional e estadual nos últimos 12 meses, em comparados com as mulheres e o consumo de bebida alcoólica é maior entre os homens.

Tabela 1- Características dos indivíduos que ingerem bebida alcoólica segundo sexo. Brasil e Pernambuco, 2013

Variável	Informação	Brasil (n= 14.590)				Pernambuco (n= 630)			
		Masculino		Feminino		Masculino		Feminino	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Faixa etária de condutores que afirmaram consumir bebida alcoólica	18 – 35 anos	3.856	39,8	2.251	45,8	161	38,5	95	44,8
	36 – 59 anos	4.777	49,4	2.257	45,9	208	49,8	96	45,3
	> 60 anos	1.045	10,8	404	8,2	49	11,7	21	9,9
Número de dias na semana que ingere bebida alcoólica	Não consome	726	7,5	638	13,0	32	7,7	29	13,7
	1 a 2 dias	6.412	66,3	3.643	74,2	271	64,8	153	72,2
	3 a 4 dias	1.372	14,2	453	9,2	67	16,0	25	11,8
	5 a 6 dias	351	3,6	59	1,2	17	4,1	1	0,5
	Diariamente	817	8,4	119	2,4	31	7,4	4	1,9
Número de doses de bebida alcoólica que bebe	1 a 5 doses	6.177	63,8	3.791	77,2	251	60,0	154	72,6
	6 a 10 doses	2.238	23,1	792	16,1	124	29,7	47	22,2
	11 a 15 doses	704	7,3	216	4,4	21	5,0	5	2,4
	Entre 16 e 50 doses	559	5,8	113	2,3	22	5,3	6	2,8
Dirigiu carro ou moto após beber bebida alcoólica	Sim	2.086	21,6	277	5,6	62	14,8	9	4,2
	Não	5.305	54,8	1.866	38,0	228	54,5	59	27,8
	Não dirige	2.287	23,6	2766	56,3	128	30,6	144	67,9
<b>Total</b>		<b>9.678</b>	<b>100,0</b>	<b>4.912</b>	<b>100,0</b>	<b>418</b>	<b>100,0</b>	<b>212</b>	<b>100,0</b>

Ambos os sexos de condutores para Brasil e Pernambuco na faixa etária de 36 a 59 anos afirmaram consumir bebida alcoólica, com o padrão semelhante para a faixa etária de 18 a 35 anos,



contudo as mulheres apresentarem um padrão de consumo de bebida alcoólica entre as faixas etárias de 18 a 35 e 36 a 59 anos, quando a ingestão de bebidas alcóolicas (de 1 a 2 dias), representado por cerca de 73% para Brasil e Pernambuco, e quanto ao número de doses (1 a 5) com uma média de 74,9% contra 61,9% dos homens. Os homens bebem mais intensamente quando se verifica o número de doses variando de (6 até 50 doses). Para o Brasil o ato de dirigir motocicleta ou carro após a ingestão de bebida alcoólica representou 21,6% dos homens e 5,6% das mulheres afirmaram ter adotado este comportamento. Para Pernambuco 14,8% dos homens e 4,2% das mulheres dirigiram após terem ingerido bebida alcoólica.

Com relação a distribuição dos acidentados separados por sexo e faixa etária, por tipo de transporte e condição do indivíduo para o Brasil e para Pernambuco, homens e mulheres de 18 a 59 anos apresentaram maior incidência de acidentes quando eram condutores ou passageiros de motocicleta. Os acidentados com lesão totalizaram 1.911 no Brasil e 78 em Pernambuco, ambos sofreram de 1 a 3 acidentes nos últimos 12 meses, apenas metade dos acidentados com lesão receberam assistência médica e 50% dos atendimentos foram realizados em alguma unidade pública de saúde, a proporção de homens que precisou de internação foi 9,5% e 8,5% das mulheres, as sequelas representaram 15% de homens e 16,9% de mulheres. O perfil de idade dos acidentados para o Brasil está entre 36 a 59 anos para ambos os sexos, e para Pernambuco, a maior concentração, para ambos os sexos se dá com indivíduo entre 18 a 35 anos, e a escolaridade da maioria dos acidentados variou entre o ensino fundamental e o ensino médio completo.

No que se refere às características comportamentais dos indivíduos no trânsito segundo o sexo a frequência de uso do cinto de segurança por motorista ou passageiro no banco de trás, no Brasil: 43,2% dos homens e 42,7% das mulheres reportaram sempre utilizar cinto de segurança, para Pernambuco, ambos os sexos demonstram usar mais o cinto de segurança com 75,4% dos homens e 69% das mulheres. Em relação ao uso da motocicleta, no Brasil 21,9% dos homens e 11,2% das mulheres utilizam sempre motocicleta, em Pernambuco 23,2% dos homens sempre utilizam motocicleta enquanto 10,3% das mulheres a utilizam sempre.

#### **4. DISCUSSÃO**

No Brasil, de acordo com dados do Ministério da Saúde para o ano de 2010, ocorreram 42.844 óbitos em decorrência dos acidentes de trânsito. No mesmo ano, Pernambuco ocupou 14º posição dentre os estados com maior taxa de mortalidade por acidentes de trânsito com 22,5 óbitos por 100.000 habitantes (Brasil, 2015).

Este estudo apresenta alguns resultados que estão em consonância com outros estudos que dispõe sobre o perfil das vítimas de acidente de trânsito, quanto ao perfil de idade foi verificado que os indivíduos mais acometidos são do sexo masculino e estão na faixa etária de 18 a 35 anos e utilizavam a motocicleta como meio de transporte, a frequência de acidentados foi maior em todas as faixas etárias quando a condição do indivíduo era de condutor ou passageiro de motocicleta, fortalecendo a hipótese da periculosidade deste tipo de veículo. Um estudo realizado em Olinda- PE demonstrou os indivíduos atendidos pelo SAMU predominava o sexo masculino com 78,9 % das vítimas, 65% correspondiam a faixa etária 20 a 39 anos das vítimas e 68% utilizavam a motocicleta como meio de transporte (Cabral, 2009).



É plausível apontar nos resultados para a relação existente entre os homens se acidentarem mais pelo fato que eles dirigem quatro vezes mais motocicletas do que as mulheres, ao passo que as mulheres, entre a faixa etária de 18 a 36 e 36 a 59 anos ocorreu quando estas foram condutoras ou passageiras de motocicleta.

É bastante relevante destacar existência entre o número de acidentes que o mesmo indivíduo foi vítima, homens e mulheres sofreram de 1 a 3 acidentes nos últimos 12 meses. Os homens totalizaram um percentual maior que 98% e mulheres reincidiram em 100%. Um estudo desenvolvido em Londrina e Maringá no Paraná com motoboys identificou 89,9% deles sofreram de 1 a 3 acidentes (Soares *et al.*, 2011).

Quanto as sequelas e internações no Brasil e Pernambuco a diferença se dá no perfil de idade, estando as vítimas entre 36 a 59 anos e 18 a 35 anos para ambos os sexos, respectivamente, as mulheres são mais acometidas, é preocupante todo fato de todas as vítimas estarem na faixa etária correspondente à força de trabalho brasileiro.

Segundo o Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), os acidentes de trânsito geram gastos na cifra de 5 bilhões por ano, as internações por acidentes de trânsito já ocupam o sexto lugar entre todas as causas de internamentos.

O SUS foi responsável por cerca de 50% dos atendimentos realizados as vítimas de acidente de trânsito no Brasil, Pernambuco teve destaque com 100% dos atendimentos ofertados pelo SUS. Estes internamentos e sequelas trazem reflexos para o setor saúde com relação aos gastos aplicados para realização de exames e medicamentos de alto custo, no uso de tecnologias da saúde nas mais diversas áreas de diagnóstico, intervenção, reabilitação e internações de longo prazo (Brasil, 2010).

No presente estudo foi verificado a relação entre ingerir bebida alcóolica e dirigir após, demonstrando um comportamento de risco principalmente para os homens, no âmbito nacional com 21,6 3% e 14,8% para Pernambuco e que as mulheres estão bebendo mais que os homens no primeiro grupo de idade de 18 a 35anos quando categorizados de 1 a 2 dias bem como na intensidade de 1 a 5 doses. A literatura vem apresentando vários estudos com relação a combinação entre a ingestão de álcool e acidentes de transporte e com a alta morbimortalidade geradas. Um estudo inédito de base populacional traz o I Levantamento Nacional Domiciliar sobre Padrões de Consumo de Álcool, foi avaliado a relação de beber e dirigir, esta pesquisa foi aplicada em 143 cidades brasileiras em 2009, entre os resultados destacou-se a prevalência de 34,7% de beber e dirigir, com 42,5% dos homens e 9,2 % de mulheres (Pechansky, *et al.*, 2009).

A OMS em 2015, publicou o Relatório de Situação Regional sobre o Álcool e Saúde nas Américas, revelando que o consumo de álcool por mulheres tem aumentado em volume e frequência, igualando-se ao dos homens em muitos países;

Ainda para OMS o álcool representa o principal fator de risco para morte e incapacidade entre as pessoas consideradas economicamente ativas com faixa de idade entre 15 e 49 anos, tanto nas Américas como no resto do mundo.

Um destaque para o comportamento mais seguro no trânsito por parte dos pernambucanos, através do uso mais frequente de equipamentos de segurança obrigatórios no trânsito como cinto de segurança e capacete, um estudo realizado em Teresina, no Piauí, sobre o perfil das vítimas de trauma por acidente de motocicleta atendidas num serviço de emergência público, demonstrou que 60,21% das motociclistas não utilizavam capacete (Santos *et al.*, 2008).

## 5. CONCLUSÃO

O presente estudo identificou o perfil das vítimas de acidentes de transporte terrestre no Brasil e Pernambuco, com seus domicílios preponderantemente no meio urbano, as pessoas se alto referiram pardas em sua maioria e o nível de escolaridade na média 63% dos entrevistados tem entre o ensino fundamental incompleto e médio completo e as pessoas na zona rural tem menor escolaridade em relação a área urbana, sendo os jovens com maior nível de escolaridade.

Os indivíduos mais acometidos são do sexo masculino entre 18 a 35 anos, utilizando motocicleta como meio de transporte, seja como condutor ou passageiro.

A maioria sofreu de 1 a 3 acidentes nos últimos 12 meses, as sequelas e internações ocorreram com maior frequência quando os acidentados estavam na faixa de idade correspondente à força de trabalho brasileiro, os homens se acidentam mais, no entanto as mulheres ficam mais internadas e são mais acometidas por sequelas.

Destaque para o comportamento mais seguro no trânsito dos pernambucanos, através do uso frequente de equipamentos de segurança obrigatórios em especial o cinto de segurança e de capacete.

Conhecer o perfil dos acidentados é fundamental para traçar dispositivos de enfrentamento afim de reduzir a morbimortalidade causada pelos acidentes de trânsito.

## 6. REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. DATASUS. *Informações de saúde – Estatísticas vitais* 2015. Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205&VObj=http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sim/cnv/obt10>>. Acesso em: 16 nov. 2015 as 17:15h.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. DATASUS. *Informações de saúde – Estatísticas vitais* 2010. Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205&VObj=http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sim/cnv/obt10>>. Acesso em: 16 nov. 2015 as 17:15h.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. Portaria MS/GM n.º 737 de 16 maio de 2001. *Política nacional de redução da morbimortalidade por acidentes e violências*. 2. ed. – Brasília, 2005. Disponível em:<[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica\\_reducao\\_morbimortalidade\\_acidentes\\_2ed](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_reducao_morbimortalidade_acidentes_2ed)>. Acesso em: 10 abr. 2016 as 13:45h.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Política Nacional de Atenção às Urgências*. 3. ed. Brasília, 2006. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica\\_nacional\\_atencao\\_urgencias\\_3ed.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_atencao_urgencias_3ed.pdf)>. Acesso em: 16 nov. 2015 as 18:05h
- CABRAL, A. P. S. *Serviço de atendimento móvel de urgência: um observatório dos acidentes de transporte terrestre*. 2009. Dissertação Mestrado - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2009.
- INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA, IPEA. *Impactos sociais e econômicos dos acidentes de trânsito nas aglomerações urbanas*. Brasília, maio de 2003. Disponível em:



<<http://www.pedestre.org.br/downloads/IpeaSinteseAcidentesTransitoMaio2003.pdf>>. Acesso em: 16 set. 2015 as 16:38h.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *Global status report on road safety: time for action*. Geneva, World Health Organization, 2009-a. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44122/1/9789241563840\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44122/1/9789241563840_eng.pdf)>. Acesso em: 13 set. 2015 as 10:20h.

PECHANSKY, F.; VON DIEMEN, L.; GONÇALVES, V. M. (Orgs.). *Aperfeiçoamento em técnicas para fiscalização do uso de álcool e outras drogas no trânsito brasileiro*. 2. ed. Brasília: SENAD, 2014.

PECHANSKY, Flavio *et al.* Highly reported prevalence of drinking and driving in Brazil: data from the first representative household study. *Rev. Bras. Psiquiatria*. v. 31, n. 2, p.125-130, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-44462009000200008>>. Acesso em: 16 abr. 2016 as 04:04hs.

SANTOS, A. M. R. dos *et al.* Perfil das vítimas de trauma por acidente de moto atendidas em um serviço público de emergência. *Cad. Saúde Pública*, v. 24, n. 8, p. 1927-1938, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2008000800021>>. Acesso em: 16 set. 2015 as 10:56.

SOARES, D. F. P. de P. *et al.* Motociclistas de entrega: algumas características dos acidentes de trânsito na região sul do Brasil. *Rev. Bras. Epidemiologia*. 2011, v. 14, n. 3, p. 435-444, 2011. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-790X2011000300008](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-790X2011000300008)>. Acesso em: 15 abr. 2016 as 01:37h.

SZWARCWALD, C. L. *et al.* Pesquisa Nacional de Saúde no Brasil: concepção e metodologia de aplicação. *Ciênc. Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro, v. 19, n. 2, fev. 2014. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-81232014000200333&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-81232014000200333&script=sci_arttext)>. Acesso em: 05 ago. 2015 as 23:17h.



ÁREA DE SUBMISSÃO: GESTÃO, ECONOMIA E SAÚDE - GE 17

## IMPACTO DO MELANOMA MALIGNO EM PERNAMBUCO: UMA ANÁLISE DA JUDICIALIZAÇÃO EM PERNAMBUCO

G. A. C. ALVES<sup>1</sup>, M. C. PEREIRA<sup>2</sup>, e R.S. LEMOS<sup>4</sup> M. J. B. M. RÊGO<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Mestre em Gestão e Economia da Saúde

<sup>2</sup> Prefeitura de Recife, Secretaria Municipal de Saúde

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Mestre em Gestão e Economia da Saúde

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Coordenador do Mestrado de Gestão e Economia da Saúde

E-mail para contato: gislaiyalves@bol.com.br

*RESUMO – Este estudo teve como objetivo, a partir dos dados em documentos públicos, analisar o custo para o estado de Pernambuco das ações judiciais na aquisição do medicamento ipilimumabe, utilizado em pacientes com melanoma maligno através do valor de ressarcimento estabelecido no Sistema de Gerenciamento da Tabela de Procedimentos do Sistema Único de Saúde (SUS) por meio do levantamento das Autorizações de Internação Hospitalar (AIH) de pacientes com CID de melanoma internados nos hospitais de Pernambuco, nos anos de 2013 a 2015. Trata-se de um estudo exploratório e retrospectivo descritivo, onde as fontes utilizadas foram os processos judiciais relacionados ao ipilimumabe, publicadas no site do Tribunal de Justiça do estado de Pernambuco e no site da Justiça Federal de Pernambuco. Também foram utilizados arquivos da Secretaria Estadual de Saúde do estado de Pernambuco, referentes ao empenho de compra do medicamento, relativos às medidas liminares. No período analisado foram encontrados 17 processos, dos quais, todos foram deferidos, por via judicial. Verificou-se que não houve a continuidade do tratamento em 100% destes, visto que os pacientes não conseguiram terminar o tratamento conforme estabelecido na prescrição médica. Com isso, o custo na compra do ipilimumabe foi menor do que o previsto nas medidas cautelares, uma vez que o medicamento não utilizado foi remanejado para outros pacientes que utilizaram também a via judicial. O Estado desembolsou com o ipilimumabe quase o mesmo valor de ressarcimento com os pacientes internados para o tratamento do melanoma maligno, embora o número de pacientes que foram internados foi 142x maior do que os que tiveram acesso ao ipilimumabe por via judicial, demonstrando um gasto desproporcional. A análise dos valores de ressarcimento em reais por meio das AIH demonstra um gasto de 1,26 vezes maior em relação aos pacientes que acessaram as vias judiciais. Ainda foi visto que em quase sua totalidade, os magistrados de Pernambuco não utilizaram nenhuma assessoria técnica, a fim de obter mais informações sobre o medicamento solicitado, tendo apenas como subsídio para as decisões a prescrição médica dos profissionais responsáveis pelo acompanhamento dos*

*requerentes das causas, e os artigos constitucionais e infraconstitucionais. Observou-se também que não houve reajuste na tabela dos valores de ressarcimento dos procedimentos realizados no período estudado, sendo verificado o menor valor pago para o procedimento cirúrgico realizado foi de R\$ 40,38. O estudo aponta a necessidade do envolvimento de várias categorias profissionais no processo da judicialização, esclarecendo aos magistrados se os tratamentos adotados são custo efetivos e, se de fato, as tecnologias judicializadas aumentam a sobrevida dos pacientes em relação às tecnologias preconizadas pelo SUS, pois além de comprometer os recursos orçamentários que são escassos, representam um impacto financeiro elevado. Ressalta-se também, que os recursos mobilizados são bastante superiores aos utilizados para um número pequeno de usuários de pacientes.*

## 1. INTRODUÇÃO

O número de casos novos de câncer de pele – Melanoma – estimados para o Brasil em 2016, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), é de 3000 em homens e 2670 em mulheres (INCA, 2015). Esses pacientes quando em estágio IV, ou seja, doença metastática, possuem um prognóstico ruim, cuja expectativa de vida média é de 11 a 12 meses e a sobrevida de 5 anos entre 5 a 15% (Kansaon *et al.*, 2014).

Nesse contexto, novos medicamentos estão sendo registrados na ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) para o tratamento do melanoma maligno, e a aprovação dessas novas drogas no mercado promove o aumento da pressão por parte dos pacientes e familiares, dos fabricantes e dos profissionais prescritores que são formadores de opinião. Porém, com custos cada vez maiores, torna-se inviável o acesso a essas novas tecnologias à maioria dos brasileiros. Assim, perante a impossibilidade de custear seu próprio tratamento, a sociedade civil recorre ao Judiciário em busca dos seus direitos estabelecidos na Carta Magna para a obtenção da saúde almejada.

O tratamento do melanoma maligno pode ser realizado por meio cirúrgico, como também pode ser feito, o tratamento clínico adjuvante (ANVISA, 2015) que consiste no (ANVISA, 2015) uso de medicamento oncológico e tem a função de retardar ou impedir a recorrência do tumor (Brasil, 2013a), sendo realizado após um tratamento principal (como cirurgia ou radioterapia).

A terapia adjuvante antineoplásica no SUS é registrada para fins de ressarcimento ao prestador como procedimentos de quimioterapia, não fazendo restrição a nenhuma classe farmacológica (ex: drogas citotóxicas, modificadores de resposta biológica, bloqueadores hormonais, imunobiológicos). O Ministério da Saúde e as Secretarias de Saúde não padronizam nem abastecem com medicamentos oncológicos os hospitais (exceto talidomida no tratamento mieloma múltiplo, imatinibe para o tratamento tumor do estroma gastrointestinal e para leucemia mieloide crônica, rituximabe para tratamento de linfoma, trastuzumabe no carcinoma de mama) (Gadelha *et al.*, 2015). O tratamento de escolha vai de acordo com a conduta do médico e/ou do protocolo seguido por cada hospital.

Logo, pacientes com melanoma maligno podem ser submetidos a um regime de quimioterapia,



que é o plano de tratamento para o câncer, de acordo com a conduta determinada pelo médico oncologista e/ou hospital. O tratamento quimioterápico por sua vez, pode ser ambulatorial, quando o paciente realiza na clínica de oncologia, ou em regime de internamento quando o paciente é hospitalizado durante os períodos de aplicação da medicação (De Vitta *et al.*, 2011 apud Hyeda, 2015).

Dentre os mais novos tratamentos registrados no país para melanoma maligno está o ipilimumabe. Trata-se de um anticorpo monoclonal indicado para o tratamento de melanoma metastático, sendo sua forma de administração a endovenosa, nas doses de 50mg (10ml) e 200mg (40ml). O Ministério da Saúde (MS), através da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS - CONITEC, por meio da portaria nº 357, de 8 de abril de 2013, aprovou as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Melanoma Maligno e não recomendou o uso do ipilimumabe. Segundo o relatório circunstanciado pela referida Comissão, não há evidência do claro benefício global em termos de sobrevida. Além disso, o MS também não recomenda o uso do ipilimumabe (anticorpo monoclonal anti-CTLA-4) para pacientes com melanoma disseminado, e quando houver mais evidências a serem analisadas, estes medicamentos deverão ser submetidos à CONITEC (BRASIL, 2013a).

Considerando que alguns medicamentos ou tratamentos não são disponibilizados pelo SUS, a judicialização surge no intuito de garantir o acesso à saúde dos usuários do sistema. Porém, vem se observando uma demanda crescente de causas impetradas contra o Estado sem que haja uma consultoria técnica para subsidiar os magistrados no processo de decisão.

Nesse sentido, é importante que nestes processos judiciais, não exista apenas a prescrição médica como instrumento de deliberação do magistrado. Embora na prática, observa-se que, a decisão por meio da antecipação de tutela é o mecanismo mais comum. É salutar acrescentar mais autores neste cenário, no caso, a administração pública e câmaras técnicas, que poderão fornecer informações ao magistrado sobre as tecnologias solicitadas e assim, a antecipação de tutela se dará de forma mais cautelosa. O juiz, diante de pareceres técnicos circunstanciados poderá apreciar se realmente a medicação ou tratamento irá melhorar a qualidade de vida do paciente e, até mesmo, se é indispensável à sua cura, ou ainda, se a tecnologia solicitada, de fato, produz resultados mais efetivos em relação aos tratamentos já fornecidos pelo SUS (Nero, 2010; Nunes, 2010; Yarshell, 2010).

*O objetivo deste estudo foi analisar os gastos com aquisição do medicamento ipilimumabe por meio das análises das ações judiciais e dos empenhos emitidos pela Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco em comparação aos valores de ressarcimento com internação dos pacientes com diagnóstico de melanoma maligno internados nos hospitais de Pernambuco, nos anos de 2013 a 2015.*

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo exploratório, retrospectivo e descritivo, sendo as fontes utilizadas foram os processos judiciais relacionados ao ipilimumabe, publicados no site do Tribunal de Justiça do Estado de Pernambuco e no site da Justiça Federal de Pernambuco. Também foram utilizados



arquivos da Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Pernambuco referentes aos empenhos de compra do medicamento com ipilimumabe por meio de medidas liminares por ano.

Para obtenção dos valores de ressarcimento das internações de pacientes com diagnóstico de melanoma maligno, utilizamos o Sistema de Informação Hospitalar (SIH) do Ministério da Saúde por meio da geração de relatórios dos espelhos das Autorizações de Internação Hospitalar (AIH), sendo selecionado o CID 43 (Classificação Internacional de Doenças do Melanoma Maligno).

Posteriormente ao levantamento das AIH, foram divididos e somados os grupos de procedimentos em cirúrgicos e clínicos (quimioterápicos), sendo realizado o cálculo do percentual de representação entre os referidos grupos.

Também foi realizada pesquisa no Sistema de Cadastro de Estabelecimentos de Saúde – SCNES para levantar os estabelecimentos habilitados como Unidades de Assistência de Alta Complexidade (UNACON) e Centros de Assistência de Alta Complexidade em Oncologia (CACON), de acordo com Política Nacional de Oncologia com vistas a verificar que tipos de Unidades de Saúde no Estado realizaram tratamento dos pacientes com melanoma maligno.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Das 17 unidades de saúde que realizaram procedimentos para tratamento de melanoma maligno, 15 foram Hospitais, 1 foi Pronto Socorro e 1 foi UPAE (Unidade Pernambucana de Atenção Especializada). Destas, sete estão habilitados como CACON ou UNACON. Destacam-se dois hospitais (Hospital da Restauração e Hospital Getúlio Vargas) que mais realizaram estes procedimentos (tratamento cirúrgico) e não estão habilitados como centros especializados. Significa dizer que as duas Unidades não recebem financiamento diferenciado conforme a Política Nacional de Atção Oncológica prevê.

No primeiro ano da análise(2013), o número de internações para quimioterapia contínua somaram 14, já o quantitativo de pacientes que conseguiu fornecimento do medicamento ipilimumabe foram 5. Destes, por motivos diversos, nem todos concluíram o tratamento, sendo direcionados os frascos ampolas do medicamento não usados para os outros pacientes, que entraram posteriormente com ação judicial. Sendo assim nesse ano, existiram apenas 3 empenhos de compra para 5 pacientes. O número de pacientes internados para procedimento de quimioterapia foi 2,8 vezes maior do que o número de pacientes no qual existiu a concessão de medida liminar. Embora, o custo para o Estado para atender todos os pacientes com melanoma nesse ano, com a aquisição do medicamento ipilimumabe foi 46,3 vezes maior em relação ao valor de ressarcimento com quimioterapia nos hospitais do Estado.

Em 2014, o número de pacientes internados para realização de quimioterapia no tratamento do melanoma maligno somou 22, já o número de pacientes que entrou na justiça para o fornecimento do medicamento foram 6, sendo emitidos 6 empenhos para a compra deste medicamento. O número de pacientes internados para procedimentos de quimioterapia foi 3,6 vezes maior do que o número de pacientes que tiveram a concessão de medida liminar, embora o custo para o Estado para atender os

pacientes que solicitaram o ipilimumabe por via judicial foi 75,6 vezes maior em relação ao valor de ressarcimento das AIH com quimioterapia nos hospitais do Estado.

Em 2015, o número de pacientes internados para realização de quimioterapia no tratamento do melanoma maligno totalizou 8, já o número de pacientes que entraram na justiça para o fornecimento do ipilimumabe totalizaram 6, sendo emitido a mesma quantidade de empenhos para a compra deste medicamento. O número de pacientes internados para procedimento de quimioterapia foi 1,3 vezes maior do que o número de pacientes que receberam a concessão de medida liminar para o medicamento, embora, o custo para o Estado nesse ano para adquirir o medicamento foi 42,3 vezes maior em relação ao valor de ressarcimento apresentado nas AIH com quimioterapia nos hospitais do Estado (tabela 1).

Tabela 1 – Dados de Internações para quimioterapia, concessão de medida cautelar, empenho emitido, custo total com quimioterapia, custo da aquisição do ipilimumabe nos anos da pesquisa.

Ano	2013	2014	2015
Internações para quimioterapia <sup>1</sup>	14	22	8
Concessão de medida cautelar <sup>2</sup>	5	6	6
Número de empenhos emitidos <sup>3</sup>	3	6	3
Gasto total de quimioterapia AIH <sup>1</sup>	R\$ 17.333,32	R\$ 25.764,14	R\$ 9.641,46
Custo da aquisição <sup>3</sup>	R\$ 808.897,82	R\$ 1.948.240,38	R\$ 407.485,24

Fonte: <sup>1</sup>SIH/DATASUS, <sup>2</sup> Site do Tribunal de Justiça Estadual e Federal, <sup>3</sup> Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco.

## 4 CONCLUSÃO

A saúde é uma condição essencial à dignidade da pessoa humana, cabendo assim, ao Estado, por meio de políticas públicas assegurá-la como direito fundamental. Porém, a crescente busca ao Judiciário como alternativa para a garantia dos direitos a saúde, ora negado pelo SUS, tem preocupado os gestores e juristas, pois as decisões judiciais sem considerar critérios técnicos podem conduzir ao desequilíbrio orçamentário, e, conseqüentemente, a sustentabilidade do Sistema de Saúde.



Nesse sentido, há a necessidade de adotar diretrizes clínicas e protocolos terapêuticos para subsidiar aos médicos quanto à efetividade de determinada tecnologia em saúde antes que estas sejam alvo de processos judiciais. Além disso, é conveniente ampliar a participação de diversas categorias profissionais da saúde na perspectiva de qualificar os pareceres técnico-científicos para demonstrar se um determinado medicamento ou tratamento aumenta a sobrevida dos pacientes em comparação aos tratamentos já existentes.

É relevante ponderar que a solicitação de pareceres aos núcleos consultivos (experts) pelos magistrados poderá ser inviabilizada dependendo da gravidade de determinado caso. Nesses casos, portanto, as decisões judiciais não poderão considerar as questões técnicas. O presente trabalho demonstrou que o gasto com o medicamento ipilimumabe é bastante superior aos valores de ressarcimento com as internações tratamento por meio do medicamento ipilimumabe para melanoma maligno não foi promissor em nenhum dos pacientes, já que houve óbitos e nem todos conseguiram concluir o tratamento.

Os resultados e os custos das ações judiciais na compra do medicamento ipilimumabe ratificam, portanto, a necessidade de adotar aspectos técnicos para permitir que as decisões sejam tomadas de forma mais coerente tanto para os usuários como para o próprio sistema. Por fim, uma questão importante se refere à reavaliação dos valores de ressarcimento da tabela do SUS para tratamento do melanoma maligno, pois estão bastante defasados o que pode comprometer a qualidade da assistência.

## 5. REFERÊNCIAS

- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para Desfecho para Estudos Clínicos de Medicamentos Oncológicos. Guia nº 3. versão 1. Out. 2015
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Portaria nº 357, 8 de abril de 2013. Saúde Legis – Sistema de Legislação da Saúde, 2013a.
- GADELHA, M. I. P. *et al.* Oncologia – desfechos e experiência da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde. Revista Eletrônica Gestão & Saúde. v. 6 (Supl. 4), p. 3194-12, Outubro, 2015.
- HYEDA, A. *et al.* Uma análise preliminar dos custos em quimioterapia ambulatorial no sistema de saúde suplementar. J Bras Econ Saúde, v. 7, n. 2, p. 99-109, 2015.
- KANSAON, M. J. M. *et al.* Tratamento Cirúrgico de Melanoma Metastático. In: WAINSTEIN, A.; BELFORT, F. (Orgs.). Melanoma Prevenção, Diagnóstico, Tratamento e Acompanhamento. São Paulo: Atheneu, 2014. 263p.
- NERO, D. C. R. *et al.* Medicina baseada em evidências como ferramenta para decisões judiciais. In: BLIACHERIENSE, A. C.; SANTOS, J. S. (orgs.). Direito à vida e à saúde: impacto judicial e orçamentário. São Paulo: Atlas, 2010.
- NUNES, A. A. Avaliação econômica de fármaco e outras tecnologias em saúde instrumentalizando o



poder público e judiciário para a tomada de decisão: potencialidades e limitações. In: BLIACHERIENSE, A. C.; SANTOS, J. S. (orgs.). *Direito à vida e à saúde: impacto judicial e orçamentário*. São Paulo: Atlas, 2010.

OLIVEIRA, R. G. *Judicialização do Direito à Saúde Pública do Município de Leopoldina - MG: um estudo de caso*. 2014. 156f. Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2014.

RIBEIRO, R. J. B.; CASTRO, R. G. O direito à saúde e o orçamento público: a busca de um equilíbrio estável. In: BLIACHERIENSE, A. C.; SANTOS, J. S. (orgs.). *Direito à vida e à saúde: impacto judicial e orçamentário*. São Paulo: Atlas, 2010.

YARSHELL, F. L. Antecipação da prova pericial médica sem requisito da urgência: análise à luz da regra do art. 434 do CPC. In: BLIACHERIENSE, A. C.; SANTOS, J. S. (orgs.). *Direito à vida e à saúde: impacto judicial e orçamentário*. São Paulo: Atlas, 2010.



ÁREA DE SUBMISSÃO: GESTÃO, ECONOMIA E SAÚDE - GE 18

## O SIOPS COMO FERRAMENTA DE APOIO À GESTÃO: O CONHECIMENTO DOS GESTORES MUNICIPAIS DE PERNAMBUCO

I. C. HENRIQUE<sup>1</sup>, A. F. B. BEZERRA<sup>2</sup> e I. M. C. de SOUSA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Secretaria Municipal de Saúde do Ipojuca - PE

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Medicina Social

<sup>3</sup> Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz – PE, Departamento de Saúde Coletiva

E-mail para contato: itamarhenri@gmail.com

**RESUMO** - *O Sistema de Informações Sobre Orçamentos Públicos em Saúde-Siops, ganhou mais importância a partir da Lei Complementar 141/2012 e da Portaria nº 53/2013 que estabeleceram novos prazos de alimentação e o bloqueio do repasse de recursos aos municípios inadimplentes. Este trabalho visa observar a adimplência e regularidade dos dados informados ao Siops no período de 2006 a 2013; traçar o perfil dos gestores municipais de saúde e avaliar como os gestores utilizam os dados gerados pelo Siops na gestão. A pesquisa configura-se como qualitativa, tendo caráter exploratório-descritivo. O estudo se deu em Pernambuco, onde foram entrevistados 24 secretários de saúde cujos municípios estavam entre os de maior e o de menor aplicação de recursos próprios per capita na saúde. Nos resultados observou-se uma redução na inadimplência da sua alimentação do Siops logo após as mudanças na legislação que o rege. Sobre os conhecimentos dos gestores sobre o Siops, 67% afirmaram conhecer o Siops, enquanto 33% disseram conhecê-lo pouco. Verificou-se também que em 63% dos municípios a alimentação do Siops é feita por terceiros, fora da secretaria de saúde. Esse estudo permite afirmar que o Siops facilita o acesso aos dados da aplicação de recursos em saúde dos entes federados e favorece o controle social, bem como que a mudança na legislação deu novo fôlego ao sistema, porém o mesmo não é conhecido como deveria pelos gestores, tampouco tem o seu potencial de apoio à gestão utilizado.*

*Palavras Chave: Sistemas de Informação, Orçamentos, Gestão em Saúde*

**ABSTRACT** - *The System Information Public Budgets in Health-Siops, gained more importance from the Complementary Law 141/2012 and Decree No. 53/2013 which established new supply periods and blocking the transfer of funds to non-performing municipalities. This work aims to observe the compliance and regularity of the data reported to Siops the 2006-2013 period; profile the local health managers and assess how managers use the data generated by Siops*



*management. The research appears as qualitative, with exploratory and descriptive. The study took place in Pernambuco, where they were interviewed 24 health secretaries whose municipalities were among the highest and the lowest application of own resources per capita on health. Results show a reduction in default of its power from Siops after the changes in the legislation governing it. On the knowledge of managers on the Siops, 67% said they knew the Siops, while 33% said they know him slightly. It was also found that in 63% of municipalities the power of Siops is done by third parties outside the health department. This study allows us to affirm that the Siops facilitates access to the application of health resources data of federal entities and favors social control, as well as the change in legislation gave new impetus to the system, but it is not known as it should by managers nor has its potential to support the management used.*

*Keywords: Information Systems, Budgets, Health Management*

## 1. INTRODUÇÃO

Desde quando a saúde foi descrita na Constituição Federal como um direito de todos e um dever do estado e seus dispositivos legais por ocasião da promulgação da Lei nº 8.080/90, as questões relacionadas ao custeio, financiamento e modelos de atenção estiveram sempre presentes, e vêm fazendo parte das agendas de pesquisa sobre o SUS com a mesma frequência daquelas temáticas voltadas à avaliação dos princípios doutrinários e operativos que fundamentam o sistema (Santo; Tanaka, 2011).

Como se sabe, a questão do subfinanciamento do SUS se constitui como um dos principais desafios a ser enfrentado no sentido da sua consolidação e da garantia dos princípios da universalidade, integralidade e igualdade. Entretanto, o patamar dos atuais gastos públicos não vem possibilitando a “superação dos vazios e das desigualdades regionais e setoriais que ainda caracterizam o acesso e a utilização de serviços produzidos pelo sistema” (Dain, 2007).

Os passos que foram sendo dados no sentido da regulamentação das transferências financeiras do SUS, demandaram a criação de um sistema de informação que possibilitasse a coleta, processamento e divulgação de dados sobre a receita e despesa com saúde nos três níveis de gestão. Essas informações constituem-se enquanto uma importante ferramenta para o processo de construção e a avaliação de desempenho do sistema e fornecem subsídios para o aprimoramento da gestão, da disseminação de experiências bem-sucedidas e da adequada aplicação dos recursos, de acordo com a rede de assistência e necessidade local (Teixeira e Teixeira, 2003).

Nesse sentido, o Sistema de Informações sobre Orçamentos Públicos em Saúde - Siops consolidou-se como dispositivo essencial para o controle e planejamento da aplicação de recursos na saúde. O Siops foi criado a partir da iniciativa do Conselho Nacional de Saúde – CNS e da



Procuradoria Geral da República, na década de 1990, no contexto de grande redução da aplicação dos recursos do recém criado SUS (Marques e Mendes, 2009).

Anos mais tarde, os dados do Siops subsidiaram estudos que orientaram o estabelecimento da vinculação de recursos à saúde, por meio da EC-29 - Emenda Constitucional nº 29/2000, que definiu percentuais mínimos de alocação de recursos nas três esferas administrativas, sendo 12% para estados 15% para os municípios, a partir de 2004. No caso da União, o percentual inicial foi de 5% com base no orçamento federal empenhado no ano anterior e nos anos seguintes, o valor seria corrigido pela variação do Produto Interno Bruto - PIB nominal do país. Havendo retração do PIB o valor não sofre redução, sendo mantido o montante aplicado no ano anterior (Brasil, 2000).

De 2002 em diante, o Siops passou a ser o instrumento gerador do Demonstrativo da Receita Líquida de Impostos e das Despesas Próprias com Ações e Serviços de Públicos de Saúde dos Estados, Municípios e Distrito Federal, previsto na Lei de Responsabilidade Fiscal – LRF (Brasil, 2000; 2010b). Um dos avanços mais importantes ocorreu da vigência de 2013 em diante, quando o registro dos dados sobre as despesas com saúde tornou-se obrigatório por meio da Lei Complementar nº 141/2012, a qual regulamenta a EC 29 (Santos, 2012) e define as normas de fiscalização, avaliação e controle das despesas com saúde, inclusive com um módulo específico para acompanhamento pelos Tribunais de Contas em cada uma das instâncias governamentais.

A portaria 53/2013, complementa o novo arcabouço legal de alimentação do Siops, ao estabelecer o prazo para declaração, homologação e transmissão dos dados em até trinta dias após o encerramento de cada bimestre, e não mais a cada semestre como era anteriormente (Brasil, 2013). Importa esclarecer que os dispositivos legais de obrigatoriedade da alimentação do Siops visam garantir a adimplência e regularidade na alimentação dos seus dados, na medida em que estudos nacionais já apontavam para essa necessidade. Em Pernambuco, no ano de 2006, cerca de 32,9% dos municípios apresentavam pendências na alimentação do Siops, enquanto apenas 3,8% haviam cumprido o prazo de envio dos dados (Bezerra *et al.*, 2011).

De acordo com dados levantados em outubro de 2010, as informações do Siops referentes à 2009 revelam que dos 5570 municípios do Brasil, 119 deles ainda não tinham alimentado seus dados na segunda vigência do sistema. No caso dos Estados da federação, 2 deles ainda não tinham alimentado o Siops de 2008 e o de 2009, situação que impediu que fosse verificado o cumprimento das obrigações de gastos com saúde desses estados e municípios Vieira e Zucchi (2013). Considerando a importância que esse sistema representa para a saúde, Santo, Fernando e Bezerra (2012), reforçam a ideia de que os gestores deveriam utilizá-lo nas suas práticas de planejamento, gestão e avaliação, uma vez que o Siops é uma opção ágil, segura e de custo operacional baixo.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**



O presente artigo apresenta um caráter exploratório-descritivo devido a sua natureza de sondagem, que utilizou-se de abordagem qualitativa. Inicialmente, foi realizado levantamento de dados na base do Siops de todos os municípios de Pernambuco, na intenção de classificar e identificar municípios e seus respectivos gestores de saúde para a abordagem qualitativa, na qual foi utilizado um formulário de entrevistas semiestruturado.

A análise da base do Siops de todos os municípios de Pernambuco, permitiu classificá-los de acordo com o valor de recursos próprios em reais gastos per capita/ano em saúde. Assim, o primeiro critério de inclusão da amostra foi identificar 2 municípios em cada uma das 12 Gerências Regionais de Saúde; selecionando o de maior e o de menor gasto com recursos próprios em saúde, totalizando uma amostra de 24 municípios. Essa seleção (média dos anos de 2006 a 2012), teve o intuito de evitar a concentração na amostra de municípios em uma mesma região, considerando que o levantamento inicial evidenciou uma clara concentração de municípios de maior investimento na Região Metropolitana do Recife.

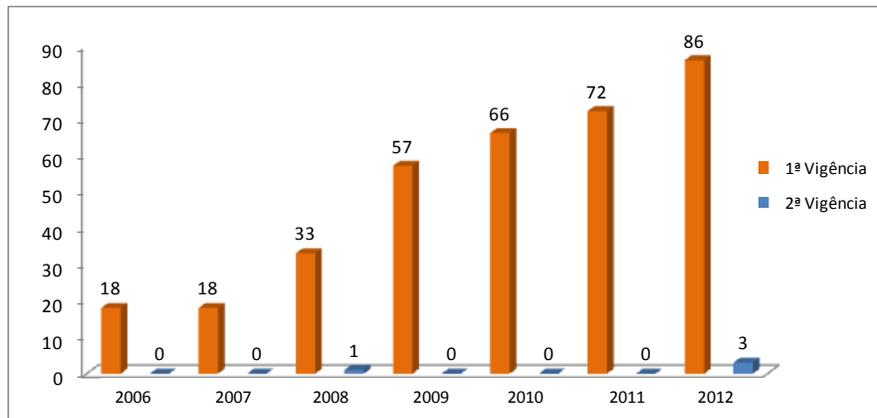
O segundo critério de inclusão na amostra consistiu na exigência de que os secretários municipais estivessem ocupando o cargo de gestor municipal de saúde há pelo menos um ano, contado a partir de janeiro/2013. Essa exigência visava identificar como os gestores utilizavam as informações do Siops nas suas atividades de gestão, bem como suas percepções no tocante às mudanças ocorridas na legislação, na competência 2013.

A coleta de dados foi feita através de entrevistas realizadas presencialmente, por meio de formulário semiestruturado, contendo 23 questões sobre o perfil dos entrevistados, formação acadêmica, experiência profissional e conhecimentos sobre a área financeira e contábil do SUS relacionadas ao Siops. As entrevistas ocorreram em visitas aos municípios ou nas reuniões ordinárias do Colegiado dos Secretários Municipais de Saúde - COSEMS-PE.

As respostas foram agrupadas em categorias a partir das falas dos entrevistados e analisadas por meio da técnica de análise de conteúdo, sendo esse um procedimento clássico empregado para trabalhar conteúdos textuais (FLICK, 2004). A análise de conteúdo categorial se dá por meio de operações de desmembramento do texto em unidades, em categorias, segundo agrupamentos analógicos, e se configura como um processo estruturalista que classifica os elementos a partir de suas similaridades Segundo Kurtz (2005). A palavra “categoria” pode ser compreendida como um conceito que abrange elementos ou aspectos com características comuns ou que se relacionam entre si. Fazer uso de categorias significa agrupar elementos, ideias ou expressões em torno de conceitos capazes de agregá-los (MINAYO, 2002).

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Observando os dados do Siops dos municípios de Pernambuco no período de 2006 a 2012, foi possível verificar que havia vários municípios inadimplentes com a alimentação dessas informações na base do sistema (Gráfico 1). O prazo de envio das informações ao Siops é de até 30 dias corridos após o final da vigência (seja semestre ou anual).



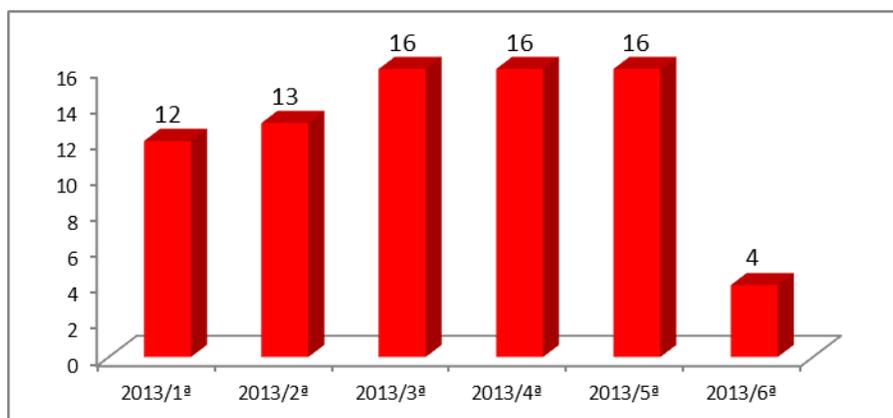
Fonte: Siops

Gráfico 1 - Total de municípios inadimplentes de 2006 a 2012 (1ª e 2ª vigência semestral).

É importante ressaltar que na data deste acesso (05/06/2014), 86 municípios não tinham enviado as informações referentes à 1ª vigência de 2012. Esse número representava 46,7% do total de 184 municípios do estado com pendência em 2012

Os bloqueios de transferências de recursos financeiros passaram a ser automáticos, a partir da comunicação do Siops com o Ministério da Fazenda, Tribunais de Contas e Instituições Financeiras Federais responsáveis pelo repasse dos recursos. Os mesmos são bloqueados tão logo sejam informados conforme dispõem o Decreto 7827/2012 (BRASIL, 2012b) e a Portaria n ° 53/2013 (BRASIL, 2013), a qual determina a todos os entes federados, atualizarem os dados no Siops. A partir desta vigência, os governos estaduais e municipais que não preencherem os dados terão as transferências constitucionais condicionadas, como o Fundo de Participação dos Municípios (FPM) e Fundo de Participação dos Estados (FPE). Além da suspensão das transferências voluntárias dos recursos da União, como a celebração de convênios e contratos (BRASIL, 2013).

A regulamentação da obrigatoriedade de alimentação do Siops e o estabelecimento de punições aos inadimplentes sinalizam melhoras nessa alimentação dos dados do Siops, pois no gráfico 2 observa-se melhoria no que se refere à assiduidade na alimentação do Siops, por parte dos municípios de Pernambuco.



Fonte: Siops

Gráfico 2 - Total de municípios (PE) inadimplentes em 2013 (vigência bimestral)

Em se tratando da 6ª e última vigência do exercício 2013, vê-se que somente 4 municípios ainda não tinham enviado os seus dados finais do orçamento, o que equivale a 2,2% de um total de 184 municípios no estado.

A respeito do perfil dos gestores, dentre os 24 entrevistados, 70,8% eram mulheres, com idade média de 45 anos, e os 29,2% restantes do sexo masculino, com média de idade de 50 anos. Quanto à escolaridade, observou-se que apenas um não tinha formação superior, enquanto, mais da metade dos gestores (58,3%) havia concluído especialização e 8,3% estavam cursando. Com mestrado concluído eram 16,7% e 4,2% estavam cursando. Em relação à participação em algum curso na área de gestão financeira/contábil do SUS, apenas 29% gestores participaram. O tempo médio de atuação na saúde pública desses gestores é de 16 anos, sendo que o gestor mais experiente já atuava na área há 41 anos, enquanto o gestor com menos tempo de atuação em saúde pública estava completando um ano e meio na área na época de realização da entrevista, tendo sido o cargo de secretário a sua primeira função na saúde.

Outra questão relevante abordada nesse estudo, foi sobre o conhecimento dos entrevistados a respeito do Siops e suas funcionalidades. Os gestores foram abordados sobre como avaliavam o seu conhecimento acerca do Siops, e de qual a sua percepção sobre suas potencialidades de uso desse sistema de informação enquanto ferramenta de apoio à gestão. Para essa questão, todos os entrevistados afirmaram conhecer o Siops. Onde 21% disseram conhecê-lo Muito Bem, 8% afirmaram conhecer Bem, 38% disseram conhecer Razoavelmente e outros 33% disseram que conheciam Pouco a ferramenta. Nenhum dos 24 entrevistados disse que Não Conhecia o sistema.

Os secretários também foram perguntados sobre qual a importância do Siops para a Gestão em Saúde de acordo com suas próprias percepções. O conjunto das respostas foi organizado em categorias, no sentido de dar corpo ao conjunto de ideias centrais existentes nas opiniões e percepções dos entrevistados conforme apresenta a tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição percentual das respostas dos gestores municipais sobre a Importância do Siops para a Gestão em Saúde – Pernambuco, 2013

Nº	Categorias	%
1	Ferramenta importante de gestão, monitoramento e avaliação dos gastos com saúde	48%
2	Permite conhecer o orçamento do município	9%
3	Possibilita planejamento do orçamento e transparência na aplicação dos recursos	26%
4	Alimentado apenas por obrigatoriedade legal	13%
5	Considera o Siops sem relevância e que contribui pouco para a gestão	4%

Dentre as respostas dadas, é importante destacar que 48% dos gestores consideram o Siops uma Ferramenta importante de Gestão, Monitoramento e Avaliação dos Gastos em Saúde.

As duas últimas categorias de respostas, denotam que alguns gestores parecem não conhecer o Siops, contradizendo o resultado da primeira pergunta feita aos gestores, pois não houve nenhuma resposta de desconhecimento do sistema, ou seja, essas interpretações, não seriam esperadas de gestores que afirmaram ter algum conhecimento sobre o Siops. Branco (2001) chama a atenção para a importância de que o conhecimento é construído a partir do acúmulo e atualização permanente de informações, pela consolidação e confrontação de antigas e novas informações. Campos (2007) destaca que os trabalhadores e a sociedade parecem não ter muita facilidade em fazer uso desse direito/dever, mesmo com os Conselhos de Saúde, por meio de suas Conferências, tentarem ampliar a participação das pessoas na consolidação da implementação do SUS.

Uma das questões abertas da entrevista perguntava aos gestores qual é a periodicidade de alimentação dos dados no sistema. Chamou atenção o fato de que apenas 37% dos gestores responderam corretamente, que a alimentação é bimestral. Vale ressaltar que essa foi uma das principais mudanças ocorridas na vigência do ano de 2013, deixando de ser semestral como era antes. Nessa pergunta, 73% erraram ou não souberam responder.

Sobre o uso e utilidade do Siops enquanto instrumento de apoio à gestão, 66,7% dos gestores disseram que sim, confirmando que se utilizavam dele nas suas atividades de gestão. Os demais 33,3% responderam que não utilizam o Siops para este fim. Dentre esses que disseram não utilizar o Siops estavam alguns que afirmaram que eles próprios não sabiam como utilizar esses dados, devido ao fato as atividades relacionadas ao Siops, ficavam sob responsabilidade de uma empresa terceirizada.

A exemplo disso está a elaboração da Lei Orçamentária Anual – LOA, em 15 municípios (63%) essa atividade é feita por empresas de contabilidade terceirizadas, sendo que em 7 destes



municípios a SMS acompanha esse processo. Em 2 municípios essa tarefa fica a cargo da Secretaria de Finanças com o acompanhamento da SMS, em outro município quem prepara a LOA é a Secretaria de Administração e por fim, um dos gestores não soube responder quem seria o responsável por essa atividade.

#### **4. CONCLUSÃO**

Foi possível delinear o perfil dos gestores municipais do SUS e constatar que muitos deles não percebem claramente a importância do sistema responsável por controlar, monitorar e avaliar a aplicação de recursos financeiros em saúde. Existe uma distância entre quem opera o Siops e quem responde legalmente por ele.

O pouco domínio sobre o sistema e suas regras de alimentação de dados, considerando que a inadimplência pode gerar sanções financeiras, denota a fragilidade no que diz respeito à gestão desses recursos. O desconhecimento dessa ferramenta pode gerar graves consequências à gestão na medida em que não se pode usar bem, o que não se conhece bem.

Ficou evidente a relevância do Siops na publicidade dos dados referentes à aplicação de recursos em saúde dos entes federados, favorecendo o controle social, em direção a consolidação do SUS.

Por outro lado, apesar da importância do Siops, ele não é conhecido como deveria, pelos gestores, tampouco tem o seu potencial de apoio à gestão bem utilizado. A mudança na legislação que regulamenta a sua alimentação deu novo fôlego ao sistema, contudo ainda se faz necessário trilhar novos caminhos e traçar estratégias que diminuam a distância que existe entre muitos gestores e esse sistema.

#### **5. REFERÊNCIAS**

- BEZERRA, AFB; SANTO, ACGE; SOUSA, IMC; GONÇALVES, RF; DUARTE-NETO, P. Avaliação da regularidade na alimentação do Sistema de Informações sobre Orçamentos Públicos em Saúde em municípios de Pernambuco, 2000 a 2006. In: Gadelha, CAG; Viana, ALA; Koury, CNS; Silva, FT; Silva, EMT. (Org.). Avaliação de tecnologias em saúde: seleção de estudos apoiados pelo Decit. Brasília: Ministério da Saúde, 2011, v., p. 29-29
- BRANCO, MAF. Informação em saúde. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2001.
- BRASIL. Emenda Constitucional nº 29 de 13 de setembro de 2000: Altera os arts. 34, 35, 156, 160, 167 e 198 da Constituição Federal Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Poder Executivo. Brasília, 2000.
- BRASIL. Lei Complementar nº 141 de 13 de janeiro de 2012: regulamentação do § 3º do art. 198 da Constituição Federal. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Poder Executivo. Brasília, 2012<sup>a</sup>



- BRASIL. Decreto nº 7.827 de 16 de outubro de 2012: Regulamenta os procedimentos de condicionamento e restabelecimento das transferências de recursos provenientes das receitas. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Poder Executivo. Brasília, 2012b
- BRASIL. Portaria GM/MS nº 53 de 16 de janeiro de 2013: dispõe sobre as diretrizes para o funcionamento do Sistema de Informações sobre Orçamentos Públicos em Saúde. Diário oficial da República Federativa do Brasil. Poder Executivo. Brasília, 2013
- CAMPOS, GWS. O SUS entre a tradição dos Sistemas Nacionais e o modo liberal-privado para organizar o cuidado à saúde. *Ciência & Saúde Coletiva*, 12(Sup):1865-1874, 2007
- FLICK, U. Uma introdução à pesquisa qualitativa. Porto Alegre: Bookman; 2004.
- KURTZ, RGM. Relacionamentos interpessoais e aprendizagem organizacional na economia de comunhão: o caso FEMAQ. 2005. Dissertação (Mestrado em Administração de Empresas) - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005
- MARQUES, R M; MENDES, Á. O financiamento do SUS sob os “ventos” da financeirização. *Ciência & Saúde Coletiva*, 14(3):841-850, 2009
- MINAYO, MCS. Pesquisa social: teoria, método e criatividade. Petrópolis: Vozes, 2002.
- SANTO, A.C.G.E.; TANAKA, O. Y. Financiamento, gasto e oferta de serviços de saúde em grandes centros urbanos do estado de São Paulo (Brasil). *Rev. Ciência e Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro, v. 16, n. 3, p. 1875-1885, 2011.
- SANTO, A.C.G.E.; FERNANDO, V.C.N.; BEZERRA, A.F.B. Despesa pública municipal com saúde em Pernambuco, Brasil, de 2000 a 2007. *Rev. Ciência e Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro, v. 17, n. 4, p. 861-871, 2012.
- SANTOS, L. Lei Complementar 141/2012: novo marco das transferências interfederativas no SUS. BVS - Biblioteca Virtual em Saúde, São Paulo, SP, 12 mar. 2012.
- TEIXEIRA, HV; TEIXEIRA, MG. **Financiamento da Saúde Pública no Brasil: a experiência do Siops.** *Ciência & Saúde Coletiva*, v.8, Rio de Janeiro p.379-391, 2003.



ÁREA DE SUBMISSÃO: GESTÃO, ECONOMIA E SAÚDE- GE 19

## ANÁLISE DO DESEMPENHO ECONÔMICO-FINANCEIRO DOS HOSPITAIS DE PEQUENO PORTE NO ESTADO DE PERNAMBUCO ENTRE OS ANOS DE 2009 A 2015.

D. K. FEITOSA<sup>1</sup>, R. S. LEMOS<sup>2</sup>, A.F. B BEZERRA<sup>3</sup>, E.R.R. SANTOS<sup>1</sup> e L.SOUZA NETO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Graduação de Saúde Coletiva.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-graduação de Inovação Terapêutica.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Medicina Social.

kellydaize@hotmail.com

*RESUMO – Este artigo apresenta os resultados de uma pesquisa que visou desenvolver uma análise do desempenho econômico-financeiro das Unidades Hospitalares habilitadas na Política Nacional de Hospitais de Pequeno Porte (HPP) no estado de Pernambuco, no período de 2009 a 2015. Na perspectiva de discutir as implicações dos resultados para a sustentabilidade financeira dos HPP apontando possíveis alternativas. Os dados foram obtidos de 59 hospitais de Pequeno Porte registrados no Sistema de Cadastro Nacional dos Estabelecimentos de Saúde (CNES), por meio do Sistema de Controle de Limite Financeiro da Média e Alta Complexidade (SISMAC) e dos Sistemas de Informação Hospitalar e Ambulatorial (SIH e SIA). Esses dados foram analisados através do Índice de Preço do Consumidor Ampliado (IPCA). A análise apontou uma perda importante na capacidade financeira dos hospitais estudados e diferenças importantes entre os valores das receitas e o desempenho ao longo dos anos, remetendo a necessidade de recomendar possíveis estratégias de redirecionamento dos recursos ou a mudança no perfil assistencial dessas Unidades e analisar a viabilidade da política HPP.*

*Palavras-chave: Hospital de pequeno porte; desempenho; econômico-financeiro.*

*ABSTRACT – This article presents the results of a research aimed to develop an analysis of the financial performance of hospitals that enabled small hospitals Porte (HPP) in the state of Pernambuco in the period 2009-2015. In order to discuss the implications of the results for the financial sustainability of the units, indicating possible alternatives. The survey data were obtained from a sample of 59 small hospitals registered in the National Health Establishments Registration System (CNES), through the System Financial Limits of Control Medium and High Complexity*



*(SISMAC) and Information Systems Hospital and ambulatory (SIA and SIH). These secondary data were analyzed by the Consumer Price Index (IPCA). Data analysis showed a significant loss of financial capacity of the studied hospitals and significant differences between the reported amounts of revenues and performance over the years. Showing the need to point out possible strategies redirection of resources or change the service profile of these units and analyze the feasibility of HPP policy.*

*Keywords: small hospital; performance; economic and financial.*

## 1 INTRODUÇÃO

Apesar dos valores gastos serem expressivos em atividades de atendimento hospitalar no Brasil, parecem não se refletir em melhores resultados para a saúde da população em comparação com outros países com gastos semelhantes, ou mesmo, inferiores (Veillard. J E Cols, 2005).

Nesse sentido, a política Nacional de Hospitais de Pequeno Porte (HPP), instituída pela portaria GM/MS nº 1.044 de 01/06/2004, surgiu como estratégia para aprimorar e redefinir o papel assistencial das Unidades Hospitalares de pequeno porte com vistas ao fortalecimento e aprimoramento do Sistema Único de Saúde (Ministério da Saúde, 2005).

No que se refere ao processo de adesão das unidades hospitalares política de HPP, foram definidos os seguintes requisitos básicos: ser de esfera administrativa pública ou privada sem fins lucrativos e estarem em municípios ou microrregiões com até 30 mil habitantes, onde as mesmas instituições hospitalares possuam entre 5 e 30 leitos cadastrados no Cadastro Nacional de Estabelecimentos de Saúde (CNES) e estar localizado em municípios que apresentam cobertura da Estratégia de Saúde da Família igual ou superior a 70% (Ministério da Saúde, 2005).

A portaria ratifica também que a oferta quantitativa de leitos dos Hospitais de Pequeno Porte deve ser ajustada tomando como parâmetro a necessidade de internações de baixa e média complexidade, estimada em 5% da população da área de abrangência no ano; taxa de ocupação de 80%; e média de permanência de 4 dias (Brasil, 2004).

Quanto ao financiamento determina que a alocação de recursos de custeio aos estabelecimentos de saúde deve atender aos critérios mencionados acima e o orçamento global correspondente ao custeio dos hospitais de pequeno porte se refere aos repasses de forma automática do Fundo Nacional de Saúde e dos respectivos fundos Estaduais e Municipais, seguindo as normas finalísticas desse processo de repasse (Brasil, 2004).

Considerando a proposta da Política dos Hospitais de Pequeno Porte, surgiu à necessidade de analisar a capacidade dos incentivos previstos pela política de promovendo melhor desempenho financeiro e o impacto do Índice de Preço do Consumidor Ampliado (IPCA)

sobre as Unidades Hospitalares habilitadas em Pernambuco.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

O estudo classifica-se como descritivo, uma vez que busca analisar o desempenho por meio de indicadores financeiros e descrever a situação dos hospitais de Pequeno de Pequeno Porte do Estado de Pernambuco, no período de 2009 a 2015. A pesquisa descritiva observa, registra, analisa, e correlaciona fatos e fenômenos sem a interferência do pesquisador, buscando descrevê-los, classificá-los e interpretá-los (Rampazzo, 2005).

Quanto ao enfoque da pesquisa, esta se caracteriza como quantitativa, pois, se valeu de testes estatísticos e da manipulação numérica dos dados (Malhotra, 2001). Trata-se de um estudo que teve por base dados secundários, no qual coletados para testar hipóteses, por meio da medição numérica e pela análise estatística, buscando identificar padrões de comportamento (Sampieri, Collado E Lucio, 2006), O universo do estudo foi composto pelos estabelecimentos que estão habilitados a Política HPP, totalizando 59 hospitais municipais, somando 876 leitos, com média de 14 leitos por estabelecimento, distribuídos em 12 Regiões de Saúde.

As informações referentes a descrição geral dos hospitais, foram coletadas por meio do (CNES), no ano de 2016. Para o levantamento dos repasses financeiros foi utilizado os dados dos sistemas do Ministério da Saúde e da Secretaria Estadual.

No caso dos recursos da União obtivemos do Sistema de Controle de Limite Financeiro da Média e Alta Complexidade (SISMAC-MS-DATASUS) através do teto financeiro anual estabelecido para cada ente, sendo selecionada a portaria que estabelece a habilitação da política de HPP e o valor do incentivo. Em relação aos recursos repassados pela Secretaria Estadual de Saúde, foi obtido pela Portaria Estadual nº 023 de 17 de Janeiro de 2014, publicada no Diário Oficial do Estado de Pernambuco. As informações coletadas nos sistemas de informações se encontram sistematizadas na Tabela 01.

Os dados da produção da assistência ambulatorial e hospitalar foram obtidos a partir dos Sistemas de Informação Hospitalar e Ambulatorial (SIA e SIH), do Departamento de Informação e Informática do SUS (DATASUS), onde foram selecionados os valores em R\$ aprovados de cada Unidade Hospitalar.

Os valores das produções e das receitas provenientes do Ministério da Saúde e Secretaria Estadual de Saúde foram deflacionados através do Índice de Preço do Consumidor Ampliado (IPCA), obtido no site do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (Tabela 01).

O IPCA mede a variação do custo de vida das famílias com chefes assalariados e com rendimento mensal compreendido entre 1 e 40 salários mínimos mensais. Esta faixa salarial representa 90% das famílias pertencentes às áreas urbanas de cobertura do Sistema Nacional de

Índices de Preços ao Consumidor - SNIPC e tem como objetivo medir a inflação de um conjunto de produtos e serviços comercializados no varejo.

Tabela 01 - Índice de Preço do Consumidor Amplo acumulado: 2009 a 2015

ANO	IPCA ACUMULADO
2009	4,31
2010	5,91
2011	6,5
2012	5,84
2013	5,91
2014	6,41
2015	10,67

Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE

O cálculo de deflacionamento dos valores foi obtido por meio da seguinte fórmula:

$$\text{VALOR DEFLACIONADO} = \text{VALOR ANO}_x * (\text{IPCA 2009}/\text{IPCA}_x)$$

Onde:

VALOR ANO x = valores repassados pelo MS e SES-PE (2009 a 2015)

IPCA 2009 = índice do ano base para o cálculo

IPCA\_x = índices dos anos analisados

A estatística descritiva foi utilizada para calcular medidas que descrevem os dados por meio da distribuição de frequência e percentuais de representação destas. Por fim, os dados coletados foram transferidos para uma planilha em Excel 2010, onde foram, então, tabulados e transformados em gráficos.

Como os dados foram provenientes de base de dados secundários de domínio público, a pesquisa dispensa aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos, considerando a Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde.

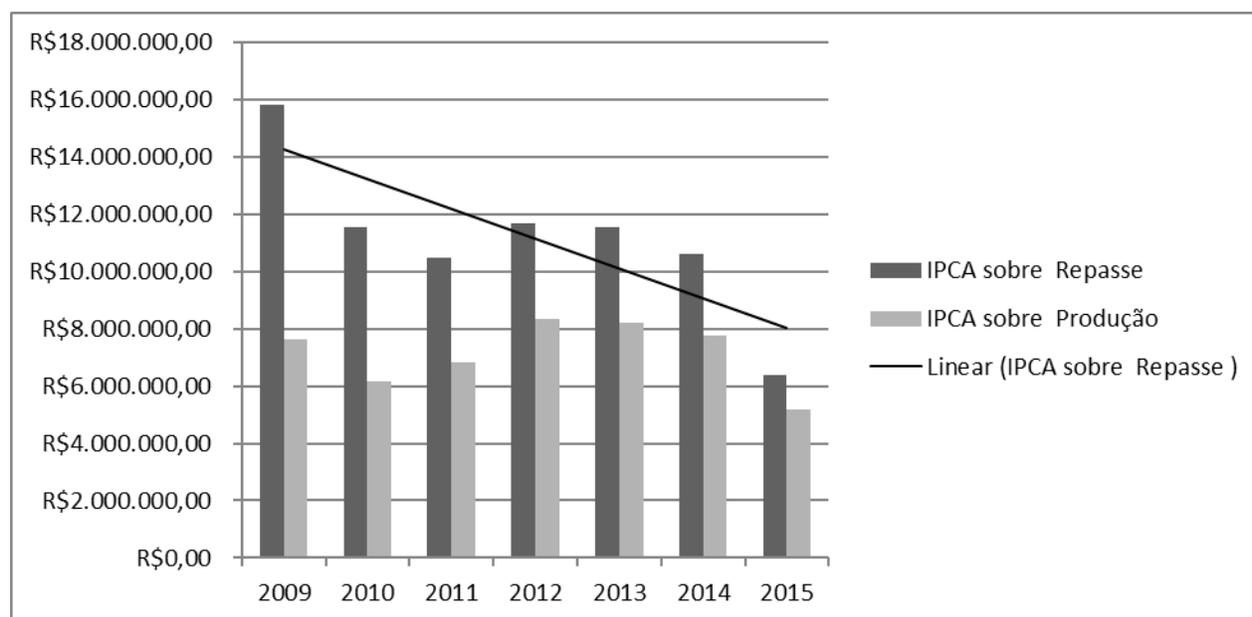
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gráfico 01 apresenta o impacto da inflação sobre os recursos financeiros das Unidades Hospitalares habilitadas na Política Nacional de Hospitais de Pequeno Porte (HPP), no estado de Pernambuco, no período de 2009 a 2015. Dessa forma, é possível inferir sobre algumas tendências ao longo da crescente inflação dos anos analisados. O valor do repasse da receita total anual foi de R\$ 15.819.035,88 em todos os anos analisados, indicando que não houve reajuste.

O valor do repasse no período total foi de R\$ 110.733.251,16, mas, considerando a inflação passou a ser de R\$ 78.082.106,61, totalizando uma diferença de R\$ 32.651.144,55, que representa 70,51% do valor inicial, ou seja, menor capacidade de adquirir insumos e custear as despesas das Unidades Hospitalares. Destaca-se o ano de 2014, onde ocorreu a inflação mais alta em relação aos outros anos, com o IPCA de 10,61 resultando em uma diferença de R\$ 9.429.153,53 sobre o repasse total de R\$ 15.819.035,88, o que corresponde a uma queda real de receita 40,39% sobre o valor total, tendo uma queda de aproximadamente 60% do poder de compra.

O gráfico 01 demonstra o declínio dos valores das receitas ao longo dos anos quando se observar na linha de tendência, ao mesmo tempo verifica-se um aumento na produção financeira.

Gráfico 01 - Impacto do IPCA sobre os recursos financeiros das Unidades Hospitalares habilitadas na Política Nacional de Hospitais de Pequeno Porte (HPP). Pernambuco, 2009 a 2015.



Fonte: SISMAC + Portaria n. 023, SIA e SIH/DATASUS. Período: 2009 a 2015.

A tabela 01 destaca o desempenho financeiro das Unidades Hospitalares habilitadas na Política de HPP, indicando diferenças entre os valores das receitas e o desempenho ao longo dos anos analisados.

A taxa de produção média total dos estabelecimentos foi de 64,20%, em relação ao valor total de repasse segundo os valores deflacionados. O resultado encontrado demonstra que o desempenho financeiro foi influenciado pela inflação uma vez que a medida que as receitas caíram a produção financeira caiu proporcionalmente aos recursos aportados. Apesar disso, o desempenho ficou entre, aproximadamente, 48% e 81% ao se realizar a análise anualmente. Em todo período observa-se uma queda de desempenho em cerca de 30%. A participação dos entes municipais no financiamento provavelmente foi o que impediu a queda de produtividade.

Tabela 01 – Desempenho Financeiro das Unidades Hospitalares habilitadas na Política Nacional de Hospitais de Pequeno Porte (HPP). Pernambuco, 2009 a 2015.

Ano	Valor total (Tesouro + MS/SUS) *	Total Produzido (SIA + SIH) *	Diferença entre Receita total - total Produzido*	% Desempenho*
2009	R\$ 15.819.035,88	R\$ 7.627.026,49	R\$ 8.192.009,39	48,21
2010	R\$ 11.536.386,57	R\$ 6.160.324,36	R\$ 5.376.062,21	53,40
2011	R\$ 10.489.237,64	R\$ 6.816.023,81	R\$ 3.673.213,83	64,98
2012	R\$ 11.674.665,18	R\$ 8.362.633,68	R\$ 3.312.031,50	71,63
2013	R\$ 11.536.386,57	R\$ 8.197.836,81	R\$ 3.338.549,76	71,06
2014	R\$ 10.636.512,42	R\$ 7.773.417,68	R\$ 2.863.094,74	73,08
2015	/R\$ 6.389.882,35	R\$ 5.191.277,05	R\$ 1.198.605,30	81,24
Total	R\$ 78.082.106,61	R\$ 50.128.539,87	R\$ 27.953.566,74	64,20

Fonte: SISMAC + Portaria nº 023, SIA e SIH/DATASUS. Período: 2009 a 2015.

\*Valores Deflacionados

É importante ressaltar que os resultados encontrados traduzem-se em menor quantidade de assistência ofertada, uma vez que o volume financeiro aportado está diretamente relacionado ao menor número de procedimentos realizados. Desta forma, fica evidenciado que o reajuste dos recursos deve ser revisto, considerando que a inflação consome e limita a capacidade de manter as condições de produtividade.

Ferreira e Silveira (2007) em seu estudo sobre o risco inflacionário no Setor Saúde demonstraram que a incorporação das taxas de inflação IPCA é eficiente na análise de custo no setor saúde salientando que o aumento de custo em geral no setor são superiores aos índices adotados para medidas da inflação no País.

Percebe-se que os hospitais de pequeno porte tendem a apresentar um menor nível de



produção, pois mesmo que tivessem sua capacidade operacional totalmente utilizada, ainda assim não são unidades autossustentáveis devido à pequena quantidade de leitos existentes não permitir produzir resultados econômicos suficientes para cobrir as despesas operacionais, como recursos humanos e insumos. Atrelado a essa questão, o subfinanciamento existente acirra ainda mais os problemas estruturais dessas Unidades.

Estudo realizado por Grannemann e cols (1985), corroboram com a afirmação acima no que se refere a importância do efeito escala para a eficiência, uma vez que observou-se nos hospitais de maior porte um desempenho superior ao serem comparados a estabelecimentos com um menor número de leitos.

Azevedo Ramos (2015) constatou em seu estudo referente à avaliação de desempenho de hospitais que prestam atendimento pelo sistema público de saúde que a maioria dos hospitais brasileiros é reconhecida pelo seu pequeno porte e capilaridade para o interior do País. Estes hospitais, ainda que estratégicos para descentralização e regionalização, mostram-se pouco eficientes.

Uma questão importante é a lógica de financiamento do SUS que estabelece tetos físicos e financeiros à produção dos hospitais de acordo com o porte e a série histórica de produção, o que desestimula o aumento dos serviços prestados e, conseqüentemente, o aumento de produtividade.

## **4 CONCLUSÃO**

As unidades hospitalares são estruturas organizacionais complexas que exigem dos gestores uma mobilização de grandes esforços para garantir à manutenção das atividades inerentes a assistência hospitalar.

No que tange à gestão financeira, é imprescindível compreender os processos existentes dentro dessas organizações de forma a estabelecer rotinas que promovam o melhor uso dos recursos existentes e a ampliação do acesso dos usuários ao Sistema de Saúde.

A necessidade de estudar a eficiência dos hospitais de pequeno porte habilitados na Política HPP teve como propósito verificar se os incentivos estabelecidos pela Política refletem na melhoria de desempenho das Unidades habilitadas. Os resultados aqui descritos apontam um desempenho econômico-financeiro abaixo do esperado, que remete a necessidade de apontar possíveis estratégias de redirecionamento dos recursos ou a mudança no perfil assistencial dessas Unidades e analisar a viabilidade da política HPP.

Observa-se que apesar do propósito de reestruturar a rede de atenção de forma a qualificar e humanizar a assistência, a gestão e fortalecer a descentralização, o incentivo financeiro estabelecido em Portaria Ministerial não considerou as perdas reais devido a inflação, uma vez que não estabeleceu nenhuma estratégia de reposição dessas perdas, já que, congelou o aporte de recursos. Desta forma, fica inviável manter os Hospitais habilitados com sua capacidade operacional.



Outra questão que também contribui para o baixo rendimento desses Hospitais tem haver com as peculiaridades do mercado de saúde, diferente do que ocorre em outros mercados o comportamento dos preços dos insumos e dos serviços em saúde não respeita a lógica da oferta e demanda, impactando numa inflação superior a encontrada em outros setores e, conseqüentemente na defasagem dos valores repassados.

A impossibilidade de levantar o montante de recursos aportados pelos municípios foi um fator limitante para compreender melhor os resultados encontrados. Considerando um contexto de recursos escassos, a análise do desempenho econômico-financeiro é útil para ajudar a alocar os recursos de forma mais eficiente no sentido de promover a maximização dos resultados sanitários.

## 5 REFERÊNCIAS

- AZEVEDO RAMOS. Avaliação de desempenho de hospitais que prestam atendimento pelo sistema público de saúde, Brasil, *Rev Saúde Pública* 2015; 49:43.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Cartilha A B C do HPP*. Secretaria der Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Coordenação Geral de Atenção Hospitalar. Brasília: Ministério da Saúde; 2005. 16 p. Disponível em:< <http://200.214.130.94/HPP/documentos/Cartilha.pdf>. Acesso em: 29 de Setembro de 2016.
- BRASIL. Portaria nº 1.044, de 01 de Junho 2004. Dispõe Instituir a Política Nacional para os Hospitais de Pequeno Porte, utilizando um modelo de organização e financiamento que estimule a inserção desses Hospitais de Pequeno Porte na rede hierarquizada de atenção à saúde, agregando resolutividade e qualidade às ações definidas para o seu nível de complexidade. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 28 Jun. 2004*. Disponível em [http://bvsms.saude.gov.br/base/saudelegis/gm/2004/prt1044\\_01\\_06\\_2004.html](http://bvsms.saude.gov.br/base/saudelegis/gm/2004/prt1044_01_06_2004.html)>. Acesso em: 29 de Setembro de 2016.
- FERREIRA, BRUNO PÉREZ E SILVEIRA JOSÉ DIRCEU, Risco Inflacionário no Setor Saúde: Análise de Indexadores Financeiros de Investimentos. Resumo (2007), Disponível em: < [www.anpad.org.br/admin/pdf/APS-B1026.pdf](http://www.anpad.org.br/admin/pdf/APS-B1026.pdf). Acesso 30 de setembro de 2016
- MALHOTRA, N. K. *Pesquisa de marketing: uma orientação aplicada*. 4. ed. Porto Alegre:Bookman, 2001.
- RAMPAZZO, L. *Metodologia científica*. 3. ed. São Paulo: Edições Loyola, 2005.
- VEILLARD, J; CHAMPAGNE, F; KLAZINGA, N; KAZANDJIAN V, ARAH, OA, GUISSSET,AL. A performance assessment framework for hospitals: the WHO Regional Office for Europe PATH project. *Int J Qual Health Care*. 2005;17(6):487-96. DOI:10.1093/intqhc/mzi072



ÁREA DE SUBMISSÃO: GESTÃO, ECONOMIA E SAÚDE – GE 20

## ANÁLISE DOS GASTOS COM AÇÕES JUDICIAIS NA SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE PERNAMBUCO, NO ANO DE 2014

V.M.S.MORAES, <sup>1</sup> P.G.F.MELO<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Sociais Aplicadas, Programa de Pós-Graduação em Gestão e Economia da Saúde. Docente da Faculdade de Ciências Humanas de Olinda. Enfermeira intensivista e Urgentista.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Sociais Aplicadas, Programa de Pós-Graduação em Gestão e Economia da Saúde.

vaniaenf.silva@bol.com.br

**RESUMO:** *O presente estudo categoriza os gastos da assistência à Saúde, para cumprimento das ações judiciais estimando os gastos de medicamentos incorporados e não incorporados. Como resultado, os dados apontam a dificuldade para o planejamento e a gestão do orçamento público dado à imprevisibilidade do gasto imposto pelas ações judiciais. O estudo envolveu pesquisa documental, descritivo e retrospectivo. A coleta dos dados foram obtidos por meio de bancos secundários do núcleo de ações judiciais (NAJ-SES-PE) ,e o levantamento no rede compras de Pernambuco. Apresenta-se aqui uma estimativa dos gastos inerentes a medicamentos, insumos, alimentos e descartáveis, perfazendo um gasto para o NAJ, SES-PE de R\$ 18.675.403,07. A judicialização da saúde faz referência à procura do Judiciário para aquisição dos produtos e serviços de saúde demandado e negado pelo SUS, seja por falta de previsão na RENAME, ou por ações orçamentárias escassas, tornando-se transparência de um sistema de saúde deficitário. Proporciona dois princípios: um bem individual e coletivo, e, para que haja acesso igualitário e universal dos indivíduos aos benefícios oferecidos pelas políticas públicas, o acesso aos direitos sociais precisa ser coletivo. Ainda nivela um aspecto negativo, causando uma desorganização da política da saúde. E aspectos positivos que podem contribuir com avanços nas políticas públicas de saúde, forçando o aperfeiçoamento de novas políticas.*

**Palavras-chaves:** *Judicialização; Direito a Saúde; SUS.*

**ABSTRACT:** *This study categorizes spending assistance to health, to compliance with lawsuits estimating spending embedded drugs and not incorporated. As a result, the*



*data show the difficulty for planning and management of public funds given the unpredictability of expenditure imposed by lawsuits. The study involved documentary, descriptive and retrospective research. The collection of data was obtained through secondary banks core of lawsuits (NAJ-SES-PE), and the survey in Pernambuco shopping network. Here it is presented an estimate of the costs inherent in drugs, supplies, food and disposable, making an expense to the NAJ, SES-PE R \$ 18,675,403.07 The legalization of health refers to the demand of the judiciary for the acquisition of goods and health services demanded and denied by SUS, or by lack of foresight in RENAME, or scarce budgetary actions, becoming a transparency deficit health system. It provides two principles: an individual and collective right, and so that there is equal and universal access of individuals to the benefits offered by public policies, access to social rights must be collective. Yet even one negative, causing a disruption of health policy. And positive aspects that can contribute to advances in public health policies, forcing the development of new policies.*

*Keywords: Legalization; Right to health; SUS.*

## 1. INTRODUÇÃO

Sendo a saúde garantida aos cidadãos brasileiros através da Constituição Federal de 1988 e os serviços à sociedade não plenamente cumpridos, a judicialização torna-se um fenômeno crescente que envolve o ambiente desordenado por demandas que vão desde produtos e serviços de saúde com o intuito de obter acesso a medicamentos de alto custo ou tratamentos de alta complexidade, além de internações. A judicialização da saúde expressa problemas de acesso à saúde em seu sentido mais genérico no que se refere à ausência ou deficiência da prestação estatal, ou seja, como uma dimensão do desempenho dos sistemas de saúde associado à oferta (Machado, 2014).

O aspecto negativo em potencial da judicialização é a desorganização da política de saúde, uma vez que a intervenção judicial realoca recursos para uns em detrimento de outros, e tende a causar maior impacto na política de saúde. O acolhimento às necessidades de melhorias no âmbito da saúde, incorporado ao conhecimento das normas que estruturam o SUS podem ser considerada de aspecto positivo.

O modelo econômico teórico proposto por Pinheiro (2014) em seu estudo denominado o impacto financeiro da judicialização da saúde capta o impacto do gasto decorrente de ações judiciais sobre o orçamento da saúde pública, e o consequente efeito desses gastos no número de indivíduos cobertos pelo sistema público de saúde. do ponto de vista da gestão eficiente, as demandas judiciais tendem a prejudicar as políticas de saúde e impedem a alocação racional dos recursos causando impacto no orçamento da saúde e o bem-estar da população. Corroborando com o estudo, Ferraz (2010) alega que as demandas judiciais provocam efeitos que afetam diretamente a programação orçamentária e financeira do Estado, uma vez que exigem uma estrutura paralela para seu atendimento e, conseqüentemente, terminam por afetar também a formulação de políticas e o provimento de outros bens e serviços sociais..



Gebran (2015), caracteriza que a judicialização pode contribuir com avanços nas políticas públicas de saúde obrigando a administração pública a se aperfeiçoar e a instituir novas políticas. Porém a administração pública brasileira, de um modo geral, apresenta excesso de regras e procedimentos, causando demora na implementação das políticas públicas.

O objetivo do estudo foi analisar os gastos da SES-PE com ações Judiciais por meio do núcleo de ações judiciais. Diante da complexidade da judicialização da saúde sabemos que a saúde é direito de todos e dever do Estado. As políticas públicas visam a redução das doenças e de outros agravos de modo igualitário e de acesso universal. O fenômeno da judicialização da saúde é desencadeado por falhas, insuficiência de recursos ou falta de cumprimento das políticas existentes. A judicialização da saúde rompe os princípios básicos do SUS, comprometendo o orçamento da saúde e gerando impactos significativos. Cabe aos gestores organizar o panorama da judicialização evitando a fragmentação do sistema em torno dos aspectos negativos e positivos.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo envolve pesquisa documental, retrospectivo, descritivo. A unidade de análise das ações judiciais constituiu com base no banco de dados secundários do núcleo de ações judiciais da Secretaria de Saúde de Pernambuco (NAJ-SES-PE). Escolhido o ano de 2014 tendo em vista a criação do núcleo em maio para atender de forma ágil aos usuários que buscam, por meio da Justiça, acesso produtos e serviços. No estudo os produtos e serviços com o código EFISCO, não foram acessado, por requer um perfil de usuário, fato considerado uma limitação ao estudo. Utilizamos a plataforma do serviço de rede compras – PE categorizados segundo RENAME e consolidado uma triagem visto que demandas agregadas do NAJ-SES-PE com compras de outros programas das áreas de Assistência Farmacêutica, ocasionava inferência no impacto financeiro das estimativas dos gastos. Foram construídos quadros, tabelas e gráficos a fim de favorecer a análise e discussão. No que se refere aos aspectos éticos, este estudo dispensa a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP por se tratar de análise de bancos de dados secundários, por meio das revisões bibliográficas, documental e via internet.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### **Características dos gastos com a Judicialização em Saúde do NAJ-SES-PE, 2014.**

Conforme dados do NAJ-SES-PE de 2014 foram ajuizadas 1172 ações Judiciais. Corroborando com o estudo de Barroso (2008) essas ações ocasionam efeitos orçamentários importantes, quando sabemos que os recursos são finitos e sua contabilidade deve ser planejada e avaliada pelas políticas de saúde. Portanto, as demandas judiciais prejudicam as políticas, impedindo a alocação racional dos escassos recursos públicos. Sabemos que o SUS garante integralidade da assistência desde o primeiro nível de assistência. As demandas judiciais se referem a coberturas que deveriam ser garantidas pelo SUS ou pelos planos de saúde.

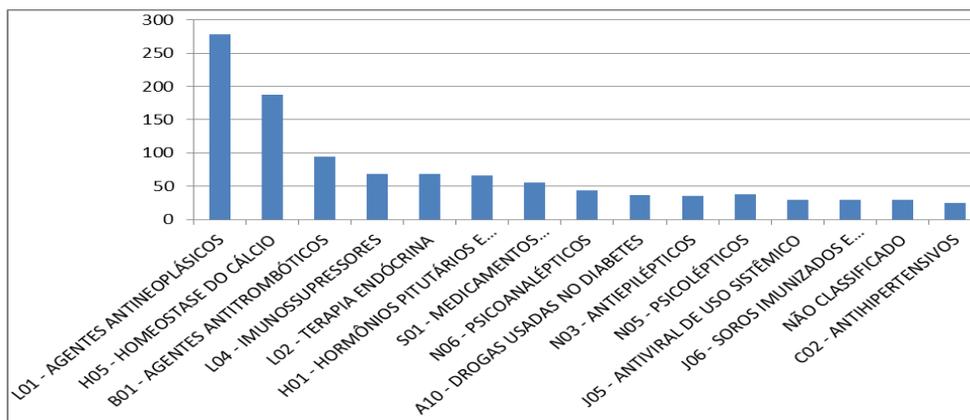


Figura 1 - Demonstrativo das classes terapêuticas-ATS. SES-PE. Recife, Pernambuco, Brasil, 2014. Fonte: NAJ- SES-PE-2014

O Ministério da Saúde e a CONITEC, recomenda a Classificação dos fármacos na Prática o padrão ATC (Anatomical Therapeutic Chemical Code) ou Sistema de Classificação Anatômico Terapêutico como sendo uma das categorias mais usadas internacionalmente para classificar moléculas com ação terapêutica. O estudo mostra os grupos químicos de medicamentos dos agentes antineoplásicos tiveram maior prevalência.

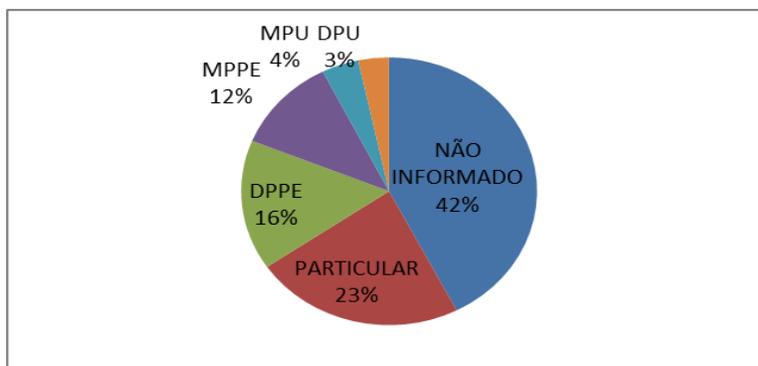


Figura 2 - Demonstrativo de origem das demandas dos Advogados, SES-PE, Recife, Pernambuco, Brasil, 2014. Fonte: NAJ-SES-PE-2014

As ações ajuizadas por advogados particulares comprova que os pacientes arcaram com os custos dessa representação e em princípio poderiam adquirir os medicamentos solicitados. A justiça gratuita que correspondem a (DPPE, MPPE, MPU e DPU). Os direitos sociais precisam ser realizados coletivamente, a fim de que haja acesso igualitário e universal dos indivíduos aos benefícios oferecidos pelas políticas públicas.

### Características dos gastos com a Judicialização em Saúde do NAJ-SES-PE, 2014.

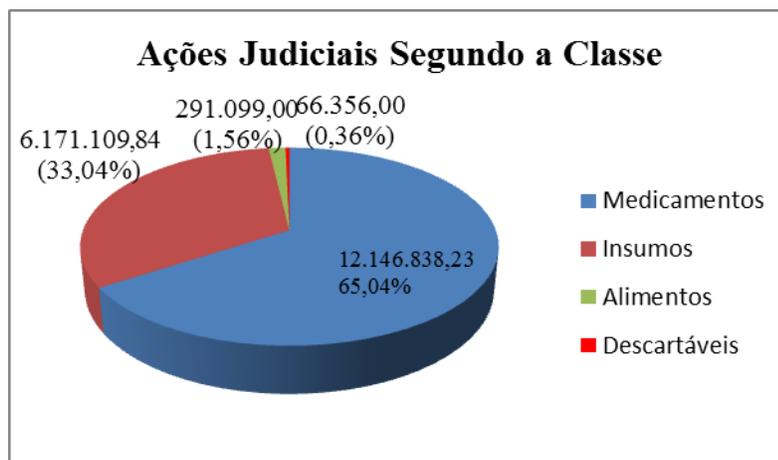


Figura 3 - Demonstrativo da estimativa de gastos referentes às ações judiciais, e outros componentes da assistência farmacêutica. Recife, Pernambuco Brasil, 2014 Fonte: Rede compras e Portal da transparência-PE

Os valores descritos acima fazem referência à aquisição dos produtos pleiteados pelas ações judiciais, demonstrando os gastos do ano 2014 com compras não programadas, provocando desordens na gestão e nos serviços prestados. De acordo com os dados avaliados foi estimado um gasto de R\$ 18.675.403,07. (Dezoito milhões seiscentos e setenta e cinco mil quatrocentos e três reais e sete centavos).

Na caracterização dos produtos, os medicamentos representam os itens mais solicitados judicialmente. Podemos categorizar os gastos de medicamentos por componentes da RENAME: CEAF e Não incorporado SUS.

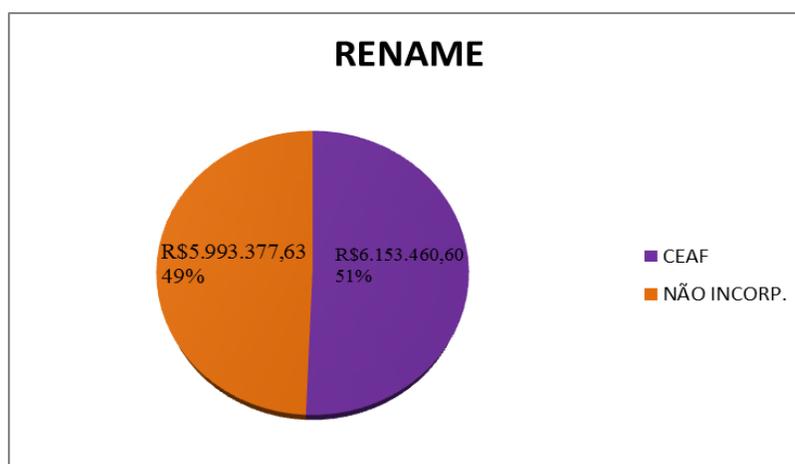


Figura 4 - Componentes da RENAME, referentes às ações judiciais. Recife, Pernambuco, Brasil, 2014. Fonte: Rede compras; Portal da transparência-PE

A RENAME possui um elenco de medicamentos e insumos a serem disponibilizados pelo SUS. Estimado os gastos dos componentes da RENAME, conforme gráfico acima. Nota-se o impacto com gastos na aquisição de medicamentos componentes da Especializado da Assistência Farmacêutica (CEAF).

Corroborando com o estudo relatamos que os usuários do SUS acionam o Poder Judiciário para conseguir seus direitos garantidos, isto ocorre devido à existência de uma demanda que não está sendo atendida. O impacto no orçamento público bem como o impacto social por afetar toda a coletividade, assim como também os princípios das políticas públicas já que é um conjunto de ações voltadas a todos os cidadãos.

Podemos classificar nominalmente os medicamentos judicializados conforme a RENAME e os gastos com todas as aquisições no ano de 2014 como mostra o gráfico a seguir.

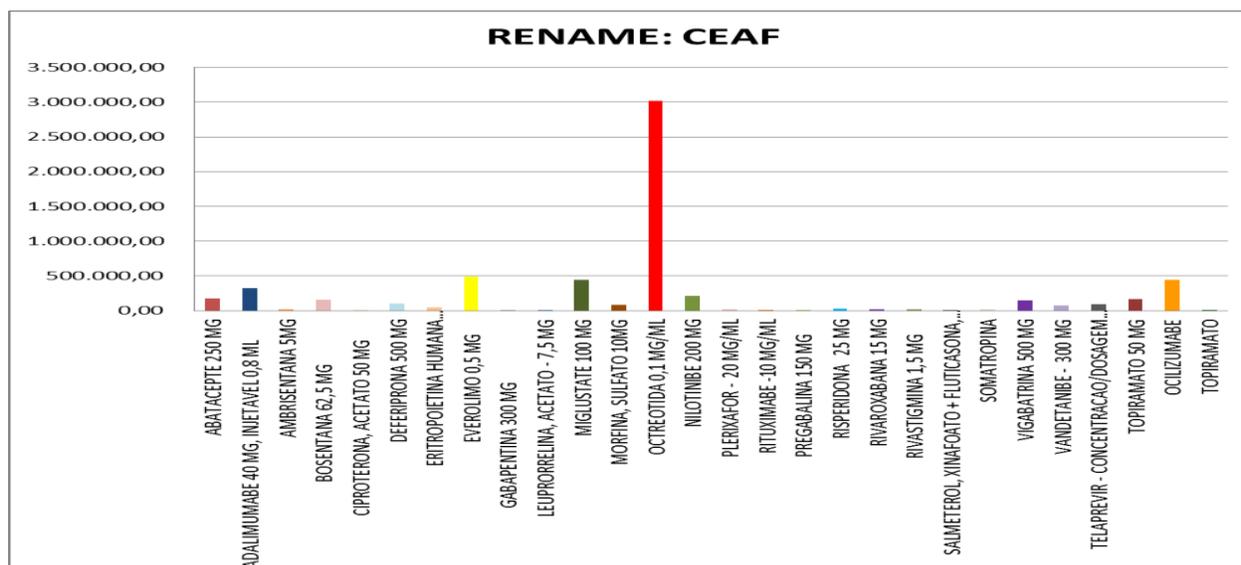


Figura 5 - Demonstrativos dos gastos de medicamentos por componentes da RENAME- Componente Especializado da Assistência Farmacêutica (CEAF). Recife, Pernambuco, Brasil, 2014. Fonte: Rede compras; Portal da transparência-PE

Considerando o gráfico acima, é evidente que alguns medicamentos do CEAF se destacam pelo orçamento dos gastos de compras. O CEAF estabelecido pelo MS e precisa garantir dispensação de medicamentos de alto custo para o tratamento de doenças específicas, geralmente de uso contínuo, utilizados em nível ambulatorial. É considerável que se verifique a inexistência de medicamento equivalente em eficácia e em segurança já disponível no SUS que ainda não tenha sido utilizado para a doença em questão como a finalidade de minimizar o efeito do impacto financeiro no orçamento público. O fato desses medicamentos, previstos em listas oficiais, serem pleiteados por via judicial como acesso à farmacoterapia, sugere falhas na gestão da Assistência Farmacêutica.

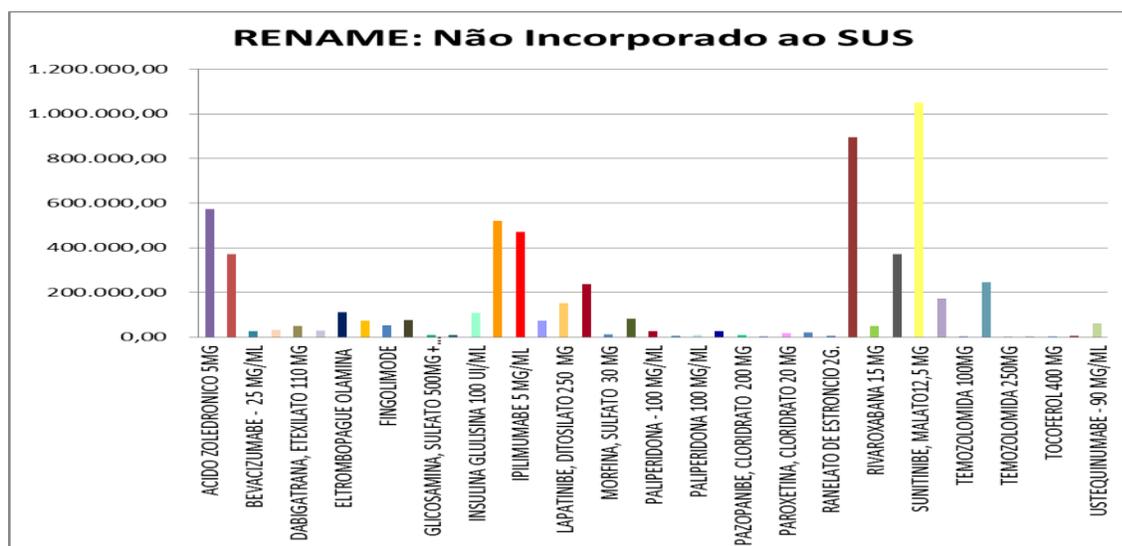


Figura 6 - Demonstrativos dos gastos de medicamentos Não incorporados ao SUS Recife, Pernambuco, Brasil, 2014. Fonte: Rede compras; Portal da transparência-PE.

A inclusão dos medicamentos obedece às regras da CONITEC no SUS, garantindo a proteção quanto ao uso e eficácia desses medicamentos. É pertinente destacar que a Judicialização em saúde na gestão pública origina instabilidade orçamentária, financeira e falhas no planejamento público. A incorporação assume um aspecto importante, pois aumenta a oferta de tratamento para os pacientes que não respondem aos medicamentos convencionais ou que apresentam intolerância às demais terapias (BRASIL, 2014).

A ação judicial recebe considerações polêmicas referentes a sua influência no orçamento do Executivo, pois envolve decisões técnicas que o Judiciário coloca para as escolhas de tratamento e de medicamentos que precisam ser fornecidos pelo Poder Público.

Os impactos causados na gestão pública geram instabilidade orçamentária, causando deformidades entre a distribuição dos recursos com o que de fato tinha sido planejado considerando esse ponto de vista, pode-se dizer que a judicialização se mostra negativa.

## 4. CONCLUSÃO

Os valores gastos pela SES-PE para atendimento às demandas judiciais apontam o risco de comprometimento do planejamento da assistência farmacêutica, promovendo gasto desordenado e impacto nas finanças públicas.

O subfinanciamento para as ações em saúde dificulta a manutenção de programas assim como o reflexo da judicialização em saúde força os usuários a recorrerem ao Poder Judiciário para ter seu direito assegurado. A judicialização é composta de necessidades individuais em detrimento das coletivas proporcionando aspectos negativos e positivos.

Os aspectos negativos referir-se à desorganização da política de saúde, aos gastos dos recursos públicos, ferindo a igualdade de acesso à Saúde Pública pela população. Em contrapartida os aspectos



positivos contribuem com avanços nas políticas públicas de saúde onde as ações judiciais aceleram o processo de incorporação das novas tecnologias.

Este dado ocorre pela insuficiência na previsão da RENAME, ou por questões orçamentárias, tendo que o gestor público remanejar constantemente os recursos já escassos, fazendo-se necessária a utilização das vias judiciais, para garantir o mínimo necessário à sobrevivência com dignidade aos cidadãos.

Por fim, a judicialização em saúde desafia o princípio da equidade preconizado pelo SUS quase sempre a favor da realização do tratamento de alto custo ameaçando a sustentabilidade dos sistemas.

## 5. REFERÊNCIAS

BARROSO, Luiz Roberto. Judicialização, Ativismo Judicial e Legitimidade Democrática. 2008. 29 p. Disponível em: <http://www.direitofranca.br/direitonovo/FKCEimagens>. Acesso em: 28 dez. 2015.

FERRAZ, Octavio Luiz Motta. Health Inequalities, Rights, and Courts: The Social Impact of the Judicialization of Health - Litigating Health Rights: Can Courts Bring More Justice to Health?, *Harvard University Press*, 2010

GEBRAN. João Pedro Neto. Financiamento da saúde. Judicialização da saúde: vantagens e desvantagens que geram impacto de R\$ 844 milhões. Disponível em <<http://www.congressomedicojuridico.com.br>>. Acesso em: 15 Dez. 2015.

MACHADO, Marcos Henrique. A Judicialização da Saúde da Perspectiva Weberiana. *Revista Jurídica da Unic / Emam*, v. 1, n. 2, p. 159-175, jan./jun. 2014.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Balanço CONITEC: 2012-2014 Ministério da Saúde, Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

PINHEIRO, Lisandra Karoll Torres. O impacto financeiro da judicialização da saúde demonstrado através de um modelo econômico teórico. Dissertação (Mestrado do Programa de Pós-graduação em Gestão e Economia da Saúde). Universidade Federal de Pernambuco, 2014.

## 6. AGRADECIMENTOS

A Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco-SES-PE em especial, o núcleo de ações judiciais, ao superintendente Geraldo Jorge Filho, e coordenador Diego Medeiros Guedes pelo apoio, dedicação, paciência, profissionalismo, gentileza e compreensão nos momentos de investigação no banco de dados secundários do núcleo de ações judiciais.



ÁREA DE SUBMISSÃO: GESTÃO, ECONOMIA E SAÚDE – GE 21

## AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO DACLATASVIR VERSUS ALFA PEGINTERFERONA 2A NO TRATAMENTO DA HEPATITE C CRÔNICA

P.S.S.OLIVEIRA<sup>1</sup>, L.T.C. BARROS<sup>2</sup>, F. ZANGHELINI<sup>1</sup>, M.J.B.M. RÊGO<sup>1</sup> e M.G.R. PITTA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Núcleo de pesquisa em inovação e avaliação de tecnologias da saúde

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Sociais e Aplicadas, Programa de Pós-Graduação e Gestão em Economia da Saúde

priusan@gmail.com

*RESUMO – A Hepatite C é uma doença viral de grande impacto na saúde pública. Os tratamentos disponíveis incluem medicamentos clássicos e novas drogas incorporadas ao Sistema Único de Saúde do Brasil ano de 2015. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar a eficácia do Daclatasvir versus Alfa peginterferona 2A na Hepatite C Crônica. Para tanto foi realizada uma busca por evidências em bases de dados eletrônicas de acordo com as diretrizes do ministério da Saúde. Foram selecionados para análise uma revisão sistemática com metanálise de ensaios clínicos randomizados e um ensaio clínico randomizado. As ferramentas de avaliação da qualidade dos estudos identificaram falhas metodológicas e o desfecho eficácia foi analisado de forma distinta entre os estudos. Portanto, as evidências localizadas através da pesquisa sistematizada não permitiram a análise comparativa das tecnologias avaliadas.*

*Palavras-Chave: ATS, SUS, evidência*

*ABSTRACT– Hepatitis C is a viral disease that represents major public health impact. The treatments available include conventional drugs and new drugs incorporated into Brazil's national Health System in 2015. Thus, the aim of this study was to evaluate the effectiveness of Daclatasvir versus peginterferon alfa-2a in Chronic Hepatitis C. We conducted a searching for evidence in electronic databases according to the ministry of health guidelines. We selected for analysis one systematic review with meta-analysis of randomized controlled trials and one randomized clinical trial. The assessment tools of quality of the studies identified methodological shortcomings. Therefore, the evidence located through systematic research did not allow the comparative analysis of the*



*evaluated technologies.*

*Keywords: ATS, SUS, evidence*

## 1. INTRODUÇÃO

A hepatite C é uma doença que acomete o fígado causada por um pequeno e envelopado retrovírus da família Flaviviridae, o vírus da hepatite C. Este agente pode causar as formas aguda e crônica da doença que varia desde uma inflamação hepática simples até a fibrose grave do órgão. Até o momento, foram identificados 4 genótipos diferentes para o vírus. Doações de sangue, compartilhamento de seringas e agulhas para o uso de drogas, transmissão nosocomial e, eventualmente, relações sexuais desprotegidas constituem as principais formas de contágio. (CONITEC, 2015).

A abordagem terapêutica contra a hepatite C tem como objetivo controlar a progressão da doença hepática por meio da inibição da replicação viral. A utilização dos interferões em associação a ribavirina por 24 ou 48 semanas foi por muito tempo o padrão clássico de tratamento da doença. O desenvolvimento de agentes antivirais diretos, do inglês *direct antiviral agents* (DAAs), possibilitou que a terapia fosse mais eficaz, segura e bem tolerada (Kahli *et al.*, 2014).

Em 2015, o Ministério da Saúde recomendou a descontinuação do uso dos agentes antivirais diretos de primeira geração, Telaprevir e boceprevir, e disponibilizou três novos fármacos. Estes novos medicamentos antivirais constituem uma inovação no tratamento da hepatite C crônica pois permitem a terapia concomitante a coinfeção com HIV e em situações de pré e pós transplante de fígado e outros órgãos. Dentre estes novos DAAs, destaca-se o Daclatasvir, um potente inibidor do complexo de replicação NS5A do vírus da hepatite C (CONITEC, 2015).

De acordo com a Política Nacional de Gestão de Tecnologias em Saúde (PNGTS), a análise baseada em evidência é essencial para fornecer subsídio a tomada de decisão em saúde, levando em consideração aspectos como eficácia, acurácia, efetividade, segurança e custo-benefício. A incorporação, exclusão ou alteração de uma tecnologia no âmbito do Sistema único de Saúde (SUS) deve ser feita após avaliação sistematizada das evidências conforme as diretrizes metodológicas do Ministério da Saúde. De maneira hierárquica, considera-se o mais alto nível de evidência os estudos que compreendem Revisões Sistemáticas (RS) de Ensaios Clínicos randomizados (ECR) e os próprios ECRs (Ministério da Saúde, 2014).

A elaboração de estudos sobre tecnologias em saúde que tenham demanda no SUS é de extrema relevância. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia do Daclatasvir versus alfa peginterferona 2ª no tratamento de portadores de Hepatite C crônica, seguindo as orientações de diretrizes metodológicas do Ministério da Saúde.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS



## 2.1 Formulação da Pergunta PICO

A ferramenta PICO [P = população, I = intervenção, C = comparador e O = *outcome* (desfecho)] foi utilizada afim de estruturar a metodologia para a pesquisa. Considerando o objetivo proposto pelo estudo, o “P” correspondeu à pacientes portadores de Hepatite C, o “I” a intervenção Daclastavir, o “C” referente ao comparador alfa peginterferona 2a, e por fim o “O” como o desfecho pretendido, correspondeu à eficácia.

## 2.2 Estratégia de busca e Base de dados

Conforme descrito na Tabela 1, a elaboração da estratégia de busca foi construída utilizando termos do vocabulário em saúde por meio das ferramentas Mesh (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/>) e DeCs (<http://decs.bvs.br/>). Os elementos utilizados nas estratégias de busca foram os termos principais da pergunta PICO combinados de forma lógica pelos operadores booleanos “AND” e “OR” para conectar os elementos. A pesquisa abrangeu grandes bases de dados como MedLine via PubMed ([www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov)), LILACS (<http://lilacs.bvsalud.org/>) e Biblioteca Cochrane (<http://onlinelibrary.wiley.com/cochranelibrary/search>). A última atualização da busca foi realizada no período de abril de 2016.

Tabela 1 - Estratégia de busca nas bases de dados

Data da Busca	06/04/2016
Base de dados	Estratégia
MedLine via PubMed	"Chronic Hepatitis C"[Mesh] OR "Parenterally-Transmitted Non-A, Non-B Hepatitis" OR "Parenterally Transmitted Non A, Non B Hepatitis" OR "PT-NANBH" OR "Hepatitis, Viral, Non-A, Non-B, Parenterally-Transmitted" AND "BMS-790052" OR "daclatasvir" OR "daklinza" AND "sofosbuvir" AND "peginterferon alfa- 2a" OR "recombinant peginterferon alpha -2a" OR "pegylated interferon alpha 2a" AND "Meta-analysis"
LILACS	tw:((tw:(hepatitis c)) AND (tw:(daclatasvir)) AND (tw:(sofosbuvir)) AND (tw:(peginf))) AND (instance:"regional")



---

COCHRANE	"Chronic hepatitis C" and "daclatasvir" and "sofosbuvir" and "peginterferon alpha"
----------	---------------------------------------------------------------------------------------

---

### 2.3 Critérios de elegibilidade

Foram incluídas nesta análise revisões sistemáticas (RS), com ou sem metanálise, e estudos clínicos randomizados (ECR), desde que apresentassem os desfechos de eficácia. As buscas consideraram os estudos realizados em humanos, realizadas nos últimos 5 anos e nos idiomas português e inglês.

### 2.4 Identificação e Seleção dos estudos

Para o processo de seleção dos estudos, foram adotadas as seguintes estratégias: foram excluídas todas as publicações encontradas em duplicidade, logo em seguida realizada triagem por título e abstract dos artigos. Aqueles que atendiam aos critérios de elegibilidade, continuaram no processo de análise. Por fim, os artigos classificados como elegíveis foram selecionados para leitura integral do texto.

### 2.5 Coleta de dados e análise da qualidade da evidência

Avaliou-se a qualidade da evidência no estudo clínico selecionado, utilizando a ferramenta de Jadad (Jadad *et al.*, 1996). Para avaliação da qualidade metodológica da RS selecionada foi utilizada a ferramenta de AMSTAR - *Assessing the Methodological Quality of Systematic Reviews* (Shea *et al.*, 2009).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Seleção dos estudos

Foram localizados 101 artigos por meio da busca nas bases de dados. Foram excluídos inicialmente 86 artigos: 01 por apresentar duplicidade, 85 após triagem por título e resumo e 3 artigos não atenderam aos critérios de elegibilidade. Foram selecionados 02 artigos para leitura integral do texto e avaliação da qualidade da evidência.

### 3.2 Descrição dos estudos selecionados

*Sulkowski et al.* (2014) conduziram um ensaio clínico randomizado, multicêntrico, aberto de atribuição paralela de fase II. A população de interesse consistiu em 211 pacientes homens e mulheres, com idades entre os 18 e os 70 anos infectados com o vírus da hepatite C (HCV) genótipo 1, 2, ou 3, sem exposição prévia a uma formulação do interferão. A intervenção avaliada foi Daclatasvir, dose de 60 mg por via oral uma vez ao dia em adição ao sofosbuvir a uma dose de 400 mg por via oral uma vez por dia, com ou sem ribavirina, durante 24 semanas. No estudo foram avaliados os desfechos de eficácia através da quantificação dos níveis séricos de RNA viral. Os níveis de RNA de HCV foram medidos no início do estudo; nos dias de tratamento de 1 a 7, 9,



11, 14, e 21; a cada 2 semanas de tratamento semana de 4 a 24 semanas; e nas semanas 4, 12, e 24 após o final do período de tratamento. O estudo considerou como resposta viral sustentada (RVS): Nível de RNA viral abaixo de 25 UI/mL após 12 semanas do fim do tratamento. Os resultados apresentados indicaram que pacientes genótipo HCV1, sem tratamento prévio: 98% de 126 mantiveram a RVS e com tratamento prévio: 98% dos 41 mantiveram a RVS. Pacientes genótipo HCV 2, sem tratamento prévio: 92% de 26 mantiveram a RVS, pacientes genótipo HCV 3 sem tratamento: 89% de 18 mantiveram a RVS apenas até a semana 12 de tratamento.

A revisão sistemática com metanálise publicada por Romero-Gomez *et al.* (2013) analisou 12 ensaios clínicos randomizados que investigavam a terapia com alfa interferão peguilado 2a e alfa interferão peguilado 2b e ribavirina, com ou sem inibidores de protease. No total os estudos incluíram uma população de 8.250 indivíduos infectados com HCV maiores de 18 anos. O desfecho analisado, eficácia, foi avaliada por meio da Eficácia Relativa (ER) que considera os parâmetros de rápida resposta virológica (RRV) e resposta virológica precoce (RVP). Os resultados evidenciaram que a eficácia relativa (ER) da RVR de pacientes portadores de HCV de todos os genótipos foi de ER=1.118 e Intervalo de Confiança (IC=0.0039-1.203) a favor da alfa peginterferona 2a. A análise da eficácia relativa (ER) da RVP de pacientes portadores de HCV de todos os genótipos foi de ER=1.151 (IC=1.042-1.272) a favor da Alfa peginterferona 2a.

### 3.3 Avaliação da qualidade dos estudos

A avaliação da qualidade do Ensaio Clínico Randomizado de *Sulkowski et al.*, (2013) e da Revisão sistemática com metanálise de Romero-Gomez *et al.* (2013) está descrito nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Avaliação do risco de viés: Escala Jadad *et al.*, 1996

Ensaio Clínico Randomizado:	<i>Sulkowski et al.</i> 2014
1. O estudo foi descrito como randomizado?	1
2. O método de randomização foi adequado?	0
3. O estudo foi descrito como duplo-cego?	0
4. O método de cegamento foi usado adequadamente?	0
5. Houve descrição das perdas e exclusões?	1
<b>Pontuação Total:</b>	<b>2/5</b>

Tabela 3: Avaliação da qualidade metodológica: AMSTAR (Shea *et al.*, 2009)

Estudo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Pontuação
Romero-Gomez <i>et al.</i> (2013)	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	10/11

1 = Foi fornecido um projeto “a priori”?; 2 = Houve uma duplicação na seleção de estudos e extração de dados?; 3 = Foi realizada uma pesquisa/busca bibliográfica abrangente?; 4 = O status da publicação (ou seja, literatura cinzenta) foi utilizado como um critério de inclusão?; 5 = Foi fornecida uma lista de estudos (incluídos e excluídos)?; 6 = As características dos estudos incluídos foram fornecidas; 7 = A qualidade científica dos estudos incluídos foi avaliada e documentada?; 8 = A qualidade científica dos estudos incluídos foi utilizada de forma adequada na formulação das conclusões?; 9 = Os métodos foram usados para combinar os resultados de estudos adequados?; 10 = A probabilidade de viés de publicação foi avaliada?; 11 = O conflito de interesses foi informado?

Não foram encontrados estudos que realizaram a comparação experimental direta das intervenções Daclatasvir com o comparador alfa peginterferona 2a. Desta maneira, a comparação indireta das evidências diminui a qualidade da análise. Além do mais, os regimes de tratamento reportados pelo ECR utilizam outras drogas em combinação com o daclatasvir em diferentes dosagens. Dessa forma, a análise isolada do daclatasvir não é reportada. Vale ressaltar que os estudos relatam a eficácia das drogas de acordo com parâmetros diferentes, dificultando assim comparar mesmo que de forma indireta qual das intervenções é mais eficaz (SILVA, *et al.*, 2014).

De acordo com as ferramentas de análise da qualidade, ambos os estudos apresentaram falhas metodológicas. O Ensaio clínico randomizado obteve baixa pontuação na escala Jadad *et al.*, 1996 pelo não- duplo cegamento de pacientes e pesquisadores e por não descrever o método de randomização dos grupos. Em contrapartida, a avaliação da Revisão Sistemática conduzida por Romero-Gomez *et al.* (2013) apenas omitiu a descrição dos estudos que foram excluídos de sua revisão. Dessa forma, atendeu de maneira satisfatória dez itens dos onze questionados na ferramenta ARMSTAR.

Apesar das limitações acima citadas não permitirem uma análise de comparação direta das dos fármacos, a condução deste trabalho permitiu demonstrar que a busca sistematizada de evidências de alto nível metodológico é a forma mais confiável para avaliar e comparar a eficácia de tecnologias de interesse.

#### 4. CONCLUSÃO



As evidências encontradas não subsidiaram a análise comparativa da eficácia do medicamento Daclatasvir versus alfa peginterferona 2a no tratamento da Hepatite C crônica.

## 5. REFERÊNCIAS

CONITEC – Comissão Nacional de Incorporações de Tecnologia do SUS. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções, 2015. Disponível em: <[http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2015/Relatorio\\_PCDT-HepatiteC-CP.pdf](http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2015/Relatorio_PCDT-HepatiteC-CP.pdf)>. Acesso em 20/08/2015.

JADAD, A. R. *et al.* Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: is blinding necessary? *Controlled Clin Trials*, p. 1-12, 1996.

KHALI, A. *et al.* Treatment of hepatitis C: a systematic review. *JAMA*. 13; 312 (6):631-40, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Diretrizes Metodológicas: Elaboração de Parecer Técnico Científico, Biblioteca virtual em saúde do Ministério da Saúde, 4ª Ed, p. 1-79, 2014.

SILVA, V. *et al.* Overview de revisões sistemáticas um novo tipo de estudo. Parte II. Medicina baseada em evidências. *Diagn Tratamento*.19 (1): 29-41, 2014.

SHEA, B. J. *et al.* AMSTAR is a reliable and valid measurement tool to assess the methodological quality of systematic reviews. *J Clin Epidemiol*.62(10):1013-20, 2009.

## 6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Ministério da Saúde e ao Núcleo de Pesquisa em inovação e avaliação em tecnologias da Saúde.



ÁREA DE SUBMISSÃO: GESTÃO, ECONOMIA E SAÚDE – GE 22

## FINANCIAMENTO DO TRATAMENTO ONCOLOGICO NO BRASIL: UMA ANÁLISE DOS HOSPITAIS PRIVADOS E PÚBLICOS DA REDE SUS

I.D. de FRANÇA<sup>1</sup>, R. LEMOS<sup>1</sup>, T.R.S. NUNES<sup>2</sup>, M.G.R. PITTA<sup>3</sup>, M.J.B de MELO<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Gestão e Economia da Saúde

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica.  
E-mail: ivaldodf@gmail.com

**RESUMO** – *Os custos da assistência oncológica para o tratamento são estabelecidos com base nos procedimentos realizados e em qual estadiamento encontra-se a neoplasia. Este estudo objetivou avaliar a alocação de recursos do Ministério da Saúde para a Atenção Especializada no Brasil entre os anos de 2008 e 2014, voltadas ao tratamento oncológico. Caracteriza-se como uma pesquisa com bases de dados secundários de domínio público e de abordagem quantitativa, de cunho epidemiológico e estruturada segundo os critérios de um estudo observacional e retrospectivo. Observou-se que 67,45% dos gastos no SUS para o tratamento de câncer no Brasil se concentraram nos hospitais de regime privado, enquanto 32,55% foram destinados aos públicos. Reafirma-se a necessidade de se avaliar as Políticas Públicas em saúde que fortaleçam o SUS, não permitindo que os hospitais de natureza jurídica pública tornem-se sucateados e os privados canalizem para si todos os gastos relacionados à Atenção Especializada em Oncologia. Sugere-se fortemente uma distribuição equitativa dos gastos, levando-se em conta um maior investimento nas unidades do interior brasileiro, de maneira a fortalecer a estrutura geral do tratamento oncológico, aumentar o número de diagnósticos precoces, reduzir as taxas de morbi-mortalidade e dos custos indiretos associados ao tratamento dos pacientes.*

**Palavras-chave:** *Oncologia; Serviço Hospitalar de Oncologia; Financiamento da Assistência à Saúde.*

**ABSTRACT** - *The costs of cancer care for treatment are established on the basis of procedures performed and at what stage is the cancer. This study aimed to evaluate*



*the allocation of Ministry of Health resources for Specialized Care in Brazil between 2008 and 2014 aimed at cancer treatment. It is characterized as a survey of secondary databases in the public domain and quantitative approach to epidemiological studies and structured according to the criteria of an observational and retrospective study. It was observed that 67,45% of the expenses in the SUS for the treatment of cancer in Brazil focused in hospitals private regime, while 32,55% were for public. Reaffirms the need to assess the public policies in health to strengthen the SUS, not allowing public legal hospitals become scrapped and private channeling for you all expenses related to Specialized Care in Oncology. It is strongly suggested a fair distribution of costs, taking into account a greater investment in units of the Brazilian interior, in order to strengthen the overall framework of cancer treatment, increase the number of early diagnoses, reduce morbidity and mortality rates and the indirect costs associated with the treatment of patients.*

*Keywords: Oncology; Oncology Service Hospital; Financing of Health Care.*

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo o Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) no ano de 2014, o número de casos de neoplasia para o gênero masculino no País foi de 302.350, com taxa de 309,53. Excluindo-se o câncer de pele não melanoma, o de próstata apresentou o maior índice, chegando a 68.800, com taxa de 70,42. Para o gênero feminino, foram detectados 274.230 casos, com taxa de 269,35, sendo o câncer de mama o de maior incidência, com 57.120 casos detectados e taxa de 56,09. Em Pernambuco, a incidência do câncer foi de 9.310 casos e taxa de 211,87 para o gênero masculino; e 10.760 casos e taxa de 226,9 para o gênero feminino, seguindo o perfil nacional quanto aos tipos de neoplasia mais incidentes (Brasil, 2014a).

O Sistema Único de Saúde (SUS), com o objetivo de reduzir a incidência e a mortalidade por câncer e garantir qualidade de vida aos pacientes em tratamento, estabeleceu a Política Nacional de Assistência Oncológica. Esta política prevê a atenção integral e especializada por meio das Unidades de Assistência de Alta Complexidade em Oncologia (UNACON) e dos Centros de Assistência de Alta Complexidade em Oncologia (CACON) (Brasil, 2014b).

Cada unidade de referência possui um papel na rede de assistência oncológica. Os UNACONS são unidades que devem possuir condições técnicas e estruturais para o diagnóstico definitivo e tratamento dos cânceres mais prevalentes no Brasil, enquanto os CACONS, além de reunir todos os requisitos dos UNACONS, devem realizar o tratamento de todos os tipos de câncer. Com relação ao financiamento para o cuidado integral das pessoas com câncer, está previsto, em conformidade à Portaria nº 874 de 16 de maio de 2013 do Ministério da Saúde, que ele deve ser tripartite, ou seja, contar com a participação de todos os entes federados por meio de seus fundos de saúde, ficando a cargo de cada esfera a adoção de outras fontes de financiamento (Brasil, 2013; Brasil, 2014b).

No que se refere ao financiamento ambulatorial, o ressarcimento dever ser feito após o registro dos procedimentos realizados no Sistema de Informação Ambulatorial (SIA) através do



instrumento de Autorização de Procedimentos de Alto Custo (APAC). No âmbito hospitalar, o ressarcimento ocorre mediante a solicitação da Autorização da Internação Hospitalar (AIH), que deverá ser registrada no Sistema de Internações Hospitalares (SIH) (Brasil, 2005a, b).

Um aspecto importante dos custos da assistência oncológica é a sua estrutura de tratamento diferenciada, pois seus custos são baseados nos procedimentos realizados e no estadiamento ou nível da neoplasia. Ressalta-se que são realizados por ressarcimento, ou seja, os repasses financeiros são calculados com base no valor total do tratamento e divididos pela quantidade de meses, independente da quantidade de ciclos que o tratamento terá no mês. Esta forma de pagamento evita um novo ressarcimento de um tratamento já concluído (Paiva, 2013; Costa, 2015).

Como os recursos na área da saúde são limitados e as demandas por atendimento médico-hospitalar tendem a ser crescentes - associado ao ritmo do envelhecimento da população - as neoplasias geram um impacto significativo na vida social dos indivíduos, com afastamento de suas funções laborais e redução do seu poder aquisitivo (Rodrigues, 2010).

Considerando o impacto cada vez maior das doenças crônico-degenerativas (especialmente das neoplasias) na sociedade brasileira, procurou-se descrever como foi realizado o financiamento da Atenção Especializada para o tratamento oncológico. Desta forma, este estudo objetivou avaliar a alocação de recursos do Ministério da Saúde para a Atenção Especializada em Pernambuco entre os anos de 2008 e 2014, voltadas ao tratamento oncológico.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa, de abordagem quantitativa e características de cunho epidemiológico, utilizou bases de dados secundários de domínio público. Os dados se referem aos anos de 2008 a 2014 para o estado de Pernambuco e foram estruturados segundo os critérios de um estudo observacional e retrospectivo.

As bases de dados utilizadas foram: Sistema de Informação Hospitalar/Sistema Único de Saúde (SIH/SUS); Sistema de Informação Ambulatorial/Sistema Único de Saúde (SIA/SUS) e Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Essas bases foram selecionadas por conterem informações adequadas ao estudo, a saber: quantitativo de internações, óbitos, valor total pago no tratamento oncológico e quantitativo de procedimentos realizados nos hospitais que atendem pacientes do SUS. Na determinação do tipo de prestador foi selecionada a opção “Natureza”, que classifica os prestadores em: públicos federais, estaduais e municipais (que foram consolidados como “público”); além, de privados com fins lucrativos e optantes do simples, e os sem fins lucrativos e filantrópicos, que foram conjugados como “privados” e “filantrópicos”.

Para o deflacionamento dos valores, foi escolhido o Índice Nacional de Preços ao Consumidor Amplo do IBGE (IPCA), utilizando-se como ano base para o cálculo o IPCA 2008. Os valores deflacionados foram, então, padronizados em uma relação de gastos médios baseados por internações hospitalares ocorridas, através da razão dos valores médios deflacionados pela quantidade de internações.

Foram incluídos todos os dados que constam nos bancos de dados a partir do ano de 2008, período inicial da implantação da tabela de Procedimentos, Medicamentos, Órteses e Próteses e



Materiais Especiais do SUS estabelecida pela Portaria GM / MS nº 321 de 08 de fevereiro de 2007. Dados não informados pelos bancos de dados - como anos anteriores a 2008 - não foram contemplados por não haver informações relativas a eles no SIH/SUS, e nem dados não informados pelos Sistemas de Informação - como valores totais cobrados por cirurgias realizadas.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Ao observar o valor total pago por pacientes internados, a região Nordeste aparece em primeiro lugar, indicando que, do valor total alocado pela internação de cada paciente no Brasil, 22,1% foi direcionado para o Nordeste, seguida pelas regiões Sul (21,21%), Sudeste (20,96%); Centro-Oeste (18,65%) e Norte (17,08%). Os resultados indicam também que ocorreu um crescimento de 19,29% dos gastos para o setor oncológico na região Nordeste e de 4,1% para a Centro-Oeste em comparação às demais regiões – que, ao contrário, apresentaram redução de crescimento para o setor: Norte (5,6%); Sul (10,4%); Sudeste (6,38%).

Em termos percentuais, a maior média de óbitos por pacientes internados ocorreu na região Sudeste (23,71%), ou seja, para cada 100 óbitos no Brasil por câncer, aproximadamente 24 casos notificados foram dessa região, seguida pelas regiões Sul (22,04%); Centro-Oeste (20,39%); Norte (18,71%) e Nordeste, que apresentou a menor média de óbitos (15,15%). Os resultados indicam ainda que, na região Sudeste, ocorreu uma redução de 13,37% de óbitos, seguida pelo Sul (12,01%); Centro-Oeste (5,1%); Nordeste (0,66%), e crescimento na região Norte, com 51,87%.

Quanto ao repasse para os hospitais de natureza privada e os de natureza Pública, 67,45 (R\$ 4.439.213.694,41) do total repassado foi direcionado aos primeiros, enquanto 32,55% (R\$ 2.142.179.536,14) aos últimos, em âmbito Nacional. O repasse para os hospitais de natureza privada representou um aumento de 154,04% , enquanto 95,20% as públicas. Os gastos direcionados para os Hospitais de Regime Jurídico Privado no Brasil possuem uma melhor distribuição dos gastos direcionados a Oncologia, a média dos gastos por pacientes foi de R\$ 1.546,38 no privado, enquanto que R\$ 1.334,11 no privado, acumulando R\$ 10.824,66 e R\$ 9.345,76 respectivamente. Enquanto ao quantitativo de óbitos, a rede privada consta com 62,15% dos óbitos ocorridos nas suas dependências contra 37,85% nas unidades públicas, e crescimento de 33,57% e 28,44% respectivamente, conforme a figura 1.

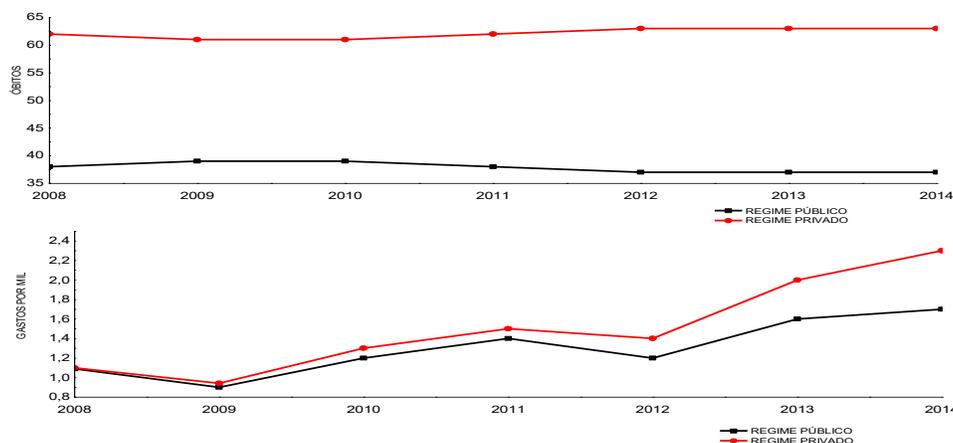


Figura 1 – Distribuição dos gastos em Oncologia por paciente e óbitos no Brasil no período de 2008 a 2014, de acordo com a Natureza Jurídica do Hospital (fonte: Sistema de Informação Hospitalar/Sistema Único de Saúde - SIH/SUS).

Os dados refletem uma oscilação na quantidade de internamentos hospitalares na rede pública de saúde, contrapondo-se à rede privada, que apresentou um constante crescimento. A divergência entre os dois regimes fica mais clara a partir do tempo de permanência dos pacientes: a cada 220 dias de internações ocorridas, 110 (50%) concentram-se na rede privada e 110 (50%) na pública. É possível observar também que os hospitais de regime privado internam e aprovam mais AIHs, neste caso, concentrado-se mais na rede privada. Quanto à taxa de mortalidade, observa-se uma razão média de 0,9 ( $190/100 = 47,37\%$  Privada e  $52,63\%$  Pública), neste caso, concentrando-se mais na rede pública.

A capacidade de internação é interligada aos dias de permanência de cada usuário e os valores das AIHs são proporcionais aos tipos de procedimentos realizados nesses usuários. Em suma, toda a estrutura ambulatorial e hospitalar contribui no encarecimento dos custos do tratamento oncológico. Neste aspecto, os hospitais de natureza jurídica privada vêm se sobressaindo nos últimos anos em relação às unidades públicas, pois internam mais pacientes para o tratamento hospitalar do câncer, gastam mais para seu tratamento e realizam mais procedimentos; contudo, possuem uma menor taxa de mortalidade.

Frenk (2006) problematiza a questão dos Sistemas de Saúde nos países serem únicos, auxiliado pela ideia que são centrados e propostos para as classes sociais de baixo poder aquisitivo. O cenário do SUS ratifica corrobora o autor pois, apesar da proposta constitucional ter assumido que este seja universal e único, o baixo investimento orçamentário dos entes da Federação - assim como o aumento crescente da participação privada nas ações de saúde e na captação dos recursos públicos - demonstra um privilégio do privado em detrimento do público.

A regulamentação do SUS estabelece que o setor privado poderá participar de forma complementar quando o serviço público não tiver capacidade em ofertar a assistência necessária aos usuários (Brasil, 2013). Porém, segundo a Associação Brasileira de Instituições Filantrópicas de Combate ao Câncer, observa-se que em Pernambuco a maior parte das internações para a realização da assistência oncológica hospitalar está concentrada nas unidades de natureza



jurídica privada (60%), indo de encontro ao critério de complementação, causando maiores gastos público direcionados a essas unidades de saúde (BRASIL, 2014c).

O aumento no quantitativo de pacientes oncológicos no Brasil atendidos nos Centros de referências (CACON e UNACON) é proporcionado pela melhoria ao acesso dos recursos disponíveis, maior capacidade resposta terapêutica aos procedimentos realizados e no diagnóstico da neoplasia. Entretanto, aos gastos públicos, o próprio tratamento é compreendido como oneroso, aos quais, envolvem gastos diretos e indiretos para a realização ao tratamento especializado (INCA, 2011).

Anúnciação, (2013) constatou que os custos totais (SIH+SIA) direcionados as UNACON no Brasil foram de R\$ 88,5 bilhões, com 711.542 procedimentos realizados. A região Sudeste foi a que mais demandou gastos, totalizando 57% do valor alocado pelo Brasil, chegando a registrar R\$ 48.081.674,72. Contrapondo-se a isso, as regiões Norte e Nordeste foram as que menos tiveram gastos associados ao tratamento, contabilizando R\$ 2.083.150,14 (2%) e R\$ 13.722.324,49 (15%), respectivamente.

Apesar do Sudeste ter sido a região que demandou maiores gastos em oncologia, verificou-se que na região Nordeste o gasto médio de cada internação representou 26,94%, enquanto no Sudeste, 21,44%. Isto leva a crer que os usuários moradores do Nordeste estariam acessando as unidades de referência tardiamente, demandando uma assistência mais complexa e onerosa.

Os Gestores em saúde de cada estado, mesmo com escassez de recursos financeiros para o atendimento equânime, buscam proporcionar os serviços de forma interligada aos pacientes de sua região. Porém, não se garante a logística dos pacientes aos serviços de referência: muitas vezes, fica a cargo do próprio paciente custear toda a estrutura extra para deslocamento e estadia nos hospitais, até a realização da cirurgia. Essa problemática deve ser enfrentada, pois dificulta o acesso dos usuários moradores de áreas mais distantes e, conseqüentemente, a chance de tratamento em tempo oportuno.

Rodrigues e Ferreira, (2015) corroboram na compreensão de se entender o perfil epidemiológico de uma localidade. Neste contexto, partindo do pressuposto na implementação de Políticas Públicas adequadas a realidade da região, associada a sua atuação de abrangência aos pacientes oncológicos atendidos no SUS.

Marconato *et al.* (2011), em seu estudo com ênfase em Oncologia geral, afirmam que nos anos de 2005 e 2006, o SUS em São Paulo forneceu R\$ 16.536,81 para a realização de mutirões direcionados ao tratamento oncológico e, em média, R\$ 2.706,71 ao ano. A quimioterapia despontou como o procedimento de maior custo para o setor saúde, contribuindo com R\$ 9.450,65 do custo (57,15%). No presente estudo, o total aprovado em Pernambuco foi de R\$ 543.120.987,22 com média de R\$ 77.588.712,46 ao ano. Deste total, R\$ 173.867.364,80 foram alocados principalmente para a realização de Quimioterapia paliativa - adulta (32,01% total dos gastos ambulatoriais).

No que se refere à natureza jurídica, estudo realizado no estado do Rio de Janeiro demonstrou a participação mais ativa da rede pública, com demanda de 73,5% dos atendimentos por câncer de mama contra 26,5% da privada (Brito, Portela e Vasconcellos, 2005). Um levantamento realizado em Porto Alegre com foco nos mesmo indicadores hospitalares utilizados no presente trabalho mostrou que o regime público se sobressaiu em relação ao privado, com as seguintes relações entre Hospitais de Natureza Privada e Pública na abrangência geral em



oncologia: Taxa de mortalidade (0,72); AIH (0,91); dias de permanência (0,97); média de permanência (0,94) (Kluck, 2014).

Questiona-se, contudo, a diminuição do papel do Estado enquanto agente regulador, devido ao fomento à ampliação da oferta de serviços da rede privada no SUS. Esta questão corrobora Mendes e Weiller (2015), que demonstraram que iniciativas do Estado - o aumento da cobertura dos planos privados de saúde, a renúncia fiscal, as deduções dos gastos direcionados para esses planos nos impostos de renda e as concessões fiscais vinculadas a hospitais sem fins lucrativos - como estratégias de fortalecer o setor privado em saúde, em contraposição ao financiamento do setor público.

#### 4. CONCLUSÃO

Salienta-se a importância de estudos mais aprofundados para se avaliar a real situação dos gastos envolvidos com todos os processos diretos e indiretos no tratamento oncológico. Não foram encontrados estudos voltados para custos com tratamento que realizassem uma comparação dos gastos envolvidos nos hospitais de natureza pública e privada ou uma abordagem mais macro por estado e/ou região brasileira, reforçando que as abordagens das pesquisas são centralizadas na realização de um determinado procedimento.

Algumas ações ou serviços não serão possíveis à descentralização, o que impõe aos usuários longos deslocamentos. Um sistema logístico eficaz e seguro para garantir que os usuários possam ter acesso aos seus tratamentos são fundamentais para aumentar as chances de sucesso do tratamento e diminuição das taxas de mortalidade. Pontua-se a dificuldade encontrada para se realizar comparações adequadas sobre a temática abordada, haja vista, estudos científicos sobre este tema serem escassos na literatura especializada.

Reforça-se a necessidade de esforço político para uma distribuição equitativa dos gastos, levando-se em conta investimentos nas unidades Hospitalares do interior, de maneira a fortalecer a estrutura geral do tratamento oncológico, aumentar o número de diagnósticos precoces, reduzir as taxas de morbi-mortalidade e dos custos indiretos associados ao tratamento dos pacientes.

#### 5. REFERÊNCIAS

ANUNCIACÃO, V.K.T. Câncer de mama: análise de custos dos procedimentos assistenciais dos hospitais habilitados como Unidade de Assistência de Alta Complexidade em Oncologia em 2011 no Brasil. Brasília, 2013. Trabalho de Conclusão de curso (Graduação em Saúde Coletiva) - Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia.

BRASIL. PORTARIA Nº 2.439/GM DE 8 DE DEZEMBRO DE 2005 a. Institui a Política Nacional de Atenção Oncológica: Promoção, Prevenção, Diagnóstico, Tratamento, Reabilitação e Cuidados Paliativos, a ser implantada em todas as unidades federadas, respeitadas as competências das três esferas de gestão.

\_\_\_\_\_. PORTARIA Nº 741 DE 19 DE DEZEMBRO DE 2005b. Disponível em: [portal.anvisa.gov.br](http://portal.anvisa.gov.br). Acessado em: 16 de agosto de 2015;

\_\_\_\_\_. Sítio do INCA (Instituto Nacional do Câncer). Disponível em: [http://portal.saude.sp.gov.br/resources/ses/perfil/gestor/homepage/estimativas-de-incidencia-de-cancer-2012/estimativas\\_incidencia\\_cancer\\_2012.pdf](http://portal.saude.sp.gov.br/resources/ses/perfil/gestor/homepage/estimativas-de-incidencia-de-cancer-2012/estimativas_incidencia_cancer_2012.pdf). Acessado em: 12 de outubro de 2016.



\_\_\_\_\_. PORTARIA Nº 874, DE 16 DE MAIO DE 2013. Institui a Política Nacional para a Prevenção e controle do câncer na rede de atenção à saúde das Pessoas com Doenças Crônicas no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS).

\_\_\_\_\_. Sítio do INCA (Instituto Nacional do Câncer). Disponível em: [http://www.inca.gov.br/rbc/n\\_60/v01/pdf/11-resenha-estimativa-2014-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf](http://www.inca.gov.br/rbc/n_60/v01/pdf/11-resenha-estimativa-2014-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf). 2014a. Acessado em: 20 de outubro de 2015.

\_\_\_\_\_. PORTARIA Nº 140 DE 27 DE FEVEREIRO DE 2014. Redefine os critérios e parâmetros para organização, planejamento, monitoramento, controle e avaliação dos estabelecimentos de saúde habilitados na atenção especializada em oncologia e define as condições estruturais, de funcionamento e de recursos humanos para a habilitação destes estabelecimentos no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). 2014b.

\_\_\_\_\_. Sítio Abaific (Associação Brasileira de Instituições Filantrópicas de Combate ao Câncer). Disponível em: <http://www.abificc.org.br/publicacoes/noticias/exibir/?id=71>. 2014c. Acessado em: 20 de outubro de 2015.

BRITO, C; PORTELA, M.C; VASCONCELLOS, M.T.L. Assistência oncológica pelo SUS a mulheres com câncer de mama no Estado do Rio de Janeiro. *Rev Saúde Pública* 2005; 39(6):874-881.

COSTA, T.C; LOPES, M; ANJOS, A.C.Y; ZAGO, M.M.F. Neuropatia periférica induzida pela quimioterapia: revisão integrativa da literatura. *Rev Esc Enferm USP*, São Paulo · 2015; 49(2):332-341.

FRENK J; GONZALEZ-P.I.E.R.E; GOMEZ-DANTES O; LEZANA M.A; KNAUL F.M. Comprehensive reform to improve health system performance in Mexico. *Lancet* 2006; 368: 1524–34.

KLUCK, M.M; BAVARESCO, A.P; ZAT, T; BONI, A; PEZZINI, D.A; SCHMIDT, A; FONTANARI, A.M.V. Análise de indicadores de qualidade em saúde por subgrupos SUS e outros pagadores: modelo de gestão do HCPA mantém equidade. Hospital de clínicas de porto alegre. SEMANA CIENTÍFICA. (34. ; 01-05 SET. 2014: PORTO ALEGRE, RS).

MARCONATO, R.R.F; SOÁREZ, P.C; CICONELLI, R.M. Custos dos mutirões de mamografia de 2005 e 2006 na Direção Regional de Saúde de Marília, São Paulo, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 27(8):1529-1536, ago, 2011.

MENDES, Á; WEILLER, J.A.B. Renúncia fiscal (gasto tributário) em saúde: repercussões sobre o financiamento do SUS. *Saúde debate*, Rio de Janeiro, v. 39, n. 105, p. 491-505, jun. 2015.

PAIVA, C.J.K.. Câncer de mama no Hospital de Câncer de Pernambuco: perfil sociodemográfico e aspectos relacionados ao atraso no diagnóstico e tratamento. Recife, 2013. Dissertação de mestrado (Mestrado Profissional em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

PAIVA C.J.K; CESSÉ E.A.P. Aspectos-relacionados-ao-atraso-no-diagnostico-e-tratamento-do-cancer-de-mama-em-uma-unidade-hospitalar-de-pernambuco. *Rev Brasileira de Cancerologia* 2015; 61(1): 23-30.

RODRIGUES, J.S.M; FERREIRA, N.M.L.A. Caracterização do perfil epidemiológico do Câncer em uma cidade do interior Paulista: conhecer para intervir. *Rev. bras. cancerol*; 56(4): 431-441, out./dez. 2010.

## 6. AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pernambuco e, em particular, ao Programa de Pós-Graduação em Gestão e Economia da Saúde, que tornaram possível o desenvolvimento desta pesquisa.



ÁREA DE SUBMISSÃO: GESTÃO, ECONOMIA E SAÚDE – GE 23

## SISTEMA DE COTAS: PREFERÊNCIAS PROFISSIONAIS E ÁREAS DE ATUAÇÃO DE MÉDICOS EGRESSOS DE UMA UNIVERSIDADE PÚBLICA BRASILEIRA

D. G. MARTINS<sup>1</sup>, T. R. S. NUNES<sup>2,3</sup>, T. A. MENEZES<sup>1</sup>, T. F. SOBEL<sup>4</sup>, M. J. B. M. REGO<sup>1,2,3</sup> e M. G. R. PITTA<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Sociais Aplicadas, Programa de Pós-Graduação em Gestão e Economia da Saúde

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino

<sup>4</sup> Universidade Federal da Paraíba

dilanemartins@yahoo.com.br

**RESUMO** – *Buscou-se identificar as preferências profissionais e áreas de atuação dos médicos egressos da Universidade de Pernambuco beneficiados pela política de cotas. A pesquisa foi de abordagem quantitativa, com espaço amostral inicial de 300 médicos, sendo 20% cotistas e 80% não cotistas, o que representa a oferta de dois anos de vagas para o curso de medicina no âmbito da UPE e, para a época do recorte, mais de um terço da oferta de vagas para medicina no âmbito de Pernambuco. Dessas 300, 293 médicos foram considerados: os que ingressaram entre os anos de 2006 e 2007 e que colaram grau até 2013. Este total foi subdividido entre 55 cotistas (grupo de tratamento) e 238 não cotistas (grupo controle). Os dados primários consistem no levantamento de um questionário respondido por 167 médicos do universo de 293, sendo 132 não cotistas (55,46%) e 35 cotistas (63,63%). Uma proporção muito maior de cotistas atua na Atenção Básica do SUS (31,4%) em relação aos não cotistas (8,3%). Na Residência Médica, por outro lado, observa-se que quase 65% dos não cotistas se encontram inserida no programa, contra 28,6% de cotistas. Em relação aos que pretendem cursá-la, a proporção de cotistas (68,8%) corresponde a mais do que o dobro dos não cotistas (32,8%). Também pôde ser observado que a média da renda familiar dos cotistas no ingresso do curso corresponde a menos de 1/3 da renda dos não cotistas. Em relação às áreas de concentração, os cotistas estão em cirurgia geral, clínica médica, ginecologia e obstetrícia, ortopedia e traumatologia e pediatria - especialidades na média da concorrência.*

*Palavras-chave: Ações afirmativas; Medicina; Pernambuco.*



*ABSTRACT - This study aimed to identify professional preferences and areas of action of medical school graduates of the University of Pernambuco (UPE) who were supported by affirmative actions such as the Quotas Act. The quantitative research's initial sample was of 300 physicians, 20% of which supported by the Quotas Act and 80% of which not. This amount is equivalent to two years of opening of positions for graduation students at UPE's medical school and also overall a third of the total opening of positions for medical school graduation in the state of Pernambuco. 293 out of 300 physicians matched criteria and were selected into the research: those who enrolled between 2006 and 2007 and also graduated by 2013. The amount was divided between the treatment group (55 quota holders) and the control group (238 non quota holders). Primary data consist of a questionnaire answered by 167 physicians out of the 293 total, 132 (55,46%) of which being non quota holders and 35 (63,63%) of which being quota holders. A much larger proportion of quota holders acting in SUS basic care (31,4%) compared to non-quota holders (8,3%). In Residency, on the other hand, it is observed that almost 65% of quota holders are not inserted in the program, against 28,6% of non quota holders. Regarding the claim that attends it, the proportion of quota holders (68,8%) corresponds to more than double the non quota holders (32,8%). It could also be noted that the average family income of the quota holders in the course of the ticket is less than 1/3 of the income of non quota holders. Regarding the areas of concentration, the quota holders are in general surgery, internal medicine, obstetrics and gynecology, orthopedics and traumatology and pediatrics - specialties in the middle of the competition.*

*Keywords: affirmative actions; medical school; Pernambuco*

## 1. INTRODUÇÃO

As ações afirmativas são mecanismos de propulsão para a elaboração das políticas de inclusão social, sendo o sistema de cotas uma espécie do gênero “ação afirmativa”. Sua utilização para o ingresso nas Universidades Públicas brasileiras veio como uma resposta à dificuldade de acesso dos alunos egressos de escolas públicas, considerando que os critérios do exame vestibular brasileiro reafirmavam a valorização do mérito individual e desconsideravam os efeitos discriminatórios na formação educacional, desde o início da escolarização (Guarnieri; Melo-Silva, 2007).

A partir dessa premissa, começou-se a discutir políticas públicas de inclusão dos jovens que se encontravam em situação de desvantagem, seja por critérios sociais de origem escolar, econômicos ou etnia. A Universidade de Pernambuco (UPE) adota as cotas sociais, cuja normatização ocorreu por Resolução do Conselho. Trata-se da reserva de 20% das suas vagas aos alunos das escolas públicas, embora indiretamente colabore com um maior número de inserção de estudantes pretos e pardos (Andrade, 2012).

Apesar de ser um tema polêmico, o sistema de cotas para o ingresso nas universidades públicas tem sido aprovado pelo Supremo Tribunal Federal - STF, que é o órgão máximo do Poder Judiciário brasileiro. Essa corte suprema tem reconhecido a constitucionalidade dessa espécie de ação



afirmativa, ou seja, tem entendido que se trata de política pública para tratar de forma diferente os desiguais.

Em 2012, o Poder Legislativo Federal editou a Lei nº 12.711, que determina a reserva de 50% das vagas existentes nas universidades públicas federais e Institutos Federais de ensino técnico ou superior para estudantes de escolas públicas. Dentro desse percentual, é garantida aos candidatos pretos, pardos e indígenas a proporção da sua etnia no respectivo Estado da Federação, conforme dados mais recentes do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

Guarnieri e Melo-Silva (2007), através de uma revisão de literatura acerca das ações afirmativas na educação superior do tipo estado da arte, evidenciaram que, nas fontes consultadas, não foram encontrados trabalhos sobre a influência das ações afirmativas no comportamento de escolha da carreira. Durante a elaboração da presente pesquisa, foram realizadas novas buscas nos sites de publicações acadêmicas, como o Scielo, Pubmed e Lilacs acerca da associação da política de cotas com a carreira profissional, mas não foram encontrados resultados. O acompanhamento regular e sistemático de egressos é uma prática incomum em diversas áreas, especialmente entre instituições formadoras de profissionais de saúde (Koch *et al.*, 2011).

Este trabalho foi desenvolvido para se observar os médicos oriundos das cotas universitárias, beneficiários de ações afirmativas. Qual seria a evolução desses profissionais entre a entrada no curso e a colação de grau (sendo essa informação uma das formas de se avaliar o próprio programa)? Haveria alguma tendência de atuarem em maior proporção em determinado setor da saúde? Seriam áreas de políticas públicas que buscam diminuir as iniquidades em saúde? Não foi encontrado estudo semelhante até a presente data.

Assim, buscou-se caracterizar o perfil socioeconômico dos médicos que ingressaram entre os anos de 2006 e 2007 na Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Pernambuco através do sistema de cotas e que colaram grau até 2013. Analisou-se o impacto do programa no que diz respeito ao desempenho desses estudantes na instituição – e seu retorno para a sociedade através de suas preferências profissionais.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de uma investigação exploratória, de corte transversal, com análise descritiva e abordagem quantitativa, baseada em dados primários obtidos através da aplicação de um questionário semiestruturado aos médicos egressos da UPE nos anos de 2006 e 2007 que colaram grau até 2013. Os questionários foram aplicados pessoalmente, entre agosto e setembro de 2014. Também foram utilizados dados secundários, que compreendem a nota de entrada no curso (vestibular) e a média geral no curso de medicina, disponibilizadas pela Universidade.

Como estratégia empírica, para se avaliar o impacto da ação afirmativa quanto ao desempenho dos cotistas, não se pode testar a diferença de médias da variável supostamente afetada pelo programa porque são grupos heterogêneos. Os cotistas se autosselecionam. O objetivo do método aplicado foi encontrar um grupo de comparação ideal em relação ao grupo de tratamento a partir de uma amostra de não cotistas. O grupo de comparação é emparelhado ao grupo de tratamento através de uma série de características observáveis ou por meio do *propensity score* (escore de propensão ou probabilidade predita de participação) (Resende; Oliveira, 2008).

Foram observados os tipos de vínculo com a Atenção Básica e na Residência Médica – esta

última, levando-se em consideração as expectativas de ambos os grupos Ademais, foram igualmente levantadas as médias da renda familiar e das rendas públicas de ambos os grupos, além das áreas de escolhidas pelos egressos para a Residência Médica.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação à atuação na Atenção Básica, a figura 1 demonstra a atuação de médicos cotistas e não cotistas.

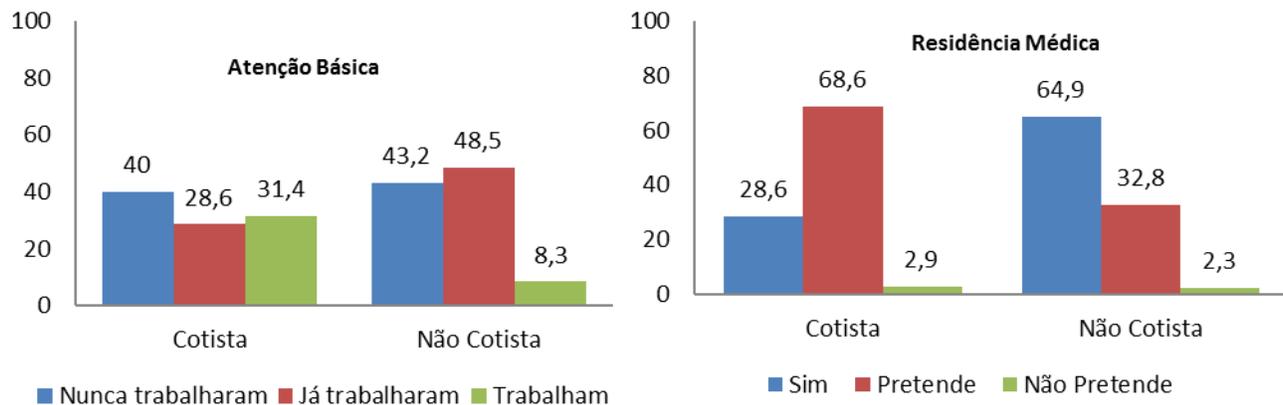


Figura 1 - Atuação dos médicos egressos da UPE na Atenção Básica (A) e na Residência Médica (B), expressos em porcentagem. Fonte própria.

Na Atenção Básica, uma proporção muito maior de médicos do grupo de cotistas trabalha no setor, o que corresponde a 31,4% do grupo (Figura 1A). Esses dados merecem atenção particular, uma vez que a Atenção Primária é um dos setores que o SUS denomina de área prioritária. Existe uma dificuldade de se alocar médicos para essa área, além da alta rotatividade. Caovilla *et al.* (2008) mostram que apenas 6,25% dos egressos em uma Faculdade no Rio Grande do Sul atuam na saúde da família, dados semelhantes aos 8,3% de não cotistas encontrados na mesma situação, no presente estudo.

Na Residência Médica, por outro lado, observa-se que quase 65% dos não cotistas se encontram inserida neste programa, contra 28,6% de cotistas (Figura 1B). Em relação aos que pretendem cursar a Residência Médica, a proporção de cotistas (68,8%) corresponde a mais do que o dobro dos não cotistas (32,8%).

Este fato pode ser atribuído à situação socioeconômica dos cotistas. Dessa forma, ao entrar no mercado de trabalho, esses jovens procuram compensar sua necessidade emergencial, uma vez que os programas de Residência Médica têm uma sobrecarga de atividades e horários, e as bolsas não remuneram tão bem como qualquer atividade voltada à clientela SUS ou privada.

Também pôde ser observado no levantamento que a média da renda familiar dos não cotistas no ingresso do curso ultrapassou os 10 salários mínimos, enquanto que a média familiar dos cotistas não chegou a 3 salários mínimos, menos de 1/3 da renda dos não cotistas.

Antagonicamente, à época da pesquisa, a média das rendas públicas dos cotistas foi de 4,5 a 6 salários mínimos, enquanto a dos não cotistas, de 3 a 4,5. Foi observada a mesma média das rendas

privadas para os dois grupos: acima de 1,5 a 3 salários mínimos. O valor mais reduzido das rendas públicas dos não cotistas pode ser causado pela remuneração que recebem da bolsa de residência, que é mais baixa do que o valor pago pelo mercado de trabalho a esses profissionais. O estudo de Castellanos *et al.* (2009) demonstra que aproximadamente 70% dos egressos ganham acima de 7 salários mínimos, mas há de se considerar o tempo de atuação desses egressos no mercado de trabalho (alguns chegam a ter 30 anos de formados).

Sobre a escolha da residência médica, a tabela 1 esclarece a distribuição.

Tabela 1 - Áreas da Residência Médica escolhidas pelos egressos de 2013 no curso de Medicina da UPE.

	Cotas (n= 10)	Não cotas (n=85)
1=Acupuntura	-	-
2=Anestesiologia	-	6
3=Cirurgia Geral	1	12
4=Clínica Médica	3	31
5=Dermatologia	-	1
6=Infecologia	-	-
7=Medicina de Família e Comunidade	-	1
8=Neurologia	-	3
9=Obstetrícia e Ginecologia	2	-
10=Oftalmologia	-	4
11=Ortopedia e Traumatologia	1	5
12=Otorrinolaringologia	-	2
13=Patologia	-	-
14=Radiologia e diagnóstico por imagem	-	5
15=Pediatria	2	9
16=Psiquiatria	-	6
17=Neurocirurgia	-	4

Pode-se observar que os cotistas estão concentrados nas áreas de cirurgia geral, clínica médica, ginecologia e obstetrícia, ortopedia e traumatologia e pediatria, que são especialidades na média da concorrência, de acordo com a listagem de concorrência divulgada pela Secretaria de Saúde de Pernambuco e pelo Hospital das Clínicas de Pernambuco.

A tabela 2 mostra o quantitativo de médicos que está fazendo uma segunda Residência Médica. Observe-se a impossibilidade de se considerar os médicos que ingressaram em 2007 e colaram grau no ano de 2013, pois ainda estão cursando a primeira residência. Deste grupo, puderam responder apenas os médicos com entrada em 2006.



Tabela 2 - Residência médica 2ª especialidade

	Cotas (n= 0)	Não cotas (n=9)
1=Cardiologia	-	3
2=Nefrologia	-	1
3=Reumatologia	-	1
4=Geriatria	-	2
5=UTI pediátrica	-	1
6=Radiologia	-	1

Nenhum cotista de 2006 que participou da pesquisa estava cursando segunda Residência Médica. Esse fato também pode representar uma opção pela atuação generalista dos cotistas ou por terem pouco tempo de estudo para as provas, diante da maior urgência em se inserirem no mercado de trabalho.

#### 4. CONCLUSÃO

Preliminarmente, foi verificada uma tendência de atuação do jovem médico egresso das cotas da UPE na Atenção Básica, seja pela necessidade de se inserir no mercado assim que conclui o curso, atrasando a entrada em residências e especializações (reforçado pela baixa renda familiar em relação aos não cotistas), seja pela vontade de trabalhar nas comunidades. De qualquer forma, esta é uma área de prioridade do SUS que demanda a atuação de muitos profissionais. Os autores sugerem fortemente o desenvolvimento de trabalhos de cunho qualitativo para aprofundar essas questões.

#### 5. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, F. J. *Classe, Raça e Ação Afirmativa: a política de inclusão social numa universidade pública de Pernambuco* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2012.
- CAOVILLA, F.; LEITZKE, L.; MENEZES, H. S.; MARTINEZ, P. F. Perfil do médico egresso do Curso de Medicina da Universidade Luterana do Brasil (Ulbra). *Rev da AMRIGS*, v. 52, n. 2, p. 103-109, 2008.
- CASTELLANOS, M. E. P.; SILVEIRA, A. F. M. H.; MARTINS, L. C.; NASCIMENTO, V. B.; SILVA, C. S.; BORTOLLOTTE, F. H.; GARCIA, J. B.; ELIAS, P. E.; AKERMAN, M. Perfil dos egressos da Faculdade de Medicina do ABC: o que eles pensam sobre atenção primária em saúde? *Arq. Bras. Ciên. Saúde*, v. 34, n. 2, p. 71-79, 2009.
- GUARNIERI, F. V.; MELO-SILVA, L. L. Ações afirmativas na educação superior: rumos da discussão nos últimos cinco anos. *Psicologia e Sociedade*, v. 19, n. 2, p. 70-78, 2007.
- KOCH, V. H.; DORIA-FILHO, U.; BOLLELA, V. R. Avaliação do programa de residência médica do departamento de pediatria da faculdade de medicina da Universidade de São Paulo. *Rev. Bras. Educ. Med.*, v. 33, n. 4, p. 454-459, 2011.
- RESENDE, A. C. C.; OLIVEIRA, A. M. H. C. Avaliando resultados de um programa de transferência de renda: o impacto do bolsa-escola sobre os gastos das famílias brasileiras. *Estud. Econ.*, v. 38, n. 2, p. 235-265, 2008.



ROSEMBAUM, P. R.; RUBIN, D. B. The central role of propensity score in observational studies for causal effects. *Biometrika*, v. 70, n. 1, p. 41-55, 1983.

## **6. AGRADECIMENTOS**

Registramos os nossos agradecimentos ao Ministério da Saúde, que subsidiou o programa PPGGES e que acreditou na busca de novos métodos para o desenvolvimento da saúde no Brasil. Agradecemos também a todos os profissionais que colaboraram com a execução deste trabalho.



ÁREA DE SUBMISSÃO: GESTÃO ECONOMIA E SAÚDE – GE 24

## APLICAÇÃO DO CUSTEIO VARIÁVEL EM UMA CLÍNICA ESCOLA DE FONOAUDIOLOGIA

I. A. L. N. XAVIER<sup>1</sup>, F. A. RIBEIRO<sup>2</sup> e U. C. T. L. TORRES<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Fonoaudiologia, Mestre em Gestão e Economia da Saúde

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Mestre em Gestão e Economia da Saúde

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Sociais Aplicadas, Departamento de Ciências Contábeis

ivanaarrais@hotmail.com

**RESUMO** – *O objetivo deste estudo foi caracterizar os custos da Clínica de Fonoaudiologia Professor Fábio Lessa e descrever as etapas de apuração dos custos pela metodologia de custeio variável. Os dados foram coletados por análise documental, entrevistas não estruturadas e observação direta da clínica, no ano de 2015, consolidados em planilhas do Excel, analisados por meio da estatística descritiva e apresentados na forma de tabelas e gráficos favorecendo sua análise e discussão. O estudo evidenciou que a receita obtida através dos atendimentos realizados, com base na tabela SUS, não é suficiente para cobrir o Custo Total da clínica, sendo que o resultado apurado é negativo. Conclui-se que a clínica funciona com déficit de receita e que a tabela SUS não garante a cobertura integral dos custos desta instituição. Estes dados apontam a necessidade de um gerenciamento de custos eficaz, fundamental quando há escassez de recursos e se objetiva conter gastos, sem perder a qualidade do serviço prestado.*

**Palavras-chave:** *Gestão de custos na saúde; Métodos de custeio; Apuração de custos; Clínica de fonoaudiologia.*

**ABSTRACT** – *The objective of this study was to characterize the costs of Clinical Speech Teacher Fabio Lessa describe the steps of calculating the costs for variable costing methodology. Data were collected by documentary analysis, unstructured interviews and direct observation of the clinic, in 2015, consolidated into Excel spreadsheets, analyzed using descriptive statistics and presented in tables and graphs facilitating analysis and discussion. The study showed that the revenue obtained through the care provided, based on the SUS is not enough to cover the total cost of the clinic, and the calculated result is negative. We conclude that the clinical work with*



*revenue deficit and that SUS does not guarantee full coverage of the costs of this institution. These data point to the need for effective cost management, which is essential when there is scarcity of resources and aims to contain costs without compromising quality of service.*

*Keywords: Cost management in health; costing methods; Calculation of costs; speech therapy clinic.*

## 1. INTRODUÇÃO

A contabilidade de custos é ferramenta fundamental em qualquer tipo de instituição, pois proporciona ao gestor uma visão mais acurada e ampliada da realidade financeira e conseqüentemente traz benefícios relacionados à melhor aplicação de recursos (Almeida; Borba; Flores, 2009).

Na área da saúde, houve uma crescente preocupação com o controle dos custos e uma ampliação das referências sobre custos nos últimos anos. A Clínica de Fonoaudiologia Professor Fábio Lessa (CFPFL), objeto de análise deste estudo, é uma clínica escola e teve, recentemente, sua estrutura física ampliada, com inauguração do novo espaço em 21 de outubro de 2013. Com a expansão do espaço físico e aumento na capacidade de atendimento da clínica houve um aumento dos gastos e uma maior necessidade de conhecer e utilizar as informações de custos para auxiliar no planejamento e gerenciamento das atividades.

Por ser uma instituição pública de ensino agrega, além da prestação de assistência fonoaudiológica à população, atividades de ensino, pesquisa e extensão e, é referência em tecnologia, características que incrementam seus custos quando é crescente a exigência do governo e da sociedade pela racionalização dos custos e despesas. Vale ressaltar, que a complexidade dos atendimentos, a concentração de serviços fonoaudiológicos especializados com forte demanda por atualização tecnológica e a existência de curso de pós-graduação fazem com que a clínica tenha grande necessidade de investir em novos espaços físicos, tecnologia e equipamentos.

Além da nova estrutura física, a clínica finalizou, recentemente, processo de credenciamento ao Sistema Único de Saúde – SUS, através da Secretaria Municipal de Saúde do Recife, o que proporcionará uma expansão na qualidade e quantidade de atendimentos ofertados.

Neste aspecto, é notória a relevância da apuração dos custos desta instituição, no sentido de subsidiar os gestores na tomada de decisões. O objetivo do estudo foi, portanto, caracterizar os custos da Clínica de Fonoaudiologia Professor Fábio Lessa e descrever as etapas de apuração dos custos pela metodologia de custeio variável.

Este estudo justifica-se pela necessidade de conhecer os custos desta instituição e utilizar estas informações como instrumento de gestão e organização do processo de trabalho. Acredita-se que a apuração e mensuração dos custos proporcionará a utilização mais eficiente dos recursos a partir do uso das informações na tomada de decisão. Contribui, ainda, para a literatura de custos em saúde, uma vez que os estudos nessa área são escassos e mais voltados para organizações hospitalares.



## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

Trata-se de um estudo de caso, cuja unidade de análise foi a CFPFL, uma clínica escola vinculada ao curso de fonoaudiologia da UFPE, que oferece atendimento gratuito a população nas especialidades de Linguagem, Audiologia, Motricidade Orofacial, Disfagia e Voz, sendo o público alvo constituído por pacientes de todas as faixas etárias. Desenvolve atividades tais como: estágios curriculares, aulas práticas, atividades de extensão, triagens, avaliações, exames, atendimento terapêutico individual e/ou grupo, estudos de casos, pesquisa, estudo dirigido e campanhas educativas.

A clínica em estudo não possui um sistema de informação de custos. Os dados foram coletados através da análise documental, entrevistas não estruturadas e da observação direta e sistemática durante a rotina na clínica, no ano de 2015.

Além da coleta dos elementos de custos, foi também verificado o valor correspondente às receitas oriundas por cada procedimento utilizando-se como referência o Sistema de Gerenciamento da Tabela de Procedimentos, Medicamentos e OPM (Órtese, Prótese e Materiais) do SUS – SIGTAP.

Os dados coletados foram consolidados em planilhas do Excel elaboradas com base nos conceitos relacionados ao método de custeio variável. A análise dos dados deu-se por meio da interpretação dos valores extraídos das planilhas, complementados pelo uso da estatística descritiva e apresentados na forma de tabelas e gráficos favorecendo sua análise e discussão. Para cálculo dos dados utilizou-se as médias mensais.

Os custos dos procedimentos foram apurados por meio da metodologia de custeio variável. Optou-se pelo uso do custeio variável, pois através deste método foi possível estudar os custos em função do volume de procedimentos fonoaudiológicos realizados. Ou seja, a metodologia de custeio variável possibilitou analisar se a quantidade de procedimentos que a clínica realiza é suficiente para pagar seus custos e despesas fixas e gerar receita.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Inicialmente os custos da clínica foram classificados em fixos e variáveis. Os custos fixos representam 98,18% dos custos totais da clínica, enquanto que os custos variáveis representam 1,82%. Dentre os custos fixos, evidencia-se que o gasto com a folha de pagamento representa o maior custo da clínica (R\$40.754,79). Os gastos com esse grupo de custos representam 86,80% dos custos totais e 88,41% dos custos fixos da clínica.

Quadro 1 - Custos fixos. CFPFL, 2015.

CUSTOS FIXOS	SUBTOTAL MENSAL	SUBTOTAL ANUAL	Sub Total		Sub Total	
	R\$ 46.097,38	R\$ 553.168,55	Mensal	Acumulado	Anual	Acumulado
1 RECURSOS HUMANOS	R\$ 40.754,79	R\$ 489.057,42	88,41%	88,41%	88,41%	88,41%
RECURSOS HUMANOS OPERACIONAL/ATENDIMENTO	R\$ 37.006,17	R\$ 444.074,03				
RECURSOS HUMANOS APOIO	R\$ 3.748,62	R\$ 44.983,39				
2 CUSTOS PREDIAIS	R\$ 3.295,29	R\$ 39.543,48	7,15%	95,56%	7,15%	95,56%
3 DEPRECIAÇÃO - MÓVEIS, MÁQUINAS E EQUIPAMENTOS	R\$ 1.424,34	R\$ 17.092,12	3,09%	98,65%	3,09%	98,65%
4 FONOAUDIOLÓGICOS/MÉDICO HOSPITALARES	R\$ 483,47	R\$ 5.801,69	1,05%	99,70%	1,05%	99,70%
5 DEPRECIAÇÃO - OUTROS MATERIAIS FONOAUDIOLÓGICOS	R\$ 139,49	R\$ 1.673,84	0,30%	100,00%	0,30%	100,00%

Fonte: Elaborado pela autora

Quanto aos custos variáveis, evidencia-se no Quadro 2 que a maior parcela recai sobre o item materiais de consumo, que somam 66,17% desses custos. Entretanto, no montante dos custos totais, o material de consumo representa apenas 1,20%.

Quadro 2 - Custos variáveis. CFPFL, 2015.

CUSTOS VARIÁVEIS	SUBTOTAL MENSAL	SUBTOTAL ANUAL	Sub Total		Sub Total	
	R\$ 854,32	R\$ 10.251,88	Mensal	Acumulado	Anual	Acumulado
6 MATERIAL DE CONSUMO	R\$ 565,32	R\$ 6.783,84	66,17%	66,17%	66,17%	66,17%
7 MATERIAL DE EXPEDIENTE	R\$ 134,92	R\$ 1.619,00	15,79%	81,96%	15,79%	81,96%
8 MATERIAL DE GRÁFICO	R\$ 154,09	R\$ 1.849,04	18,04%	100,00%	18,04%	100,00%

Fonte: Elaborado pela autora

Após a classificação e análise dos custos fixos e variáveis da clínica foi realizado o cálculo do custeio variável. Por meio do custeio variável foi possível obter a MC, que corresponde à diferença entre o valor da Receita Total e os Custos Variáveis. Como consequência direta dessa equação foi obtido o Ponto de Equilíbrio (PEq) que representa uma importante ferramenta de gestão de resultados operacionais de uma organização e expressa o nível de atividades em que o resultado operacional da empresa é nulo (Abbas; Gonçalves; Leoncine, 2012).

Nessas circunstâncias, para obtenção da Receita Total da clínica, multiplicou-se a média mensal de atendimentos pelos respectivos valores dos procedimentos, com base na tabela de procedimentos do SUS. Esse cálculo demonstra que a Receita Total da clínica, por mês, é de R\$ 4.588,45, conforme evidencia-se no Quadro 3.

Quadro 3 - Receita Total. CFPFL, 2015.



RECEITA TOTAL			
PROCEDIMENTO	MÉDIA MENSAL DE ATENDIMENTOS (A)	VALOR TABELA SUS (B)	RECEITA C=(A x B)
Triagem Fonoaudiológica	16	R\$ 10,90	R\$ 178,76
Terapia MO	96	R\$ 10,90	R\$ 1.044,22
Terapia Voz	59	R\$ 10,90	R\$ 645,28
Terapia Linguagem	138	R\$ 10,90	R\$ 1.508,56
Terapia Disfagia	12	R\$ 10,90	R\$ 130,80
PEATE	16	R\$ 46,88	R\$ 750,08
Audiometria Tonal	7	R\$ 21,00	R\$ 147,00
Logoaudiometria	7	R\$ 26,25	R\$ 183,75
TOTAL			R\$ 4.588,45

Fonte: Elaborado pela autora

Na tabela 1 apresenta-se o cálculo da MC e do PEq da clínica. A MC encontrada no valor de R\$ 3.734,13 indica que a Receita Total (RT) não cobre os custos fixos da clínica (R\$ 46.097,38), ou seja, a instituição não atinge um nível positivo de MC, gerando um déficit mensal de R\$ 42.363,25.

O percentual dos custos variáveis em relação à RT foi de 18,61% e a diferença entre o percentual dos custos fixos em relação aos custos variáveis foi de 81,39%. Enfatiza-se que um elevado custo fixo colabora para o aumento do PEq e ocasiona riscos para a continuidade da atividade operacional.

A análise do PEq em relação à receita aponta um valor de R\$ 56.637,64. Este valor indica que a clínica teria que aumentar sua receita em 91,90% (100% - 8,10%) para suprir seus Custos Totais (Custos Fixos e Variáveis) e alcançar o equilíbrio financeiro, não entrando em déficit financeiro. Este dado demonstra que o nível de cobertura da receita recebida pelos serviços prestados se encontra expressivamente abaixo do que é necessário para cobertura integral de seus custos para operacionalização do serviço.

Tabela 1 – MC, PEq e Déficit de Receita - mensal. CFPFL, 2015.

	DESCRIÇÃO	VALOR (Mensal)
(A)	Receita Total	R\$ 4.588,45
(B)	Total dos custos fixos	R\$ 46.097,38
(C)	Total dos custos variáveis	R\$ 854,32
$D = (A - C)$	<b>MARGEM DE CONTRIBUIÇÃO</b>	R\$ 3.734,13
$E = (C/A)$	% Custos variáveis em relação à receita total	18,61%
$F = (100\% - E)$	% Diferença de custos fixos em relação ao custo variável	81,39%
$G = (B/F)$	<b>Ponto de equilíbrio em relação à receita</b>	R\$ 56.637,64
$H = (A/G)$	% de execução da capacidade de equilíbrio	8,10%
$I = (D - B)$	Déficit da receita	R\$ 42.363,25

Fonte: Elaborado pela autora

Na tabela 2 evidencia-se a MC utilizando como Receita Total o valor do Ponto de Equilíbrio encontrado. Verifica-se que este valor corresponde exatamente à diferença entre o valor da Receita Total e os Custos Variáveis, ou seja, o valor necessário para cobrir os Custos Fixos e manter o

equilíbrio financeiro. Observa-se que há um aumento dos Custos Variáveis para R\$ 10.540,27, já que estes custos se modificam conforme variação da receita.

Tabela 2 - Evidenciação da MC dado PEq encontrado.

	DESCRIÇÃO	VALOR (Mensal)
(A)	Receita Total	R\$ 56.637,64
(B)	Total dos custos fixos (81,39%)	R\$ 46.097,38
(C)	Total dos custos variáveis (18,61%)	R\$ 10.540,26
<i>D = (A - C)</i>	<i>MARGEM DE CONTRIBUIÇÃO</i>	R\$ 46.097,38

Fonte: Elaborado pela autora

É possível inferir, portanto que a clínica opera em níveis inferiores ao PEq, ou seja, a receita obtida através dos atendimentos realizados, com base na tabela SUS, não é suficiente para cobrir o Custo Total, a MC não é suficiente para cobrir os custos e despesas da estrutura e o resultado apurado é negativo.

Ressalta-se, que os custos fixos contribuem significativamente com este déficit de receita, mais especificamente os custos com recursos humanos. A partir do convênio celebrado entre a SMS e a UFPE, a instituição passará a ter parte de seus custos cobertos pelo MS sendo, a partir de então, a responsabilidade pelo financiamento da clínica, compartilhada entre o MS e o MEC. É importante destacar que a folha de pagamento dos servidores é de responsabilidade do MEC.

Acredita-se, ainda, que a quantidade de atendimentos realizados na clínica é outro fator que contribui para que ocorra este déficit da receita. Por ser uma clínica escola a qualidade da formação de recursos humanos é priorizada em detrimento do volume de atendimentos. Além disso, os atendimentos realizados estão vinculados às atividades acadêmicas do curso havendo uma redução significativa na produção durante o período de recesso acadêmico.

Outro aspecto que merece ser ressaltado é que a clínica, inaugurada recentemente, ainda não utiliza toda a sua capacidade de atendimento por falta de equipamentos. Alguns atendimentos estão sendo realizados pelos alunos e supervisores da clínica no Hospital das Clínicas, que dispõe destes equipamentos.

## 4. CONCLUSÃO

O estudo evidenciou, por meio da metodologia do custeio variável, que a instituição estudada funciona com déficit de receita, ou seja, a tabela SUS não garante a cobertura integral dos seus custos.

Estes dados apontam a necessidade de um gerenciamento de custos eficaz, fundamental quando se tem escassez de recursos e quando se objetiva conter os gastos, sem perder a qualidade do serviço prestado; ou seja, uma vez bem gerenciados, esses recursos escassos podem ser usados mais adequadamente e render mais.

O estudo é um referencial para o desenvolvimento de um sistema de custos para a clínica, com o intuito de contribuir com a análise gerencial de custos por meio do método de custeio variável, com



possibilidade de utilização de tal ferramenta para auxílio na tomada de decisões e no processo de gestão.

## **5. REFERÊNCIAS**

ABBAS, K.; GONÇALVES, M.N.; LEONCINE, M. Os métodos de custeio: vantagens, desvantagens e sua aplicabilidade nos diversos tipos de organizações apresentadas pela literatura. *Revista ConTexto*. Porto Alegre, v. 12, n. 22, p. 145-159. 2º semestre 2012.

ALMEIDA, A.G.; BORBA, J.A., FLORES, L.C.S. A utilização das informações de custos na gestão da saúde pública: um estudo preliminar em secretarias municipais de saúde do estado de Santa Catarina. *Revista de Administração Pública*. Rio de Janeiro, v.43, n.3, p.579-607, maio/jun. 2009.

## **6. AGRADECIMENTOS**

Ao Departamento de Fonoaudiologia da UFPE e à coordenação e funcionários da Clínica de Fonoaudiologia Professor Fábio Lessa pelo apoio ao desenvolvimento deste estudo.



**MICROBIOLOGIA  
CLÍNICA**



ÁREA DE SUBMISSÃO: MICROBIOLOGIA CLÍNICA – MC 1

## IDENTIFICAÇÃO POLIFÁSICA E AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE ISOLADOS CLÍNICOS DE LEDURAS DO COMPLEXO *Candida parapsilosis*

C. M. SILVA<sup>1</sup>, A.M.R.C. PARAHYM<sup>2</sup>, R.G. LIMA-NETO<sup>1</sup>, D.P.C MACÊDO<sup>2</sup> e R.P. NEVES<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Micologia

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Farmacêuticas

carolinamsilva87@yahoo.com.br

**RESUMO** – *O presente estudo teve como objetivo distinguir as espécies do complexo C. parapsilosis oriundas de amostras clínicas de sangue de pacientes provenientes de Unidades de Terapia Intensiva (UTI) do Estado de Pernambuco, bem como determinar a susceptibilidade dos isolados frente aos antifúngicos convencionais. A partir de leveduras identificadas como Candida parapsilosis estocadas na Coleção de Culturas Micoteca URM-UFPE foi procedida a confirmação taxonômica através da taxonomia clássica e a distinção entre os isolados do complexo psilosis foi realizada pela espectrometria de massa (MALDI-TOF MS) e pelo sequenciamento das regiões ITS1 e ITS4 do RNAr. Foram selecionados um total de 11 isolados e após a reativação todos se apresentaram viáveis e tiveram a taxonomia confirmada pela identificação clássica e posteriormente foram reclassificados dentre as espécies do complexo C. parapsilosis através da genotipagem e proteômica. Pelo sequenciamento da região ITS cinco isolados foram classificados como C. parapsilosis stricto sensu, dois C. orthopsilosis, três C. metapsilosis e um Lodderomyces elongisporus. Os resultados obtidos através da análise proteômica demonstrou discrepância apenas na identificação do isolado de L. elongisporus, o qual foi identificado como C. parapsilosis stricto sensu por esta metodologia. Na avaliação da susceptibilidade antifúngica foi verificada resistência apenas à anidulafungina por isolados de C. parapsilosis stricto sensu.*  
**Palavras-chave:** *Candidemia, Taxonomia, Resistência antifúngica.*

**ABSTRACT** - *This study aimed to distinguish the species of C. parapsilosis complex derived from clinical blood samples of patients from Intensive Care Units (ICUs) of Pernambuco, and to determine the susceptibility of the isolates front of conventional antifungal agents. From yeasts identified as Candida parapsilosis stored in URM*



*Culture Collection-UFPE was proceeded the taxonomic confirmation through the classical identification. Distinction between isolates from psilosis complex was performed by mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and the sequencing of the regions ITS1 and ITS4 from rRNA. A total of 11 isolates were selected and after reactivating all presented viable and had the taxonomy confirmed by classical identification and were subsequently reclassified among the species of the complex *C. parapsilosis* through genotyping and proteomics. By ITS region sequencing five isolates were classified as *C. parapsilosis sensu stricto*, two *C. orthopsilosis*, three *C. metapsilosis* and one *Lodderomyces elongisporus*. The results obtained by proteomic analysis showed only discrepancy to identify the isolate of *L. elongisporus*, which was identified as *C. parapsilosis sensu stricto* by this methodology. In antifungal susceptibility evaluation resistance was observed only to anidulafungin by isolates of *C. parapsilosis sensu stricto*.*

*Keywords: Candidemia, Taxonomy, Antifungal resistance.*

## 1. INTRODUÇÃO

A incidência de infecções fúngicas invasivas tem aumentado consideravelmente, sendo a candidemia a manifestação clínica mais frequente. Dentro deste cenário, *Candida parapsilosis* tem emergido como um importante patógeno nosocomial em todo o mundo (Ruiz *et al.*, 2013).

Atualmente *C. parapsilosis* é considerada um complexo constituído por três novas espécies denominadas *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*. A diferenciação dentre estas foi realizada com base em diversos critérios, incluindo análise de DNA, eletroforese de isoenzimas, eletroforese de cariótipos, morfotipos e sequências de DNA mitocondrial (Asadzadeh *et al.*, 2009; Tavanti *et al.*, 2010). A importância de uma identificação precisa dentre os membros deste complexo se justifica devido à existência de diferenças entre as espécies no que diz respeito ao perfil de virulência e susceptibilidade antifúngica (Constante *et al.*, 2014).

Entretanto, apesar da descoberta de novas técnicas, promover uma identificação confiável e rápida das leveduras do complexo *C. parapsilosis* tem sido um grande desafio para os laboratórios de diagnóstico. Diante disto, novas metodologias para diferenciação têm sido estudadas, incluindo a espectrometria de massa por tempo de voo (MALDI-TOF MS) que tem trazido resultados favoráveis para separação das espécies do complexo que condizem com os resultados obtidos por genotipagem (De Carolis *et al.*, 2014).

Adicionalmente, há uma preocupação crescente relacionada com a resistência antifúngica de isolados do complexo frente aos antifúngicos convencionais. Alguns estudos têm sugerido que *C. parapsilosis sensu stricto* é menos susceptível à anfotericina B e equinocandinas quando comparada com *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* (Cánton *et al.*, 2011; Ruiz *et al.*, 2013).

Apesar do avanço das pesquisas no que tange ao complexo *C. parapsilosis*, ainda há uma carência de estudos mais amplos, pois a discriminação correta entre espécies e avaliação da atividade antifúngica das mesmas pode ajudar na instituição de um tratamento mais adequado dos pacientes acometidos. Desta forma, este estudo objetivou distinguir as espécies do complexo *C.*



*parapsilosis* oriundas de amostras clínicas de sangue de pacientes provenientes de Unidades de Terapia Intensiva (UTI) do Estado de Pernambuco, bem como determinar a susceptibilidade dos isolados frente aos antifúngicos convencionais.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

Foram obtidas culturas de leveduras identificadas como *Candida parapsilosis* provenientes de casos de candidemia em Unidades de Terapia Intensiva do Estado de Pernambuco, depositados na Coleção de Culturas Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco. As culturas foram reativadas e sua taxonomia confirmada, sendo posteriormente reclassificadas de acordo com as diferentes espécies atualmente conhecidas do complexo *C. parapsilosis*.

### 2.2 CONFIRMAÇÃO TAXONÔMICA DOS AGENTES ETIOLÓGICOS

A confirmação taxonômica foi realizada com base na identificação clássica através análise de parâmetros quanto às características macroscópicas (bordos, textura e coloração do verso e reverso das colônias, produção de pigmentos e tempo de crescimento), microscópicas (estruturas somáticas e reprodutivas) e fisiológicas/bioquímicas (assimilação de compostos de carbono e nitrogênio, fermentação de fontes de carbono e produção de ácido acético) (De Hoog *et al.*, 2000), produção de urease, (Lacaz *et al.*, 2002). A distinção entre os isolados do complexo *Candida parapsilosis* foi procedida pela espectrometria de massa (MALDI-TOF MS) (Lima-Neto *et al.*, 2014) e pelo sequenciamento das regiões ITS1 e ITS4 do RNAr (White *et al.*, 1990).

### 2.3 SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO*

Os testes de susceptibilidade *in vitro* foram realizados segundo o método de microdiluição em caldo, de acordo com a padronização publicada nos documentos M27-A3 (2008) e M27-S4 (2012) do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

No ensaio foram incluídas linhagens do American Type Culture Collection (ATCC), recomendadas pelo método: *Candida krusei* ATCC6528, *C. parapsilosis* ATCC22019 e *C. tropicalis* ATCC750.

A concentração fungicida para a anfotericina B foi representada pelo poço onde ocorreu 100% na inibição do crescimento fúngico e para as equinocandinas, bem como fluconazol, pelo poço correspondente a inibição de 50% do crescimento quando comparado ao poço controle positivo.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram selecionados 11 isolados identificados como *C. parapsilosis* depositados na Micoteca URM provenientes de amostras clínicas de pacientes oriundos de UTIs pernambucanas (Tabela 1). Após a reativação todos se apresentaram viáveis, demonstrando a segurança do método de

preservação. Através da identificação clássica houve confirmação taxonômica de todos os isolados.

A grande diversidade genética do Reino Fungi torna relevante a conservação de culturas fúngicas em coleções denominadas micotecas. Várias coleções de culturas de referência internacional são mantidas em diversos países, dentre elas a micoteca URM, e possuem papel importante na conservação e manutenção da viabilidade destes microrganismos (Guimarães, 2014).

Tabela 1 - Isolados clínicos de *Candida parapsilosis* oriundos da Micoteca URM

Registro	Espécie	Amostra clínica	Origem
URM6404	<i>Candida parapsilosis</i>	Sangue	Recife-PE
URM6405	<i>C. parapsilosis</i>	Sangue	Recife-PE
URM6406	<i>C. parapsilosis</i>	Sangue	Recife-PE
URM6407	<i>C. parapsilosis</i>	Sangue	Recife-PE
URM6408	<i>C. parapsilosis</i>	Sangue	Recife-PE
URM6409	<i>C. parapsilosis</i>	Sangue	Recife-PE
URM6411	<i>C. parapsilosis</i>	Sangue	Recife-PE
URM6412	<i>C. parapsilosis</i>	Sangue	Recife-PE
URM6429	<i>C. parapsilosis</i>	Sangue	Recife-PE
URM6430	<i>C. parapsilosis</i>	Sangue	Recife-PE
URM7427	<i>C. parapsilosis</i>	Sangue	Recife-PE

Após a confirmação taxonômica através da identificação clássica, os isolados de *C. parapsilosis* foram submetidos à análise genotípica e proteômica. Através da técnica para sequenciamento da região ITS cinco isolados foram classificados como *C. parapsilosis stricto sensu*, dois *C. orthopsilosis*, três *C. metapsilosis* e um *Lodderomyces elongisporus*. Os resultados obtidos através da análise proteômica por MALDI-TOF MS demonstrou discrepância apenas na identificação do isolado URM 6429 quando comparado com a caracterização genotípica. Os dados referentes à identificação genotípica e proteômica estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Identificação genotípica e proteômica de isolados clínicos do complexo *Candida parapsilosis* isolados a partir de hemoculturas de pacientes provenientes de Unidades de Terapia Intensiva



Registro	Identificação genotípica	Identificação proteômica
URM6404	<i>Candida orthopsilosis</i>	<i>Candida orthopsilosis</i>
URM6405	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>
URM6406	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
URM6407	<i>C. metapsilosis</i>	<i>C. metapsilosis</i>
URM6408	<i>C. metapsilosis</i>	<i>C. metapsilosis</i>
URM6409	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
URM6411	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
URM6412	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
URM6429	<i>Lodderomyces elongisporus</i>	<i>C. parapsilosis</i>
URM6430	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
URM 7427	<i>C. metapsilosis</i>	<i>C. metapsilosis</i>

Segundo Tavanti e colaboradores (2005) *C. parapsilosis* é formada por um complexo de três espécies denominadas *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*. No presente estudo tanto pela caracterização genética quanto pelo perfil de proteínas verificamos uma predominância de isolados classificados como *C. parapsilosis stricto sensu*, com pequeno índice de discrepância na identificação através dos dois métodos. Esses resultados reforçam que a espectrometria de massa por tempo de voo tem trazido resultados favoráveis para separação das espécies do complexo que condizem com os obtidos por genotipagem (De Carolis *et al.*, 2014).

O isolado discrepante foi identificado como *Lodderomyces elongisporus* através de técnicas de biologia molecular. Segundo Ahmad *et al* (2013) *Lodderomyces elongisporus* é uma espécie intimamente relacionada com *Candida parapsilosis* e, recentemente, tem sido identificada como causa de infecções da corrente sanguínea.

Devido às semelhanças fenotípicas e genotípicas entre *L. elongisporus* e *C. parapsilosis*, Santos e colaboradores (2011) afirmam que esta primeira corresponde à fase teleomorfa de *C. parapsilosis*. Entretanto, estes autores através do MALDI-TOF MS, obtiveram picos distintos aos de *C. parapsilosis* ao analisar dois isolados de *L. elongisporus*, o que difere de nossos resultados.

Dentre as espécies do complexo *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* é considerada a de mais rara ocorrência. Em 2012, Garcia-Effron e colaboradores relataram um único isolado (1,19%) de *C. metapsilosis* entre 84 cepas do complexo isoladas a partir de hemocultura de pacientes pediátricos. Estes dados enfatizam a importância de nossos resultados, visto que foi possível detectar uma ocorrência significativa de isolamento de *C. metapsilosis* entre pacientes provenientes de UTI do Estado de Pernambuco.

Foram avaliadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos 11 isolados frente à anfotericina B, ao fluconazol e às equinocandinas (micafungina, caspofungina e anidulafungina), segundo a metodologia de microdiluição em caldo (Tabela 3).

Tabela 3 - Concentração inibitória mínima dos isolados do complexo *Candida parapsilosis* e *Lodderomyces elongisporus* provenientes de amostras sanguíneas de pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva.

Registro	Espécie	Concentração Inibitória Mínima (CIM) - µg/ml				
		AFB	FLZ	ANI	MICA	CAS
URM6404	<i>Candida orthopsilosis</i>	0,03(S)	0,25(S)	4(S)	1(S)	0,25(S)
URM6405	<i>C. orthopsilosis</i>	0,06(S)	0,25(S)	2(S)	1(S)	0,25(S)
URM6406	<i>C. parapsilosis</i>	0,03(S)	4(S)	4(S)	2(S)	0,5(S)
URM6407	<i>C. metapsilosis</i>	0,03(S)	4(S)	2(S)	1(S)	0,125(S)
URM6408	<i>C. metapsilosis</i>	0,03 (S)	1(S)	2(S)	2(S)	0,25(S)
URM6409	<i>C. parapsilosis</i>	0,25(S)	2(S)	8(R)	2(S)	1(S)
URM6411	<i>C. parapsilosis</i>	0,06(S)	0,125(S)	8(R)	1(S)	0,25(S)
URM6412	<i>C. parapsilosis</i>	0,5(S)	0,5(S)	8(R)	2(S)	1(S)
URM6429	<i>Lodderomyces elongisporus</i>	0,25(S)	0,25(S)	4(S)	1(S)	0,25(S)
URM6430	<i>C. parapsilosis</i>	0,03(S)	0,5(S)	4(S)	1(S)	0,25(S)
URM7427	<i>C. metapsilosis</i>	0,03(S)	0,5(S)	1(S)	0,25(S)	0,5(S)

AFB: Anfotericina B; FLZ: Fluconazol; ANI: Anidulafungina; MICA: Micafungina; CAS: Caspofungina; (S): Sensível; (R): Resistente

Todos os isolados foram sensíveis à anfotericina B com CIMs variando de 0,03-1 µg/ml. Resistência a este antifúngico é incomum entre as principais espécies de *Candida* associadas a infecções em neonatos (Sharman *et al.*, 2011). Contudo, seu uso deve ser limitado devido a problemas de tolerabilidade, salientando-se a nefrotoxicidade e as reações ligadas à infusão (Testoni, Smith, Benjamin, 2012).

Sensibilidade ao fluconazol também foi detectada com faixa de CIM de 0,125-4 µg/ml. Já em 2013, na África do Sul, Ballot *et al.* avaliaram candidemia em 59 pacientes, sendo identificada *C. parapsilosis* em 54.2% dos casos, estando a resistência ao fluconazol presente em 16 dos 32 isolados.

Em nosso estudo foram detectados três isolados *C. parapsilosis stricto sensu* resistentes a anidulafungina. Bertini *et al* (2013) e Lin e colaboradores (2015) destacam que a maioria das



espécies de *Candida* se mostram sensíveis às equinocandinas, no entanto espécies do complexo *C. parapsilosis* estão associadas a maiores CIMs, sobretudo a *C. parapsilosis stricto sensu*.

#### 4. CONCLUSÃO

Foi possível validar e detalhar a identificação de fungos de importância médica depositados na Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) através da realização de técnicas moleculares e proteômicas de identificação, reclassificando as espécies contidas no complexo *Candida parapsilosis* e enriquecendo os dados do acervo. Adicionalmente foi possível observar alta porcentagem de concordância entre a espectrometria de massa e a genotipagem para diferenciação de espécies do complexo, sendo verificado apenas um isolado discrepante, identificado como *Lodderomyces elongisporus* pela biologia molecular.

A partir dos dados obtidos foi verificado que infecções hematogênicas pelas diferentes espécies do complexo *psilosis* e por *L. elongisporus* podem ocorrer em pacientes provenientes de Unidades de Terapia Intensiva. Resistência à anfotericina B, fluconazol, micafungina e caspofungina não foi detectada dentre as leveduras avaliadas, entretanto foi possível observar maiores concentrações inibitórias mínimas frente à anidulafungina, sobretudo por isolados de *C. parapsilosis stricto sensu*.

#### 5. REFERÊNCIAS

- AHMAD, S. *et al.* Isolation of *Lodderomyces elongisporus* from the catheter tip of a fungemia patient in the Middle East. *Case reports in medicine*, v. 2013, 2013.
- ASADZADEH, M.; AHMAD, S.; AL-SWEIH, N.; KHAN, Z.U. Rapid molecular differentiation and genotypic heterogeneity among *Candida parapsilosis* and *Candida orthopsilosis* strains isolated from clinical specimens in Kuwait. *Journal of Medical Microbiology*, v. 58, p. 745-752, 2009.
- BALLOT, D.E.; BOSMAN, N.; NANA, T.; RAMDIN, T.; COOPER, P.A. Background changing patterns of neonatal fungal sepsis in a developing country. *Journal of tropical pediatrics*, v. 59, n. 6, p. 460-464, 2013.
- BERTINI, A.; DE BERNADIS, F.; HENSGENS, L.A.M.; SANDINI, S.; SENESI, S.; TAVANTI, A. Comparison of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* adhesive properties and pathogenicity. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 303, n. 2, p. 98-103, 2013.
- CÁNTON, E., PEMÁN, J., QUINDÓS, G., *et al.* Epidemiology, Molecular Identification and Antifungal Susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* Isolated from Patients with Candidemia: Prospective Multicenter Study. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 55, n. 12, p. 5590-5596, 2011.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard, 3rd ed. *CLSI document M27-A3*, Wayne, PA., 2008.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: fourth informational supplement. *CLSI document M27-S4*. Wayne, PA., 2012.
- CONSTANTE, C.C.; MONTEIRO, A.A.; ALVES, S.H.; CARNEIRO, L.C.; MACHADO, M.M.; SEVERO, L. *et al.* Different risk factors for candidemia occur for *Candida* species belonging to the *C. parapsilosis* complex. *Medical Mycology*, p. myt 034, 2014.
- DE CAROLIS, E.; HENSGENS, L.A.M.; VELLA, A.; POSTERARO, B.; SANGUINETTI, M.; SENESI, S.; TAVANTI, A. Identification and typing of the *Candida parapsilosis* complex: MALDI-TOF MS vs. AFLP. *Medical Mycology*, v. 00:, p. 1-8, 2014.



- DE HOOG, G.S.; GUARRO, J.; GENE, J.; FIGUERAS, M.J. *Atlas of Clinical Fungi* (2<sup>nd</sup> edition). Holland: CBS; 215-216, 2000.
- GARCIA-EFFRON, G.; CANTON, E.; PEMA'N, J.; DILGER, A.; ROMA, E.; PERLIN, D.S. Epidemiology and echinocandin susceptibility of *Candida parapsilosis* sensu lato species isolated from bloodstream infections at a Spanish university hospital. *J Antimicrob Chemother.*, v. 67, p. 2739–2748, 2012.
- GUIMARÃES, L.C. *Métodos de preservação de fungos potencialmente toxicogênicos*. 2014.
- LACAZ, C.S., PORTO, E., MARTINS, J.E.C., HEINS-VACCARI, E.M., MELO, N.T. *Tratado de Micologia Médica*, 9 ed., São Paulo, Sarvier, 2002.
- LIMA-NETO, R.G., SANTOS, C., LIMA, N., SAMPAIO, P., PAIS, C., NEVES, R.P. Application of MALDI-TOF MS for requalification of *Candida* clinical isolates culture collection. *Braz J Microbiol* (IN PRESS), 2014.
- LIN, Chih-Chen et al. Antimicrobial susceptibility and clinical outcomes of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a tertiary teaching hospital in Northern Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v. 48, n. 5, p. 552-558, 2015.
- RUIZ, L.S.; KHOURI, S.; HAHN, R.C.; DA SILVA, E.G.; DE OLIVEIRA, V.K.P.; GANDRA, R.F.; PAULA, C.R. Candidemia by species of the *Candida parapsilosis* complex in children's hospital: prevalence, biofilm production and antifungal susceptibility. *Mycopathologia*, v. 175, n. 3-4, p. 231-239, 2013.
- SHARMAN, M.; YADAV, S.; APARNA, CHAUDHARY, U. *Candida* Blood Stream Infections In Neonates. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, v. 2, p. 338-340, 2011.
- TAVANTI, A.; DAVIDSON, A.D.; GOW, N.A.R.; MAIDEN, M.C.J.; ODDS, F.C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. To Replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, p. 284-292, 2005.
- TESTONI, D.; SMITH, P.B.; BENJAMIN JR. D.K. The use of antifungal therapy in Neonatal Intensive Care. *Clin Perinatol.*, v. 39, n. 1, p. 83–98, 2012.
- WHITE, T.J., LEE, S., TAYLOR, J. *Amplification and direct sequence of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. In: *PCR protocols, a guide to methods and applications*. Edited by Innis MA GD, Sninsky J, White TJ. New York, NY, EUA: Academic Press; 315-22, 1990.

## 6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pelo financiamento, ao Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) por conceder a infraestrutura para realização do estudo.



ÁREA DE SUBMISSÃO: MICROBIOLOGIA CLÍNICA – MC 2

## PERFIL DE RESISTÊNCIA E PRODUÇÃO DE BIOFILME POR CEPAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE ÚLCERA POR PRESSÃO

J. F. Costa<sup>1</sup>, G. G. Soares<sup>2</sup>, F. B. de S. Melo<sup>3</sup>, R. Mola<sup>4</sup>, T. C. L. Balbino<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Enfermeira no Hospital Dom Malan/IMIP/SES/PE

<sup>2</sup>Enfermeira do Hospital Dom Malan/ Gestão IMIP

<sup>3</sup>Docente Adjunta da Universidade de Pernambuco/ *Campus* Petrolina

<sup>4</sup>Docente Assistente da Universidade de Pernambuco/ *Campus* Petrolina

<sup>5</sup>Doutora em Biologia Celular e Molecular/Pesquisadora Fiocruz

flaumelo@yahoo.com.br

**RESUMO:** As úlceras por pressão (UP) são reconhecidas como um dos principais agravos à saúde de pacientes hospitalizados e são frequentemente colonizadas por microrganismos patogênicos. Os microrganismos isolados destas lesões têm mostrado elevada resistência aos antimicrobianos. Essa resistência é favorecida pela habilidade das bactérias em aderir e colonizar as superfícies de células do hospedeiro, essencial para infecção e formação de biofilme. **Objetivo:** Definir o perfil de resistência e a produção de biofilme por cepas de *Escherichia coli* isoladas de UP. **Metodologia:** Estudo experimental realizado com 13 pacientes maiores de 18 anos, com UP em estagio  $\geq 2$  internados na CM do HUP, no período de fevereiro a maio de 2014. As amostras biológicas foram coletadas semanalmente. A coleta foi realizada após limpeza previa com soro fisiológico 0,9% e semeadas em seus respectivos meios para posterior identificação da resistência e da produção de biofilme. **Resultados:** A amostra bacteriana foi composta por nove isolados de *E. coli* com elevada resistência aos antimicrobianos testados. Com relação à produção de biofilme 33% dos isolados foram classificados fortemente aderentes. **Conclusão:** Os isolados de *E. coli* mostraram-se multirresistentes aos antibióticos testados, bem como, produtores de biofilmes. Mostrando a necessidade de atenção, no que diz respeito ao uso indiscriminado de antimicrobianos, e o controle das infecções hospitalares das quais são passíveis de prevenção.

**Palavras-chave:** Antimicrobianos; Resistência microbiana; Fatores de virulência.

**ABSTRACT:** Pressure ulcers (PU) are recognized as one of the main health problems of hospitalized patients and they are often colonized by pathogenic microorganisms. Isolated microorganisms such lesions have shown high antimicrobial resistance. This resistance is favored by the ability of bacteria to adhere and colonize the surfaces of



host cells, essential for infection and biofilm formation. **Objective:** To define the profile of resistance and biofilm production by strains of *Escherichia coli* isolated from PU. **Methodology:** Experimental study in which we analyzed 13 patients over 18 years with PU on stage  $\geq 2$  admitted at CM of HUP from February to May 2014. Biological samples were collected weekly. The collection was performed after previous cleaning with 0.9% saline and swabbed in their respective means for later identification of resistance and biofilm production. **Results:** It was found that the 30% PU analyzed, 43 were classified as stage III and 43% were located in the sacral region. Risk factors that stood out related to colonization / infection of the PU were: prior use of antibiotics, invasive devices and the presence of comorbidities. The bacterial population was composed of *E. coli* isolates with high resistance to the antibiotics tested. The production of biofilm, 67% of *E. coli* isolates were classified as non-adherent. **Conclusion:** However, there is a necessity greater attention from the health team, regarding to nosocomial infections, which are preventable. **Keywords:** Antimicrobial; Microbial resistance; Virulence factors.

## 1. INTRODUÇÃO

A *Escherichia coli* é a espécie de maior relevância clínica e epidemiológica, e encontra-se geralmente associada a infecções intestinais e extra-intestinais. Pertence a família *Enterobacteriaceae*, que se diferencia quanto à origem filogenética em cepas do tipo comensais, enteropatogênicas e extra-intestinais (Clermont *et al.*, 2005); caracterizada como um Bacilo Gram-Negativo (BGN), anaeróbio facultativo, não esporulado, pode ser móvel ou não, fermenta glicose e é oxidase negativa (Trabulsi, 2008).

Os patógenos de *E. coli* que emergiram como causa de infecções intestinais foram denominados de “Diarrheagenic *Escherichia coli*” – *E. coli* diarréiogênica (DEC), e envolvem seis categorias, que incluem: EPEC - *E. coli* enteropatogênica; ETEC - *E. coli* enterotoxigênica, EIEC – *E. coli* enteroinvasora; EAEC - *E. coli* enteroagregativa; STEC/EHEC - *E. coli* produtora de toxina Shiga e DAEC - *E. coli* difusamente aderente, classificados com base em seus fatores de virulência e apenas identificados por estas características (Russo e Johnson, 2000).

De acordo com Smith *et al.*, (2007) a evolução de amostras de *E. coli* extra-intestinal permanece um mistério, uma vez que possuem diversos fatores de virulência que permitem a invasão, colonização e indução de doenças em locais corporais fora do trato gastrointestinal.

A habilidade das bactérias em aderir e colonizar as superfícies de células epiteliais do hospedeiro é essencial para o início de uma infecção e para a formação de biofilme (Johnson, 2011). Segundo Donlan *et al.*, (2002) os patógenos de *E. coli* são bacilos capazes de aderir e colonizar superfícies inertes e/ou vivas, com consequente formação de biofilme, o que pode representar um importante papel na virulência e patogenia bacteriana.

Estudos mostram que em feridas como as úlceras por pressão (UP) em estágios II, III e IV (Shea, 1975) é comum a colonização por bactérias patogênicas (Wysocki, 2002). As UP são definidas como lesões cutâneas ou de partes moles, superficiais ou profundas, usualmente sobre uma



proeminência óssea, resultante de pressão, ou pressão associada a cisalhamento e/ou fricção (Santos *et al.*, 1995).

Segundo Bonfim *et al.*, (2012) a presença de material exsudativo, seroso e/ou hemorrágico na superfície das UP as tornam um excelente meio de cultura para o desenvolvimento de muitas espécies bacterianas. Os BGN, em particular os pertencentes à família *Enterobacteriaceae* são frequentemente isolados dessas feridas colonizadas/infectadas, representado principalmente por cepas de *Enterobacter sp.* e *Escherichia coli* multirresistentes (Braga, 2011).

Os mecanismos de resistência dos filmes microbianos ainda são pouco conhecidos, no entanto acredita-se na inativação do antimicrobiano por polímeros ou enzimas extracelulares da bactéria, ou na ineficiência do antimicrobiano frente às taxas de crescimento bacteriano lentificado no interior dos biofilmes. Dessa forma, os biofilmes não são somente camadas limosas de bactérias, mas sistemas biológicos em que as bactérias são organizadas em comunidades coordenadas e funcionais (Tortora *et al.*, 2002).

Logo, a conservação das espécies implica no surgimento da resistência bacteriana aos antimicrobianos, porém o controle na utilização dos mesmos pode limitar o aparecimento de cepas multirresistentes (Blat, 2003).

Diante das complicações decorrentes da ação bacteriana, bem como, da crescente resistência aos antimicrobianos, objetivou-se definir o perfil de resistência aos antibióticos usados na rotina clínica e a produção de biofilme por cepas de *Escherichia coli* isoladas de úlcera por pressão.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo experimental realizado no período de fevereiro a maio de 2014 no Hospital Universitário de Petrolina-PE (HUP). A população foi constituída por 29 bactérias isoladas de 30 UP em 13 pacientes lotados no setor da Clínica Médica (CM), sendo a amostra constituída por nove bactérias de *E. coli*. Foram adotados os seguintes critérios de inclusão para participar da pesquisa: ter mais de 18 anos de idade, apresentar uma ou mais UP em estágio  $\geq 2$  e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) Resolução 466/12.

A coleta do material biológico das lesões selecionadas ocorreu semanalmente após a limpeza com solução de soro fisiológico 0,9%, e posterior coleta com swab estéril, utilizando-se a técnica em Z (Tiba *et al.*, 2009). O material coletado foi transportado em caldo Brain Heart Infusion (BHI) para o laboratório de Análises Clínicas, localizado no município de Petrolina-PE, onde foi submetido à análise microbiológica para isolamento e identificação dos microrganismos, e teste de antibiograma para definição do perfil de resistência.

Para avaliar e quantificar a formação de biofilme utilizou-se a metodologia descrita por Christensen *et al.*, (1995) com modificações, realizada no laboratório de pesquisa Aggeu Magalhães/FIOCRUZ em Recife-PE. Os microrganismos isolados foram semeados em BHI Agar, incubados em estufa a 37° C por 24h e posteriormente inoculados em cuvetas com 1 ml de caldo BHI, sendo as mesmas bem homogeneizadas evitando-se a formação de aglomerados. As cuvetas foram calibradas quanto à densidade óptica (DO) entre 0,8 e 1 utilizando-se o espectrofotômetro WPA UV 1101 Biotech Photometer com comprimento de onda igual a 600nm. Em seguida, as placas de poliestireno

de 96 poços de fundo em “U” foram preenchidas com 200µl de culturas diluídas. Para testagem e classificação das amostras quanto à produção de biofilme, foram utilizados os seguintes controles como referência: controle negativo (não produtor) o caldo estéril BHI e como controle positivo (forte produtor) a cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). As placas foram incubadas a 37°C durante 24h.

Após a incubação o sobrenadante foi removido delicadamente dos poços com uma ponteira, sendo mantido o precipitado. Em seguida os poços foram lavados com 200 µl de Tryptone Soya Broth (TSB) e as placas vertidas em Lysoforme. Em seguida, as bactérias aderidas nas paredes dos poços foram fixadas com acetato de sódio a 2%, as placas foram vertidas em Lysoforme após 3min e corados com cristal violeta a 0,1%. O excesso de corante foi removido por meio de água deionizada e as placas foram mantidas emborcadas até secagem. A densidade óptica de biofilme aderente foi obtida através do leitor de ELISA com comprimento de onda igual a 600nm. O experimento foi realizado em triplicata. Para interpretação da produção de biofilme foi realizado a média dos três poços, sendo utilizado o critério proposto por Stepanovic, (2000): não aderente (DO < 0,12), moderada produção (0,12 < DO < 0,24) e forte produtora (DO > 0,24).

Os dados foram tabulados por meio do programa Microsoft Office Excel® 2010, em seguida foram analisados de forma descritiva através do programa Statistical Package of Social Sciences (SPSS) versão 20.0 por meio de digitação dupla. Os resultados foram apresentados por meio de frequências absolutas e relativas. Para o cálculo do intervalo de confiança (IC 95%) utilizou-se o programa WinPepi versão 11.43.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme mostra a Tabela 1 as bactérias isoladas apresentaram sensibilidade apenas à Cefoxitina (11%), Amicacina (44%) e Gentamicina (11%), e uma bactéria apresentou resistência intermediária à Rifampicina (11%). Quanto à definição do perfil de resistência das nove (30%) amostras de *Escherichia coli* cinco mostraram-se resistentes a todos os antibióticos testados (Tabela 1).

Tabela 1 – Perfil de resistência e suscetibilidade de amostras de *Escherichia coli* (n=9)

Antibióticos	Amostras testadas			Amostras não testadas
	R N (%)	S N (%)	I N (%)	NT N (%)
Penicilina	9 (100)	-	-	-
Ampicilina	7 (78)	-	-	2 (22)
Cefoxitina	7 (78)	1 (11)	-	1 (11)
Cefalotina	8 (89)	-	-	1 (11)
Cefalexina	8 (89)	-	-	1 (11)
Cefadroxil	8 (89)	-	-	1 (11)
Cefaclor	7 (78)	-	-	2 (22)



Cefazolina	8 (89)	-	-	1 (11)
Cefotaxima	9 (100)	-	-	-
Ceftriaxona	7 (78)	-	-	2 (22)
Ceftazidima	9 (100)	-	-	-
Amicacina	5 (56)	4 (44)	-	-
Gentamicina	8 (89)	1 (11)	-	-
Ac. Nalidixico	8 (89)	-	-	1 (11)
Ac. Pipemidico	8 (89)	-	-	1 (11)
Ciprofloxacina	8 (89)	-	-	1 (11)
Norfloxacin	8 (89)	-	-	1 (11)
Perfloxacin	8 (89)	-	-	1 (11)
Rifampicina	8 (89)	-	1 (11)	-
Claritromicina	9 (100)	-	-	-
Cloranfenicol	9 (100)	-	-	-
Nitrofurantoína	8 (89)	-	-	1 (11)
Tetraciclina	8 (89)	-	-	1 (11)
Sulfa-Trimetopina	8 (89)	-	-	1 (11)

R – Resistência; S – Suscetibilidade; I – Resistência Intermediária; NT – Não Testado

Com relação à produção de biofilme, 67% das amostras de *Escherichia coli* foram classificadas como não aderente e 33% forte produtora conforme mostra a tabela 2.

Tabela 2 – Classificação quanto à produção de biofilme por amostras de *Escherichia coli* isoladas de UP em paciente internados na CM do HUP, 2014

Classificação quanto à produção de biofilme	N	%
Não aderente (DO < 0,12)	6	67%
Moderada (0,12 < DO < 0,24)	0	0%
Aderente (DO > 0,24)	3	33%
Total	9	100%

Fonte: Laboratório de pesquisa Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ.

Os bacilos da família *Enterobacteriaceae* são citados como os maiores responsáveis pela formação de biofilmes (Gomes *et al.*, 2009), devido à presença de genes que codificam proteínas associadas à adesão e agregação inter-bacteriana e em superfícies inertes e/ou vivas (Donlan, 2002). São diversas as causas e mecanismos envolvidos na resistência bacteriana, responsáveis por gerar linhagens de bactérias capazes de se multiplicarem mesmo na presença de altas concentrações de antibióticos (Spares *et al.*, 2006).

Em estudo realizado por Moreira (1995) a partir de amostras de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL isoladas de infecções de natureza hospitalar, as cepas de *E. coli* apresentaram resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, cefalosporinas de terceira geração e sensibilidade as cefalosporinas de



segunda geração (cefotaxima). Dados semelhantes foram observados no presente estudo, porém de amostras de *E. coli* isoladas de UP, com expressivo perfil de resistência aos antimicrobianos testados.

Silveira *et al.*, (2010) observaram a partir de análises de urocultura que os isolados de *E. coli* apresentaram mais de 90% de sensibilidade a ceftazidina, amicacina, aztreonam, cefepime, ceftriaxona, cefoxitina, nitrofurantoína e gentamicina e resistência apenas a sulfatoxazol-trimetoprim. Porém, no presente estudo os isolados mostraram-se sensíveis apenas à classe dos aminoglicosídeos.

Em estudo realizado por Garcia, (2003) a partir de amostras isoladas do trato urinário as cepas de *E. coli* apresentaram elevada sensibilidade a norfloxacina e clorafenicol no entanto a presente análise identificou isolados resistentes as classes de quinolonas, macrolídeos, tetraciclina, fluorquinolonas e clorafenicol e resistência intermediária a classe das ansamicinas.

Tiba *et al.*, (2009) evidenciaram que 100% das amostras de *Escherichia coli* uropatogênicas possuíam algum fator de virulência para a produção de biofilme, e que 44 amostras formaram biofilme em microplacas de poliestireno e 56 amostras apresentaram resultado ausente/fraco. Tal resultado converge com os dados desta pesquisa, onde 33% das amostras de *E. coli* isoladas das UP foram classificadas como forte produtora e 67% como não aderente. Já em estudo realizado por Conceição, (2010) a partir de amostras de *E. coli* associadas à Sepse, 81,7% foram formadoras de biofilme e 18,3% não formadoras.

Embora existam poucos estudos publicados sobre a produção de biofilme em UP, os resultados da atual pesquisa são relevantes visto que reforçam a importância da prevenção da ocorrência deste tipo de lesão cutânea, em decorrência de um considerável risco de colonização/infecção por BGN epidemiologicamente importantes e multirresistentes.

## 4. CONCLUSÃO

Os isolados de *E. coli* mostraram-se multirresistentes aos antibióticos testados. Com relação à produção de biofilme a maioria das amostras de *E. coli* foi classificada como não aderente.

Com base nesse estudo sugere-se uma maior atenção dos gestores de instituições hospitalares e da equipe multiprofissional no que diz respeito ao uso de antimicrobianos e ao controle das infecções hospitalares, das quais são passíveis de prevenção.

## 5. REFERÊNCIAS

- BRAGA, I.A. Úlcera por Pressão como reservatório e fonte de infecção por bacilos gram-negativos em pacientes internados em um hospital de nível terciário e em residentes de instituições de longa permanência para idosos. 2011. 93 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de medicina da Universidade Federal de Uberlândia/ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2011.
- CHRISTENSEN, G.D. *et al.* Adherence of coagulase negative Staphylococci to plastic tissue cultures: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol.* v. 22, p. 996-1006, 1995.
- CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 66, n. 10, p. 4555–4558, 2000.



DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanism of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

GOMES, F.S.L.; CARVALHO, D.V.; LIMA, E.D.R.P. Tratamento de feridas crônicas com coberturas oclusivas. *Rev. Min. Enferm.* v. 13, n. 1, p. 13-18, 2009.

MOREIRA, A.P.A. Infecções hospitalares por Enterobacteriaceae produtora de  $\beta$ -lactamase de amplo espectro (ESBL): ocorrência e preditores de mortalidade em um Hospital Universitário Mineiro. 2011. 91 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Uberlândia, 2011.

RUSSO, T.A.; JOHNSON, J.R. Proposal for a New Inclusive Designation for Extraintestinal Pathogenic Isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *The Journal of Infectious Diseases.* v. 181, p. 1753-4, 2000.

SANTOS, L.L.R.; FERREIRA, L.M.; SABINO NETO M.S. Úlcera por pressão. *Manual de Cirurgia Plástica.* SP: Atheneu, p. 214-7, 1995.

SHEA, J. D. Pressure sores. Classification and management. *Clin Orthop.* n. 112, p.89-100, 1975.

SILVEIRA, A.S. *et al.* Prevalência e suscetibilidade bacteriana em infecções do trato urinário de pacientes atendidos no hospital universitário de Uberaba. *Rev Bras Anal Clin.* v. 42, n. 3, p. 157-160, 2010.

SMITH, J.L.; FRATAMICO, P.M.; GUNTHER, N.W. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne pathogens and disease.* v. 4, n. 2, p. 134-163, 2007.

SOARES, L.A.; NISHI, C.Y.M.; WAGNER, H.L. Isolamento das bactérias causadoras de infecções urinárias e seu perfil de resistência aos antimicrobianos. *Rev Bras Med Fam e Com.* v. 2, n. 2, 2006.

STEPANOVIC, S. *et al.* A modified microtiter-plate for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods.* v. 40, n. 2, p.175-179, 2000.

TIBA, M.R.; NOGUEIRA, G.P.; LEITE, D.S. Estudo dos fatores de virulência associados à formação de biofilme e agrupamento filogenético em *Escherichia coli* isoladas de pacientes com cistite. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* v. 42, n 1, p. 58-62, 2009.

TORTORA G.; FUNKE B.; CASE C. L. Microbiologia. *Editora Artmed*, 6º edição, cap. 11, p. 294-317, 2000.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 8ª Ed. *Editora: Atheneu*, 2008.

WYSOCKI, A.B. Evaluating and managing open skin wounds: colonization versus infection. *AACN Clinical Issues.* v. 13, n. 3, p. 382-397, 2002.

JOHNSON, J.R. *et al.* Ongoing Horizontal and Vertical Transmission of Virulence Genes and *papA* Alleles among *Escherichia coli* Blood Isolates from Patients with Diverse-Source Bacteremia. *Infection and Immunity.* v. 69, n. 9, p. 5363-5374, 2001.

CONCEIÇÃO, R. A. Formação de biofilme em amostras de *Escherichia coli* associada a sepse (SEPEC): caracterização fenotípica, genotípica e filogenia. 2010. 66 f. Dissertação (mestrado). Instituto de biologia/ Universidade Estadual de Campinas, 2010.



ÁREA DE SUBMISSÃO: MICROBIOLOGIA CLÍNICA – MC 3

## CANDIDÍASES INVASIVAS EM UNIDADES DE TERAPIA INTENSIVA

A.M.R. CARVALHO-PARAHYM<sup>1</sup>, C.M. DA SILVA<sup>2</sup>, T.J.S.P.SOBRIHO<sup>1</sup>, B.J.C. MELO<sup>1</sup>,  
E.E.F. NASCIMENTO<sup>1</sup>, S.J.T. SOARES<sup>1</sup>, L.T.S. SOUZA<sup>1</sup>, P.J.ROLIM-NETO<sup>3</sup>, R.G. LIMA-  
NETO<sup>3</sup>, D.P.C.MACÊDO<sup>3</sup>, R.P. NEVES<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro Universitário do Vale do Ipojuca, Caruaru-PE.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Micologia.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas.

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Medicina Tropical.

E-mail para contato: aana\_mrc@hotmail.com

**RESUMO** – *As infecções fúngicas estão sendo cada vez mais diagnosticadas em pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva (UTI). Espécies de Candida são comumente as mais isoladas causando infecções invasivas graves em pacientes da UTI. Dessa forma, o presente estudo teve a finalidade de diagnosticar casos de candidíases invasivas em UTIs e associar a sua incidência com a doença de base dos pacientes. O estudo foi conduzido em UTIs de três hospitais públicos da cidade do Recife, Pernambuco, Brasil. Foram coletadas 1040 amostras clínicas provenientes de 330 pacientes que apresentavam sintomas clínicos de infecção sistêmica, sendo obtidos 62 isolados de Candida provenientes de 59 pacientes. Candidíases invasivas foram mais incidentes em portadores de doenças hematológicas malignas.*

**ABSTRACT** – *Yeast infections are increasingly being diagnosed in patients interned in Intensive Care Unit (ICU). Candida species are commonly isolated causing severe invasive infections in patients from the ICU. Thus, the present study had a purpose of diagnosing invasive candidiasis cases in ICUs and associated your incidence with the base disease of the patients. The study was conducted in Three Government hospital ICUs of the city of Recife, Pernambuco, Brazil. Were collected in 1040 clinical samples from 330 patients with clinical symptoms of systemic infection, being obtained 62 Candida isolates from 59 patients. Invasive candidiasis were more incidents in patients with malignant hematological diseases.*



## 1. INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas vêm sendo cada vez mais diagnosticadas em pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI). Os avanços da medicina estão associados à maior sobrevivência de pacientes graves e conseqüentemente ao aumento da população vulnerável a uma gama de infecções (Leroy *et al.*, 2009).

Espécies de *Candida* estão entre os patógenos fúngicos mais comumente isolados causando infecções invasivas em pacientes de UTIs (Ylipalosaari *et al.*, 2012), sendo obtidas principalmente em infecções da corrente sanguínea (candidemia), pulmonar e em casos de endocardite. No entanto, candidemia é a forma clínica mais prevalente, ocorrendo em aproximadamente 68-90% dos casos (Leroy *et al.*, 2009).

A espécie mais frequentemente isolada é *C. albicans* (60-70%) estando envolvida em episódios de candidemia de pacientes internados em UTI, embora alguns autores relatam o aumento no número de infecções por espécies de *Candida* não-*albicans* (Bassetti; Mikulska; Viscoli, 2010).

Essas espécies podem ser responsáveis por mais de 50% dos episódios de candidemia em pacientes adultos críticos (Pereira *et al.*, 2010), sendo *C. parapsilosis* e *C. glabrata* as espécies mais citadas, seguidas por *C. tropicalis* e *C. krusei* (Leroy *et al.*, 2009) e mais raramente *C. lusitaniae* e *C. guilliermondii* (Horn *et al.*, 2009).

Infecções invasivas por *Candida* são mais frequentes em pacientes com neoplasias hematológicas ou outra imunossupressão, como portadores de da síndrome da imunodeficiência adquirida e transplantados, e na maioria dos casos essas leveduras são provenientes da microbiota da pele e mucosas (Pffaler, 1996).

Dessa forma, o presente estudo teve a finalidade de diagnosticar casos de candidíases invasivas em UTIs e associar esta infecção fúngica com a doença de base dos pacientes.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

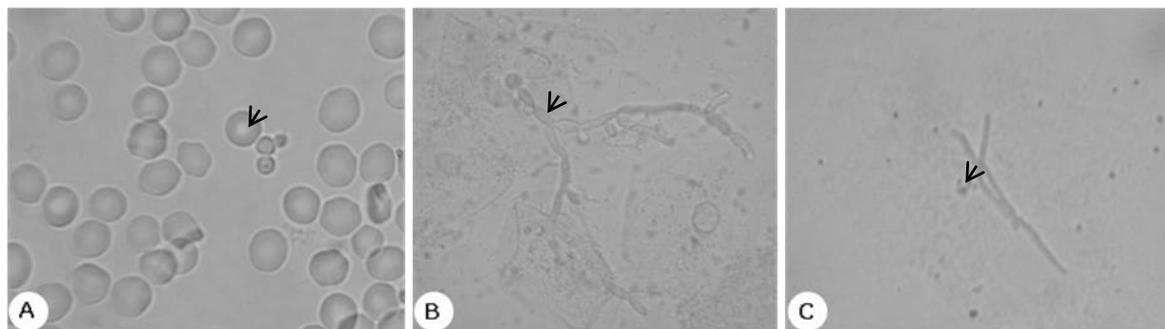
Trata-se de uma pesquisa observacional e experimental realizada em UTIs de três hospitais públicos da cidade do Recife, Pernambuco, Brasil, no período de março de 2009 a junho de 2011. A coleta das amostras clínicas só foi iniciada após autorização do comitê de ética em pesquisa do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira- IMIP (CAE 0029.0.099.172-09). Foram incluídos na pesquisa todos os pacientes que apresentavam sintomas de infecções fúngicas invasivas e que estavam internados em UTIs. Os pacientes que estavam fazendo uso de antifúngico empiricamente administrado foram excluídos da pesquisa. Amostras de sangue, secreção traqueal e urina foram coletadas em três dias consecutivos, segundo solicitação médica. Amostras de sangue venoso foram coletadas assepticamente por punção venosa das veias central e/ou periférica em tubos contendo anticoagulante EDTA (*Ethylenediamine Tetraacetic Acid*), amostras de secreção traqueal foram obtidas por aspiração endotraqueal em pacientes entubados e amostras de urina após assepsia da região genital foram coletadas em tubos esterilizados após remoção do cateter urinário, quando presente. Em seguida todas as amostras foram imediatamente encaminhadas ao Laboratório de Micologia Médica da Universidade Federal de Pernambuco para realização do diagnóstico micológico.

As amostras foram processadas para realização do exame direto (sem adição de corante e clarificante ou utilizando solução aquosa a 20% de hidróxido de potássio) e em seguida as culturas foram preparadas em duplicata no meio ágar Sabouraud dextrose (Difco) e mantidas às temperaturas de 25°C e 37°C. Amostras de sangue foram inicialmente inoculadas no meio BHI (Infusão de Cérebro e Coração), mantidas a 37°C, e após três dias foram semeadas conforme descrito acima.

A identificação microbiológica foi realizada através da taxonomia clássica segundo os critérios descritos por Barnett, Payne e Yarrow (2000), pela utilização do meio cromogênico seletivo e diferencial CHROMagar *Candida* (CHROMagar Company Ltd), e em alguns casos pelo uso de primers espécie-específicos para *C. tropicalis* (CTR22: 5' TGG GCG GTA GGA GAA TTG CGT TA 3'; NL4CTR1: 5' TAA GAT CAT TAT GCC AAC ATC CTA GGT ATA 3'), *C. albicans* (CAL5: 5' TGT TGC TCT CTC GGG GGC GGC CG 3'; NL4CAL 5' AAG ATC ATT ATG CCA ACA TCC TAG GTA AA 3') e *C. parapsilosis* (CPA4: 5' GCA TCA GTT TGA GCG GTA GGA TAA GC 3'; NL4LEL1: 5' AGA TCA TTA TGC CAA CAT CCT AGG CCG 3') (Santiwongkarn *et al.*, 2012).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidas 1040 amostras clínicas provenientes de 330 pacientes que apresentavam sintomas clínicos de candidíase invasiva. O diagnóstico micológico foi baseado na detecção ao exame direto de células de levedura ovais e hialinas e em alguns casos hifas hialinas septadas (Figura 1), e no isolamento de espécies de *Candida* em cultura pura de todas as amostras.



**Figura 1.** Microscopia direta revelando células de levedura ovais, hialinas e brotantes em amostra de sangue (A), hifas hialinas septadas na secreção traqueal (B) e na urina (C) (400X).

Foram obtidos 62 isolados de *Candida*, em sua maioria, provenientes de amostras de sangue, e diagnosticados 59 (17.87%) casos de candidíases invasivas. Todos os pacientes que tiveram espécies de *Candida* isoladas em amostras de urina e/ou secreção traqueal apresentavam clínica e exames radiológicos ou ultrassonográficos sugestivos de infecção do trato urinário e respiratório respectivamente. A identificação dos isolados foi compatível em todos os métodos utilizados (Tabela 1).

Infecções da corrente sanguínea por espécies de *Candida* são mais comuns na UTI do que nas outras alas e podem afetar cerca de 10% dos pacientes internados (Magnason *et al.*, 2008).



Em nosso estudo, candidíases invasivas acometeram 17.87% dos pacientes internados em UTIs, sendo infecções da corrente sanguínea diagnosticadas em 75,8% dos casos.

Candidíase invasiva pode representar 15% das infecções nosocomiais na UTI, com taxa de mortalidade de 25 a 60 % (Zaoutis *et al.*, 2005), sendo o quarto patógeno mais comumente envolvido em infecções da corrente sanguínea na América do Norte (Wisplinghoff *et al.*, 2004).

Na Europa o gênero *Candida* está entre os agentes causais mais comuns de infecções da corrente sanguínea (Bouza; Muñoz, 2008), sendo associado ao aumento da taxa de mortalidade e a maior permanência na UTI (Prowle *et al.*, 2011).

Durante as duas últimas décadas, tem ocorrido uma mudança progressiva no perfil epidemiológico das espécies de *Candida* isoladas na UTI. No passado, quase todos os isolados responsáveis por infecções da corrente sanguínea eram *C. albicans*; entretanto recentemente, uma proporção crescente de episódios de candidemia têm sido causados por outras espécies de *Candida* (Chow *et al.*, 2008). Contudo, *C. albicans* continua a ser a espécie predominante na maioria dos países (Calandra; Marchetti, 2004) isolada em infecções invasivas em diferentes sítios anatômicos (Leroy *et al.*, 2009).

No Brasil *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* são as espécies de *Candida* não-*albicans* mais frequentemente isoladas e este perfil epidemiológico difere dos Estados Unidos que aponta *C. glabrata* como sendo a segunda espécie mais frequente (Nucci; Colombo *et al.*, 2003). Corroborando com esses autores, nós detectamos que 38,7% dos isolados foram de *C. albicans* e 61,3% foram de espécies de *Candida* não-*albicans*, sendo *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* as mais prevalentes.

Tabela 1 – Espécies de *Candida* isoladas de diferentes amostras clínicas obtidas de pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva de hospitais públicos da cidade de Recife-PE.

Espécies isoladas	Amostras clínicas	Nº de isolados
<i>Candida albicans</i>	Sangue	17
	Secreção traqueal	5
	Urina	2
<i>C. glabrata</i>	Sangue	1
<i>C. guilliermondii</i>	Sangue	4
	Líquido cefalorraquidiano	1
<i>C. krusei</i>	Sangue	4
	Líquido cavitário	1
	Secreção traqueal	1
<i>C. lusitaniae</i>	Sangue	1
<i>C. parapsilosis</i>	Sangue	9
	Secreção traqueal	1
<i>C. sake</i>	Sangue	1

<i>C. tropicalis</i>	Sangue	10
	Secreção traqueal	2
	Urina	2
<b>Total</b>		<b>62</b>

No presente estudo candidíase invasiva foi mais frequente em portadores de doenças hematológicas malignas, destacando-se leucemia mielóide aguda com maior número de pacientes acometidos por essa levedurose. Essa micose também ocorreu em pacientes portadores de pneumonia nosocomial ou comunitária (Tabela 2).

Tabela 2. – Correlação entre a espécie e a doença de base dos pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva de hospitais públicos da cidade de Recife-PE.

Espécie	Número de isolados	Doença de base	Total do número de pacientes com candidíase invasiva
<i>Candida albicans</i>	4		
<i>C. guilliermondii</i>	2	Leucemia Mielóide Aguda	9
<i>C. parapsilosis</i>	1		
<i>C. tropicalis</i>	3		
<i>C. albicans</i>	2	Leucemia Linfóide Aguda	4
<i>C. guilliermondii</i>	2		
<i>C. krusei</i>	1	Leucemia Mielóide Crônica	6
<i>C. parapsilosis</i>	1		
<i>C. tropicalis</i>	1		
<i>C. albicans</i>	2		
<i>C. guilliermondii</i>	1	Síndrome Mielodisplásica	2
<i>C. tropicalis</i>	1		
<i>C. albicans</i>	1	Mieloma Múltiplo	2
<i>C. glabrata</i>	1		
<i>C. albicans</i>	3	Linfoma	3
<i>C. lusitaniae</i>	1	Rabdomiossarcoma	2
<i>C. tropicalis</i>	1		
<i>C. parapsilosis</i>	1	Osteossarcoma	1
<i>C. albicans</i>	1	Tumor SNC	1
<i>C. tropicalis</i>	1	Sarcoma de Ewing	1
<i>C. albicans</i>	1	Carcinoma de colo de útero	1
<i>C. albicans</i>	1	Tumor abdominal	1
<i>C. krusei</i>	1	Hepatopata	1
<i>C. albicans</i>	2	Insuficiência do trato urinário	3
<i>C. parapsilosis</i>	2		
<i>C. albicans</i>	1	Cardiopatia	2
<i>C. tropicalis</i>	1		



<i>C. albicans</i>	2		
<i>C. krusei</i>	1	Desnutrição grave	3
<i>C. parapsilosis</i>	1		
<i>C. albicans</i>	2		
<i>C. krusei</i>	2		
<i>C. parapsilosis</i>	2	Pneumonia	9
<i>C. sake</i>	1		
<i>C. tropicalis</i>	3		
<i>C. albicans</i>	1	Meningoencefalite	1
<i>C. albicans</i>	1		
<i>C. krusei</i>	1	Malformação congênita	7
<i>C. parapsilosis</i>	2		
<i>C. tropicalis</i>	3		

A severidade da doença de base que comumente acomete os pacientes internados em UTIs os tornam altamente susceptíveis às infecções de etiologia fúngica como consequência da diminuição na imunidade humoral e celular, e pela exposição a outros fatores predisponentes (Bolognani; Criseo, 2003).

A permanência hospitalar na UTI está relacionada ao desenvolvimento de infecção nosocomial e a estadia durante sete a trinta dias conduz ao elevado risco, por conseguinte a maioria dos pacientes que permaneceram por mais de trinta dias são infectados (Lisboa *et al.*, 2007).

Em portadores de leucemia, essa levedurose representa 58% das infecções fúngicas sendo indivíduos com leucemia mielóide aguda os mais acometidos (Pagano *et al.*, 2006). A leucemia foi a doença de base que acometeu 32,20% dos nossos pacientes, dos quais 47,37% eram portadores de leucemia mielóide aguda.

#### 4. CONCLUSÃO

Candidíases invasivas são infecções prevalentes em indivíduos internados em UTIs, sendo os portadores de neoplasias malignas os mais acometidos. A espécie mais frequentemente isolada é *C. albicans*; no entanto, espécies de *Candida* não-*albicans* estão envolvidas na maioria dos casos.

#### 5. REFERÊNCIAS

- BARNETT, J.A.; PAINE, R.W.; YARROW, D. *Yeasts: Characteristics and Identification*. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.
- BASSETTI, M.; MIKULSKA, M.; VISCOLI, C. Bench-to-bedside review: therapeutic management of invasive candidiasis in the intensive care unit. *Crit. Care*, v. 14, p. 1-12, 2010.
- BOLIGNANO, G.; CRISEO, G. Disseminated nosocomial fungal infection by *Aureobasidium pullulans* var. *melanigenum*: a case report. *J. Clin. Microbiol.*, v.41, p. 4483-4485, 2003.
- BOUZA, E.; MUÑOZ, P. Epidemiology of candidemia in intensive care units. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v. 32, p. 87-91, 2008.



CALANDRA, T.; MARCHETTI, O. Clinical trials of antifungal prophylaxis among patients undergoing surgery. *Clin. Infect. Dis.*, v. 39, p.185-192, 2004.

CHOW, J.K.; GOLAN, Y.; RUTHAZER, R.; KARCHMER, A.W.; CARMELI, Y.; LICHTENBERG, D.; CHAWLA, V.; YOUNG, J.; HADLEY, S. Factors associated with candidemia caused by nonalbicans *Candida* species versus *Candida albicans* in the intensive care unit. *Clin. Infect. Dis.*, v. 46, p. 1206-1213, 2008.

HORN, D.L.; NEOFYTOS, D.; ANAISSIE, E.J.; FISHMAN, J.A.; STEINBACH, W.J.; OLYAEI, A.J.; MARR, K.A.; PFALLER, M.A.; CHANG, C.H.; WEBSTER, K.M. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin. Infect. Dis.*, v. 48, p.1695-1703. 2009.

LEROY, O.; GANGNEUX, J.P.; MONTRAVERS, P.; MIRA, J.P.; GOUIN, F.; SOLLET, J.P.; CARLET, J.; REYNE, J.; ROSENHEIM, M.; REGNIER, B.; LORTHOLARY, O. Epidemiology management and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter prospective observational study in France (2005-2006). *Critic. Car. Med.*, v. 37, p. 1612-1618, 2009.

LISBOA, T.; FARIA, M.; HOHER, J.A.; BORGES, L.A.A.; GÓMEZ, J.; SCHIFELBAIN, L.; DIAS, F.S.; LISBOA, J.; FRIEDMAN, G. Prevalência de Infecção Nosocomial em Unidades de Terapia Intensiva do Rio Grande do Sul. *Rev. Bras.Ter.Inten.*, v. 19, p. 414-420. 2007.

MAGNASON, S.; KRISTINSSON, K.G.; STEFANSSON, T.; ERLENDSDOTTIR, H.; JONSDOTTIR, K.; KRISTJANSSON, M.; JONMUNDSSON, E.; BALDURSDOTTIR, L.; SIGVALDASON, H.; GUDMUNDSSON, S. Risk factors and outcome in ICU-acquired infections. *Acta Anaesthes.Scandi.*, v. 52, p. 1238-1245. 2008.

NUCCI, M.; COLOMBO, A.L. Candidemia de to *Candida tropicalis*: Clinical, epidemiologic and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. *Diagnostic Microbiol. Infect. Dis.*, v. 58, p.77-82, 2003.

PAGANO, L.; CAIRA, M.; CANDONI, A.; OFFIDANI, M.; FIANCHI, L.; MARTINO, B.; PASTORE, D.; PICARDI, M.; BONINI, A.; CHIERICHINI, A.; FANCI, R.; CARAMATTI, C.; INVERNIZZI, R.; MATTEI, D.; MITRA, M.E.; MELILLO, L.; AVERSA, F.; VAN LINT, M.T.; FALCUCCI, P.; VALENTINI, C.G.; GIRMENIA, C.; NOSARI, A. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Infect. Dis.*, v. 91, p. 1068-1075, 2006.

PEREIRA, G.H.; MULLER, P.R.; SZESZS, M.W.; LEVIN, A.S.; MELHEM, M.S. Five-year evaluation of bloodstream yeast infections in a tertiary hospital: the predominance of non-*C. albicans* *Candida* species. *Medical Mycology* v. 48, p. 839-842, 2010.

PFALLER, M.A. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clin. Infect. Dis.*, v. 22., p. 89-94, 1996.

PROWLE, J.R.; ECHEVERRI, J.E.; LIGABO, E.V.; SHERRY, N.; TAORI, G.C.; CROZIER, T.M.; HART G.K.; KORMAN, T.M. Acquired bloodstream infection in the intensive care unit: incidence and attributable mortality. *Critic.Car.*, v. 15, p. 1-11, 2011.

WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S.M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R.P.; EDMOND, M.B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin. Infect. Dis.*, v. 39, p. 309-317, 2004.



ZAOUTIS T.E.; FORAKER, E.; MCGOWAN, K.L. Anfifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric patients: A survey of 4 children's hospitals. *Diagnostic Microbiol. Infect. Dis.*, v. 52, p. 295-298, 2005.



ÁREA DE SUBMISSÃO: PESQUISA CLÍNICA E PRÉ-CLÍNICA – PC 1

## PEPTÍDEOS OBTIDOS DE SERPENTES *CROTALUS DURISSUS* COMO POTENCIAIS TERAPÊUTICOS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

R. S. AIRES<sup>1</sup>, S. K. S. DE PAULA<sup>2</sup>, K. P. RANDAU<sup>3</sup>, S. L. S. M. DE A. BALTAR<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Renal

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT)

E-mail para contato: reginasouzaaires@gmail.com

**RESUMO** – *Este trabalho teve o objetivo de destacar a importância de diferentes substâncias do veneno de serpentes *Crotalus durissus* que têm propriedades terapêuticas potenciais. A revisão sistemática da literatura, foi realizada através de consultas ao banco de dados PubMed e resultou em 12 estudos, cumprindo assim, os nossos critérios de seleção predefinidos. Os dados foram extraídos e o corpo de evidências foi avaliado. Das substâncias reportadas nos artigos analisados a crotamina, a crotoxina, as viperidins (cathelicidina), o peptídeo potenciador de bradicinina, a collinein-1 e a L-aminoácido oxidase tiveram características que envolvem ações: antiparasitária, antimicrobiana, antifúngica, ações em distúrbios hematológicos, vascular e neoplasias. Dessa forma, os venenos de serpentes integram um grupo de peptídeos com grande interesse farmacológico e aplicabilidade clínica, podendo ser utilizados no diagnóstico, monitoramento e tratamento de diversas patologias.*

*Palavras-chave: cascavel, veneno, aplicação terapêutica.*

**ABSTRACT** – *This work aims to highlight the importance of different venom substances from *Crotalus durissus* snake that have potential therapeutic properties. A systematic literature screening, performed by consulting the PubMed and resulted in 12 studies, thus fulfilling, our predefined selection criteria. Data was extracted and the body of evidence was appraised. Of the substances reported in the articles analyzed crotalin, crotoxin, viperidins (cathelicidin), bradykinin-potentiating peptide, collinein-1 and L-amino acid*



*oxidase had characteristics that involve actions: antiparasitic, antimicrobial, antifungal, actions in hematological disorders, vascular and cancer. Thus, the snake venoms are a group of peptides with great pharmacological interest and clinical applicability and can be used in the diagnosis, monitoring and treatment of various diseases.*

*Keywords: rattlesnake, venom, therapeutic application.*

## 1. INTRODUÇÃO

A família Viperidae compreende o gênero *Crotalus*, que no Brasil é representado por uma única espécie, *Crotalus durissus* (cascavel). O veneno desta serpente é o mais letal e tem ações neurotóxicas, anticoagulante e miotóxica sistêmica, sendo responsável pelo maior número de mortes decorrentes de acidentes ofídicos (Boldrini-França *et al.*, 2010). Atualmente há um grande número de toxinas purificadas e caracterizadas a partir de venenos de serpentes (Doley e Kini, 2009). Componentes do veneno crotálico possuem moléculas que compreendem quase a totalidade do seu peso seco, incluindo várias toxinas, enzimas e peptídeos. Os principais componentes químicos presentes no veneno crotálico são as crototoxinas, crotaminas, convulsinas e giroxinas (Cunha e Martins, 2012).

Notavelmente, os venenos apresentam diferentes composições químicas, o que reflete em variações das suas propriedades biológicas. Em geral, venenos têm baixa imunogenicidade e alta toxicidade (Tan *et al.*, 2016). Por outro lado, a constituição dos venenos de serpentes é muito complexa e podem ser relevantes terapêuticamente. Neste sentido, pode-se destacar a produção de antivenenos, a partir da identificação de alvos específicos (León *et al.*, 2011) pois o estudo desses componentes tem contribuído para a descoberta de vários mecanismos moleculares envolvidos em processos fisiológicos e no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

Algumas toxinas já são utilizadas como ferramentas de diagnóstico ou como agentes terapêuticos em tratamentos médicos (Harvey, 2014), incluindo as não oriundas de serpentes, como a toxina botulínica (Dorizas *et al.*, 2014). O uso do veneno bruto de serpentes, bem como dos seus compostos purificados, tem obtido êxito no tratamento contra protozoários causadores de doenças em humanos (Adade *et al.*, 2011; Nunes *et al.*, 2013), e em doenças crônicas, como a hipertensão (Koh e Kini, 2012).

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo destacar a importância de diferentes substâncias do veneno de serpentes *Crotalus durissus* que têm propriedades terapêuticas potenciais, e verificar a necessidade do aumento de estudos sobre este assunto a partir de revisão literária sistemática.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

**Bases de dados e estratégia de busca:** Os descritores utilizados para a busca de artigos foram “*peptide snake venom crotalus durissus*”. A pesquisa dos artigos foi realizada na base de dados PubMed e o período de pesquisa incluiu estudos publicados entre fevereiro de 2012 até setembro de

2016, restritos a língua inglesa. A revisão foi realizada durante o período de outubro de 2016. Os artigos identificados pela estratégia de busca foram avaliados, de forma independente e cegados, por dois pesquisadores (autores). Inicialmente realizou-se uma primeira avaliação, tendo por base os títulos e o resumo dos artigos, e quando necessário, os textos completos foram analisados.

**Crítérios de inclusão e exclusão de artigos:** Foram incluídos estudos originais e experimentais, que apresentassem resultados referentes à identificação e/ou caracterização de substâncias presentes no veneno crotálico, que comprovadamente tinham atividade biológica. Foram excluídos artigos que apresentavam duplicidade na base de dados, ou seja, apareciam duas vezes nos resultados da busca. Artigos de revisão, relato de casos e artigos que compararam venenos entre espécies também não foram incluídos, por não deixar claro a substância e efeito biológico da *Crotalus durissus*.

**Análise e comparação dos artigos:** Para extração dos dados dos artigos, elaborou-se um instrumento contendo as seguintes informações: autores, ano de publicação, substância e espécie da qual foi obtida, e sua respectiva atividade biológica. Após, a compilação, os dados foram organizados sob a forma de revisão sistemática descritiva, sem metanálise, focando nas principais abordagens das substâncias químicas, com importância terapêutica, identificadas em veneno de serpentes da espécie *Crotalus durissus*.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A estratégia de busca descrita encontrou 117 artigos, sendo 24 deles nos últimos cinco anos. Após aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, ao final, 12 artigos foram incluídos na revisão (Figura 1).

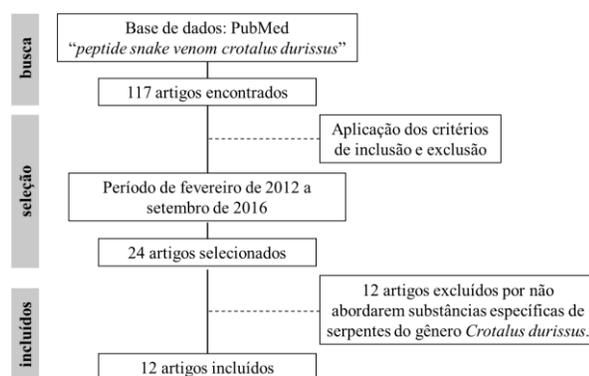


Figura 1 – Diagrama de identificação do estudo.

A realização de metanálise não foi possível devido à heterogeneidade metodológica utilizada entre os estudos, o que inviabilizou uma comparação direta entre os artigos analisados. Assim, foi feita a descrição individual de cada estudo, seguindo a ordem cronológica de publicação conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Análise dos artigos incluídos

AUTOR/ANO DA PUBLICAÇÃO	SUBSTÂNCIA/ESPÉCIE	ATIVIDADE BIOLÓGICA
Nascimento <i>et al</i> (2012)	crotamina-Cdt	promove seletivamente morte de células tumorais
Yamane <i>et al</i> (2013)	crotamina-Cdt	atividade antifúngica
He <i>et al</i> (2013)	crotoxina-Cdt	inibe o crescimento de células Eca-109 <i>in vitro</i> através da indução de apoptose
Costa <i>et al</i> (2013)	crotoxina-Cdt	atividade anti-tumoral, a partir do aumento da atividade secretora de macrófagos
da Silva <i>et al</i> (2013)	crotoxina-Cdt	efeito inibidor sobre o edema crônico induzido por bacillus Calmette-Guérin (BCG), possivelmente através da geração de mediadores anti-inflamatórios da via da lipoxigenase
Han <i>et al</i> (2014)	crotoxina-Cdt	apoptose de células SK-MES-1, via p38MAPK, <i>in vitro</i>
Falcao <i>et al</i> (2014)	viperidins-Cdt	atividade antimicrobiana
Lopes <i>et al</i> (2014)	peptídeo potenciador de bradicinina (BPP-Cdc)	efeito hipotensor, entre outros mecanismos, pela inibição da enzima conversora de angiotensina
Boldrini-França <i>et al</i> (2015)	collinéin-1 da <i>Crotalus durissus collilineatus</i>	atividade coagulante
Almeida <i>et al</i> (2015)	crotoxina-Cdt	indução de um perfil anti-inflamatório local
Macedo <i>et al</i> (2015)	crotamina-Cdt	atividade leishmanicida
Teixeira <i>et al</i> (2016)	L-aminoácido oxidase (LAAOcdt)	toxicidade em células cancerígenas

Cdt = *Crotalus durissus terrificus*; Cdc = *Crotalus durissus cascavella*

A crotamina é um polipeptídeo formado por 42 aminoácidos. Uma miotoxina, responsável por causar mionecrose no tecido muscular e induzir a paralisia espasmódica em músculos esqueléticos de origem periférica (Coronado *et al.*, 2012). Recentemente foi evidenciado que este peptídeo penetra, com uma alta especificidade, em células em proliferação ativa e com um efeito citotóxico dependente da concentração (Rádis-Baptista e Kerkis, 2011). Ainda em relação à citotoxicidade da crotamina foi demonstrado ser dependente da perturbação de lisossomas e subsequente ativação de proteases intracelulares.

Além desse aspecto, a crotamina injetada intraperitonealmente pode detectar o crescimento de tecidos tumorais e provocar seletivamente a morte destas células (Nascimento *et al.*, 2012). No entanto, em baixas concentrações a crotamina é capaz de induzir um efeito analgésico (Peigneur *et al.*, 2012) e apresentar atividade anti-levedura ou agir como agente candidicidal, com efeitos nocivos baixos em células de mamíferos normais (Yamane *et al.*, 2013). Outra ação observada *in vitro*, foi um efeito leishmanicida pelo uso de micropartículas biodegradáveis contendo crotamina (Macedo *et al.*, 2015)

Por outro lado, a crotoxina corresponde a maior fração do veneno do gênero crotálico (Sampaio *et al.*, 2010) é considerado o principal componente tóxico do veneno (Guidolin *et al.*, 2013). Esta toxina é formada por 2 subunidades, a crotapotina e a fosfolipase A<sub>2</sub>, que possui ação miotóxica e principalmente neurotóxica. Entretanto, esta atividade está presente somente quando a fosfolipase A<sub>2</sub> se encontra associada à crotapotina; com o complexo dissociado ocorre a perda da atividade neurotóxica pela enzima (Lomeo *et al.*, 2014).

Dos artigos analisados, é possível perceber que variando a concentração da crotoxina, as ações, sobre os modelos estudados, são promissoras. Há inibição do crescimento de células tumorais e indução de apoptose tanto *in vitro* quanto *in vivo*, possivelmente pelo aumento da caspase-3 e redução



da expressão da proteína Bcl-2 (He *et al.*, 2013). Ou ainda pela ativação da via de sinalização da p38MAPK (Han *et al.*, 2014). Aumento da atividade secretora de macrófagos, também foi observado, o que pode contribuir para a atividade anti-tumoral (Costa *et al.*, 2013). Além desse efeito, a crotoxina também tem um efeito inibidor significativo sobre o edema crônico induzido por BCG (Bacillus Calmette-Guérin), possivelmente através da geração de mediadores inflamatórios da via da lipoxigenase (Da Silva *et al.*, 2013), e ainda é capaz de induzir um perfil anti-inflamatório local em ratos (Almeida *et al.*, 2015).

Mais recentemente, catelicidinas com diferentes atividades citotóxicas e atipatogênicas foram descobertas em venenos de serpentes. Viperidins formam uma nova família de peptídeos derivados das catelicidinas. Estes novos peptídeos exibiram atividade antimicrobiana contra uma série de estirpes bacterianas, indicando um modelo promissor para o desenvolvimento de novos agentes anti-infecciosos (Falcao *et al.*, 2014). Outro componente do veneno de cobra com propriedades antibacterianas é a L-aminoácido oxidase (Kasai *et al.*, 2015), a ação citotóxica desta enzima pode ser útil para futuras investigações sobre a sua eficácia no tratamento do câncer, uma vez que, *in vitro*, essa enzima teve um potencial efeito anti neoplásico (Teixeira *et al.*, 2016).

Na década de 1960, a partir do veneno da *Bothrops jararaca*, um pesquisador brasileiro identificou um peptídeo capaz de inibir a enzima conversora de angiotensina (ECA), e prolongar o efeito da bradicinina, a partir de então outros peptídeos com atividade hipotensora e anti-hipertensiva foram identificados e caracterizados (Camargo *et al.*, 2012). Um novo peptídeo estruturalmente atípico da bradicinina foi isolado do veneno da *Crotalus durissus cascavella* com ação mais seletiva sobre o sistema arterial do que outro peptídeo obtido do veneno da *Bothrops jararaca*, que além da inibição da ECA, pode apresentar outros mecanismos de ação que ainda não foram elucidados (Lopes *et al.*, 2014)

Serina proteases de veneno de cobra atuam principalmente em proteínas plasmáticas relacionadas com a coagulação do sangue e são consideradas promissores para o tratamento de vários distúrbios hemostáticos (Isabel *et al.*, 2016). Uma nova serina protease, collinein-1, obtida do veneno da *Crotalus durissus collilineatus* mostrou atividade coagulante do plasma, além de uma elevada estabilidade em pH e temperatura diferentes, o que traz perspectivas para futuras aplicações terapêuticas (Boldrini-França *et al.*, 2015).

#### 4. CONCLUSÃO

Devido à importância médica da família Viperidae, a constituição do veneno da *Crotalus durissus* tem sido amplamente estudada, levando à purificação e caracterização de inúmeros compostos com potencial farmacológico. Mesmo com o avanço da pesquisa científica em relação à composição química dos venenos de cobras, se faz necessárias abordagens científicas acerca de metabolismo, estrutura molecular e fisiologia dos compostos. Os venenos de serpentes integram um grupo de peptídeos com grande interesse farmacológico e aplicabilidade clínica, podendo ser utilizados no diagnóstico, monitoramento e tratamento de diversas patologias.



## 5. REFERÊNCIAS

- ADADE, C. M.; CONS, B. L.; MELO, P. A.; SOUTO-PADRÓN, T.; Effect of *Crotalus viridis viridis* snake venom on the ultrastructure and intracellular survival of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*, v. 138, p. 46-58, 2011.
- ALMEIDA C. DE S.; ANDRADE-OLIVEIRA V.; CÂMARA N. O.; JACYSYN J. F.; FAQUIM-MAURO E. L. Crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* is able to down-modulate the acute intestinal inflammation in mice. *PLoS One*, v. 4, e0121427, 2015.
- BOLDRINI-FRANÇA J.; CORREA-NETTO, C.; SILVA, M.M.S.; RODRIGUES, R.S.; TORRE, P. D. L.; PEREZ, A.; SOARES, A.M.; ZINGALI, R.B.; NOGUEIRA, R.A.; RODRIGUES, V.M.; SANZ, L. Sanz; CALVETE, J.J. Snake venomomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. *J. Proteomics*, v. 73, p. 1758–1776, 2010.
- BOLDRINI-FRANÇA J.; SANTOS RODRIGUES R.; SANTOS-SILVA L. K.; DE SOUZA D. L.; GOMES M. S.; COLOGNA C. T.; DE PAUW E.; QUINTON L.; HENRIQUE-SILVA F.; DE MELO RODRIGUES V.; ARANTES E. C. Expression of a new serine protease from *Crotalus durissus collilineatus* venom in *Pichia pastoris* and functional comparison with the native enzyme. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 23, p. 9971-86, 2015.
- CAMARGO A. C.; IANZER D.; GUERREIRO J. R.; SERRANO S. M. Bradykinin-potentiating peptides: beyond captopril. *Toxicon*, v. 4, p. 516-23, 2012.
- CORONADO, M. A.; GEORGIEVA, D.; BUCK, F.; GABDOULKHAKOV, A. H.; ULLAH, A.; SPENCER, P. J.; ARNI, R. K.; BETZEL, C. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of crotamine, a myotoxic polypeptide from the Brazilian snake *Crotalus durissus terrificus*. *Structural Biology Communications*, v. 6, p. 1052-54, 2012.
- COSTA E. S.; FAIAD O. J.; LANDGRAF R. G.; FERREIRA A. K.; BRIGATTE P.; CURI R.; CURY Y.; SAMPAIO S. C. Involvement of formyl peptide receptors in the stimulatory effect of crotoxin on macrophages co-cultivated with tumour cells. *Toxicon*, v. 74, p.167-78, 2013.
- CUNHA E. M.; MARTINS O. A. Principais compostos químicos presente nos venenos de cobras dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* – uma revisão. *REEC.*, v. 2, p. 21-26, 2012.
- DA SILVA N. G; SAMPAIO S. C.; GONÇALVES L. R. Inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* venom on chronic edema induced by injection of bacillus Calmette-Guérin into the footpad of mice. *Toxicon*. v. 63, p. 98-103, 2013.
- DOLEY R.; KINI R. M. Protein complexes in snake venom. *Cell Mol Life Sci.*, v. 17, p. 2851-71, 2009.
- DORIZAS, A.; KRUEGER, N.; SADICK, N. S. Aesthetic Uses of the Botulinum Toxin. *Dermatol Clin*, v. 32, p. 23–36, 2014.
- FALCAO C. B.; DE LA TORRE B. G.; PÉREZ-PEINADO C.; BARRON A. E.; ANDREU D.; RÁDIS-BAPTISTA G. Vipericidins: a novel family of cathelicidin-related peptides from the venom gland of South American pit vipers. *Amino Acids*, v. 11, p. 2561-71, 2014.
- GUIDOLIN, F. R.; TAMBOURGI, D. V.; GUIDOLIN, R.; MARCELINO, J. R.; OKAMOTO, C. K.; MAGNOLI, F. C.; QUEIROZ, G. P.; DIAS DA SILVA, W. Characterization of anti-crotalic antibodies. *Toxicon*, v. 66, p. 7–17, 2013.
- HAN R.; LIANG H.; QIN Z. H.; LIU C. Y. Crotoxin induces apoptosis and autophagy in human lung



- carcinoma cells in vitro via activation of the p38MAPK signaling pathway. *Acta Pharmacol Sin.* v. 10, p. 1323-32, 2014.
- HARVEY, A. L. Toxins and drug discovery. *Toxicon*, v. 92, p. 193-200, 2014.
- HE J. K.; WU X. S.; WANG Y.; HAN R.; QIN Z. H.; XIE Y. Growth inhibitory effects and molecular mechanisms of crotoxin treatment in esophageal Eca-109 cells and transplanted tumors in nude mice. *Acta Pharmacol Sin.* v. 2, p. 295-300, 2013.
- ISABEL T. F.; COSTA G. N.; PACHECO I. B.; BARBOSA L. G.; SANTOS-JUNIOR C. D.; FONSECA F. P.; BOLDRINI FRANÇA J.; HENRIQUE-SILVA F.; YONEYAMA K. A.; RODRIGUES R. S.; RODRIGUES V. DE M. Expression and partial biochemical characterization of a recombinant serine protease from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Toxicon*, v. 115, p. 49-54, 2016.
- KASAI K.; ISHIKAWA T.; NAKAMURA T.; MIURA T. Antibacterial properties of L-amino acid oxidase: mechanisms of action and perspectives for therapeutic applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 19, p. 7847-57, 2015.
- KOH, C. Y.; KINI, R. M. From snake venom toxins to therapeutics – Cardiovascular examples. *Toxicon*, v. 59, p. 497–506, 2012.
- LEÓN, G.; SÁNCHEZ, L.; HERNÁNDEZ, A.; VILLALTA, M.; HERRERA, M.; SEGURA, A.; ESTRADA, R.; GUTIÉRREZ, J. M. Immune Response Towards Snake Venoms. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*, v. 10, 2011.
- LOMEO, R. de S.; GONÇALVES, A.P. de F.; SILVA, C. N. da; PAULA, A. N. de; SANTOS, D. O. C.; FORTES-DIAS, C. L.; GOMES, D. A.; LIMA, M. E. de. Crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom induces the release of glutamate from cerebrocortical synaptosomes via N and P/Q calcium channels. *Toxicon*, v. 85, p. 5–16, 2014.
- LOPES D. M.; JUNIOR N. E.; COSTA P. P.; MARTINS P. L.; SANTOS C. F.; CARVALHO E. D.; CARVALHO M. D.; PIMENTA D. C.; CARDI B. A.; FONTELES M. C.; NASCIMENTO N. R.; CARVALHO K. M. A new structurally atypical bradykinin-potentiating peptide isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom (South American rattlesnake). *Toxicon*. v. 90, p. 36-44, 2014.
- MACEDO S. R.; DE BARROS N. B.; FERREIRA A. S.; MOREIRA-DILL L. S.; CALDERON L. A.; SOARES A. M.; NICOLETE R. Biodegradable microparticles containing crotoxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* display antileishmanial activity in vitro. *Pharmacology*. v. 1-2, p. 78-86, 2015.
- NASCIMENTO F.D.; SANCEY L.; PEREIRA A.; ROME C.; OLIVEIRA V.; OLIVEIRA E.B.; NADER H.B.; YAMANE T.; KERKIS I.; TERSARIOL I.L.; COLL J.L.; HAYASHI M.A. The natural cell-penetrating peptide crotoxin targets tumor tissue in vivo and triggers a lethal calcium-dependent pathway in cultured cells. *Mol Pharm*, v. 2, p. 211-21, 2012.
- NUNES, D. C.; FIGUEIRA, M. M.; LOPES, D. S.; DE SOUZA, D. L.; IZIDORO, L. F.; FERRO, E. A.; SOUZA, M. A.; RODRIGUES, R. S.; RODRIGUES, V. M.; YONEYAMA, K. A. BnSP-7 toxin, a basic phospholipase A2 from *Bothrops pauloensis* snake venom, interferes with proliferation, ultrastructure and infectivity of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Parasitology*, p. 844-54, 2013.
- PEIGNEUR, S.; ORTS, D. J. B.; PRIETO DA SILVA, A. R.; OGUIURA, N.; BONI-MITAKE, M.; DE-OLIVEIRA, E. B.; ZAHARENKO, A. J.; DE-FREITAS, J. C.; TYTGAT, J. *Mol. Pharmacol.*, v. 82, p. 90–96, 2012.



RÁDIS-BAPTISTA G.; KERKIS I. Crostamine, a small basic polypeptide myotoxin from rattlesnake venom with cell-penetrating properties. *Curr Pharm Des*, v. 38, p. 4351-61, 2011.

SAMPAIO S. C.; HYSLOP S.; FONTES M. R.; PRADO-FRANCESCHI J.; ZAMBELLI V. O.; MAGRO A. J.; BRIGATTE P.; GUTIERREZ V. P.; CURY Y. Crostoxin: novel activities for a classic beta-neurotoxin. *Toxicon*, v. 6, p. 1045-60, 2010.

TEIXEIRA T. L.; OLIVEIRA SILVA V. A.; DA CUNHA D. B.; POLETTINI F. L.; THOMAZ C. D.; PIANCA A. A.; ZAMBOM F. L.; DA SILVA LEITÃO MAZZI D. P.; REIS R. M.; MAZZI M. V. Isolation, characterization and screening of the in vitro cytotoxic activity of a novel L-amino acid oxidase (LAAOcdt) from *Crotalus durissus terrificus* venom on human cancer cell lines. *Toxicon*, v. 119, p. 203-17, 2016.

YAMANE E. S.; BIZERRA F. C.; OLIVEIRA E. B.; MOREIRA J. T.; RAJABI M.; NUNES G. L.; DE SOUZA A. O.; DA SILVA I. D.; YAMANE T.; KARPEL R. L.; SILVA P.I. JR.; HAYASHI M. A. Unraveling the antifungal activity of a South American rattlesnake toxin crostamine. *Biochimie*, v. 2, p. 231-40, 2013.

## 6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos a UFPE, ao PPGIT, a professora Dra. Solma Lúcia Souto Maior de Araújo Baltar, e aos órgãos de fomento à pesquisa, CAPES, CNPq e FACEPE pela realização desta pesquisa.



**PESQUISA CLÍNICA E  
PRÉ-CLÍNICA**



ÁREA DE SUBMISSÃO: PESQUISA CLÍNICA E PRÉ-CLÍNICA – PC 2

## TIAZOLIDINODIONAS: UMA BREVE ABORDAGEM SOBRE OS EFEITOS TÓXICOS ASSOCIADOS AO USO

E.G.C. CUNHA<sup>1</sup>, A.R. ALMEIDA<sup>1</sup>, K. P. RANDAU<sup>2</sup> e S.L.S.M.A. BALTAR<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino,

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT)

E-mail para contato: [eudesgccunha@outlook.com](mailto:eudesgccunha@outlook.com)

*RESUMO- As tiazolidinodionas (TZDs) são moléculas sintéticas, ligantes do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gamma (PPAR- $\gamma$ ), amplamente utilizadas para o tratamento do diabetes mellitus tipo II. Esses fármacos são conhecidos principalmente por sua ação no aumento da sensibilidade à insulina, mas pesquisas realizados já relataram várias outras ações dessas moléculas, como ações anti-inflamatórias, antiaterogênica e diminuição dos triglicerídeos. Apesar dos efeitos terapêuticos oferecidos pelas TZDs, o uso desses fármacos foi associado com diversos efeitos adversos, como toxicidade, edema, insuficiência cardíaca e diminuição de densidade óssea. O presente trabalho teve por objetivo revisar as ações das TZDs e os efeitos tóxicos associados com o uso dessas moléculas, bem como os mecanismos propostos para explicar a toxicidade das mesmas. A revisão foi realizada com base em artigos originais, de revisão, e relatos de caso, pesquisados no Pubmed. Apesar dos benefícios terapêuticos oferecidos pelas TZDs, o uso dessa classe de moléculas tem associação com efeitos adversos importantes, principalmente a toxicidade.*

*Palavras-chave: Toxicidade. Efeitos adversos. PPAR-  $\gamma$ .*

*ABSTRACT- Thiazolidinediones (TZDs) are synthetic molecules, ligands of peroxisome proliferators activated receptor gamma (PPAR- $\gamma$ ), widespread as treatment of diabetes mellitus type II. These drugs are known primarily for its action on increasing insulin sensitivity, but previous researches have reported several other actions of these molecules, as anti-inflammatory actions, antiatherogenic and decrease triglycerides. Despite therapeutic effects provided by TZDs, the use of these drugs was associated with several adverse effects, such as toxicity, edema, heart failure and decreased bone density. This study aimed to review the actions of TZDs and the toxic effects associated with the use of these molecules and the mechanisms proposed to explain the toxicity of the same. The review was based on original*

*articles, reviews, and case reports, searched on Pubmed. Despite the therapeutic benefits offered by TZDs, the use of this class of molecules is associated with significant adverse effects, mainly toxicity.*

*Keywords: Toxicity. Adverse effects. PPAR-  $\gamma$ .*

## 1. INTRODUÇÃO

As tiazolidinodionas (TZDs), também conhecidas como glitazonas, são uma classe de fármacos utilizados para o tratamento do diabetes mellitus tipo 2 por apresentarem efeitos hipoglicemiantes (Isley, 2003). Esses fármacos são ligantes sintéticos do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gamma (PPAR- $\gamma$ ), um receptor nuclear altamente expresso no tecido adiposo, e com menor expressão em células do sistema imunológico e células intestinais. A ativação do PPAR- $\gamma$  promove diminuição da resistência à insulina, o que justifica os efeitos hipoglicemiantes das TZDs, e modifica o armazenamento de lipídeos (Morel & Singer, 2014).

Além dos importantes efeitos das TZDs no aumento da sensibilidade à insulina, estudos mostraram que esses fármacos apresentam várias outras ações, tais como ações anti-inflamatórias, antiaterogênicas, melhora de parâmetros da dislipidemia, como diminuição de triglicerídeos e aumento do colesterol HDL (Yki-Jarvinen, 2004; Szapary *et al.*, 2006; Lalloyer & Staels, 2010). As TZDs promovem a ativação de mais de 100 genes diferentes, a maioria com funções ainda desconhecidas (Rizos *et al.*, 2009).

Embora as TZDs apresentem importantes efeitos terapêuticos, o uso desses fármacos teve ampla associação com o desenvolvimento de diversos efeitos colaterais. A troglitazona, primeira TZD aprovada para o uso clínico, foi retirada de circulação por apresentar efeitos hepatotóxicos. As TZDs de segunda geração, rosiglitazona e pioglitazona, também tiveram associação com o desenvolvimento de hepatotoxicidade, sendo a toxicidade um importante efeito adverso associado com uso dessa classe de medicamentos. Além da toxicidade, existem outras manifestações clínicas que foram associadas ao uso das TZDs, tais como edema, insuficiência cardíaca, diminuição de densidade óssea, aumentando o risco de fraturas, e aumento de peso (Chang *et al.*, 2013; Yokoi, 2010).

O objetivo do presente trabalho foi fazer uma breve revisão sobre as tiazolidinodionas, efeitos tóxicos associados com o uso terapêutico e mecanismos propostos para explicar a ação tóxica desses fármacos.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Esta revisão do tipo integrativa foi realizada utilizando todas as bases de dados no período de 1993 até setembro de 2016 através do Pubmed. Foram pesquisados artigos originais, de revisão, e relatos de caso filtrados através das palavras-chave em inglês, *toxicity*, *thiazolidinedione*, *pioglitazone*, *rosiglitazone*, and *troglitazone*. Estas palavras-chaves foram associadas de duas em duas na tela de busca avançada, tendo sido incluídas neste trabalho os artigos que tratavam do

efeito tóxico das tiozolidinodionas. Adicionalmente, as referências destes artigos oriundos da pesquisa nas bases de dados também foram utilizadas, e, a respeito dos artigos que não estavam disponíveis para download, apenas o resumo destes foram considerados.

### 3. TIAZOLIDINODIONAS

As TZDs são um grupo de medicamentos antidiabéticos orais amplamente utilizados para o tratamento do diabetes mellitus tipo II por promoverem diminuição da resistência à insulina. Essas moléculas são ligantes sintéticos do PPAR- $\gamma$ , um membro da superfamília de receptores hormonais ativados por ligantes, que participa de várias funções biológicas, incluindo o metabolismo lipídico, homeostase da glicose, inflamação e aterogênese (Queiroz *et al.*, 2009; Rizos *et al.*, 2009).

Algumas TZDs exercem efeitos independentes do PPAR- $\gamma$ , como a prevenção ao desenvolvimento de hipertensão arterial. A ativação da AMPK é um mecanismo proposto para explicar esses efeitos exercidos pelas TZDs independente do PPAR- $\gamma$ . Fryer *et al.* (2002) propôs em seu trabalho que a rosiglitazona, que é uma TZD, aumenta a relação AMP/ATP em cultura primária de células musculares esqueléticas de camundongos, levando a ativação de AMPK. Essa via de sinalização atua regulando o metabolismo de lipídeos e da glicose, inflamação, proliferação celular e função mitocondrial, o que sugere a via AMPK como um possível alvo das TZDs (Fryer *et al.*, 2002; Giles & Sander, 2007; Zhang *et al.*, 1993).

Rizos *et al.* (2009) revisaram a ação das TZDs frente a diferentes doenças na prática clínica e puderam observar que a pioglitazona e a rosiglitazona estavam fortemente associadas à falência cardíaca. Foi visto ainda que estas TZDs estavam relacionadas com o edema macular, anemia, e aumento de peso, mesmo sendo capaz de reduzir a resistência à insulina (Rizos *et al.*, 2009). Correspondente à troglitazona, verificou-se que havia um grande dano hepático obrigando a retirada deste fármaco poucos anos depois de sua aprovação pelo FDA. A figura 1 ilustra as três TZDs abordadas nesta revisão, na ponta esquerda de cada estrutura está marcada a estrutura geral das TZDs.

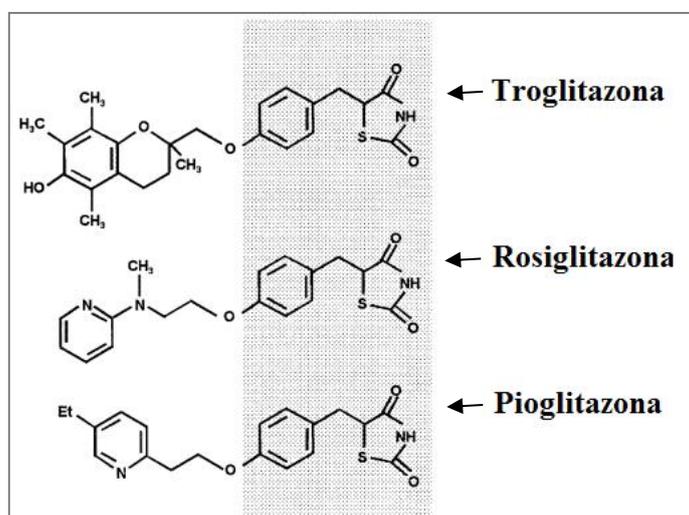


Figura 1 – Estrutura química da troglitazona, rosiglitazona e pioglitazona, respectivamente. Fonte: Isley & Oki, 2001; Modificada.

### 3.1 Efeitos tóxicos associados ao uso das TZDs

A troglitazona foi o primeiro fármaco da classe da TZDs aprovado para o uso clínico na Europa, Japão e Estados Unidos, mas o uso desse medicamento foi posteriormente associado com efeitos adversos, tendo como principal efeito a hepatotoxicidade. Em 1997 e 1998 o FDA (*Food and Drug Administration*), órgão governamental dos Estados Unidos da América responsável pelo controle dos alimentos, suplementos alimentares, medicamentos, cosméticos, equipamentos médicos, materiais biológicos e produtos derivados do sangue humano, emitiu fortes advertências e alertas sobre o uso da troglitazona, depois de receber relatórios de 100 casos de danos hepáticos, incluindo insuficiência hepática, exigindo transplante hepático de três pacientes e morte de outro que faziam uso da troglitazona (Kohlroser *et al.*, 2000).

Rosiglitazona e pioglitazona são TZDs de segunda geração, também associadas com o desenvolvimento de hepatotoxicidade, porém o aparecimento desse efeito adverso é menos frequente e geralmente tem menor gravidade em relação aos casos de uso da troglitazona. Há relatos na literatura de seis casos de hepatotoxicidade induzida por rosiglitazona e cinco casos de hepatotoxicidade induzida por pioglitazona (Marcy *et al.*, 2004).

### 3.2 Mecanismos propostos para elucidar a toxicidade das TZDs

Embora os mecanismos pelos quais ocorrem a citotoxicidade não estejam bem elucidados, alguns autores haviam (Honma *et al.*, 2002; Isley, 2003; Scheen, 2001) sugerido mecanismos pelos quais as TZDs exercem danos ao organismo, mecanismos tais que serão apresentados adiante.

Os mecanismos conhecidos pelos quais a metabolização destes xenobióticos acontecem são: (1) através das enzimas do citocromo P450, CYP3A4, CYP2C8 ou CYP2C19 (Yamazaki *et al.*, 1999), (2) sulfotransferase ST1A3 (Honma *et al.*, 2002), (3) uridina-difosfato-glucuronosiltransferase UGT1A1 (Watanabe *et al.*, 2002), (4) hidroxilação e, (5) N-desmetilação (Cox *et al.*, 2000; Braunstein, 2003; Eckland & Danhof, 2000).

Estudos iniciais sugeriram que os metabólitos secundários da troglitazona poderiam ser responsáveis ou simplesmente grande contribuintes para a sua toxicidade, principalmente quando se trata das quinonas, as quais possuem potencial tóxico produzindo estresse oxidativo (Scheen, 2001; Bolton *et al.*, 2000; Schultz *et al.*, 1996). Neste processo de metabolização a enzima ST1A1 converte a troglitazona em sulfato de troglitazona (Honma *et al.*, 2002). O tempo de meia-vida deste metabólito foi encontrado elevado devido a sua passagem do fígado para a bile sendo em seguida excretado pela bile, podendo a partir de então resultar em lesão nas células hepáticas e biliares por inibir o transporte de ácido biliar (Kawai *et al.*, 1998). Um segundo metabólito proveniente da catalização da troglitazona é a sua forma glucoronada, gerada a partir da ação da enzima UGT1A1, a qual age adicionando uma unidade de ácido glucurônico a este xenobiótico (Watanabe *et al.*, 2002). Em adição, as enzimas CYP3A4, CYP2C8 e CYP2C19 atuam no processo de oxidação da troglitazona produzindo um metabólito do tipo quinona. Anos mais tarde novos estudos revelaram que os metabólitos gerados pela degradação da troglitazona não causaram toxicidade relevante em células hepáticas HepG2 (Yamamoto, *et al.*, 2001; Lloyds, S. *et*

*al.*, 2002). Verificou-se então, que a hepatotoxicidade causada pela troglitazona é do tipo idiossincrática, ou seja, toxicidade característica daquela molécula especificamente, e não da classe a qual ela pertence nem tampouco causada pelos metabólitos secundários (FDA, 2000).

Segundo Cox *et al.* (2000) a rosiglitazona é metabolizada através de processos de hidroxilação, onde ocorre a adição ou substituição de grupos hidroxila à estrutura do xenobiótico, e N-desmetilação, na qual grupos metila (CH<sub>3</sub>) são removidos da estrutura molecular. Estes dois processos de metabolização utilizam enzimas hepáticas, dentre elas as enzimas do citocromo P450. Por sua vez, a pioglitazona é metabolizada pelas enzimas hepáticas CYP2C8 e CYP3A4 (Braunstein, 2003; Eckland & Danhof, 2000).

Atrelada a toxicidade decorrente do uso das TZDs, há ainda um certo tipo de abordagem que pode potencializar o efeito hepatotóxico, a associação medicamentosa, que, sob diversas condições apresentou-se tóxico às células hepáticas (Scheen, 2005).

#### 4. CONCLUSÃO

Apesar dos benefícios concedidos pelo uso das TZDs, diversos estudos mostraram efeitos adversos dos quais não se pode tratar como exíguo. Embora os mecanismos propostos para explicar os possíveis efeitos tóxicos desta classe de fármacos, não se chegou a um consenso sobre a causa da toxicidade. Sendo assim, mais estudos que avaliem a segurança desses medicamentos são essenciais bem como o desenvolvimento de novas moléculas desta classe, que apresente os mesmos benefícios sem oferecer altos riscos.

#### 5. REFERÊNCIAS

- BOLTON J. L. *et al.* Role of quinone in toxicology. *Chem Res Toxicol*, v. 13, p. 135–160, 2000.
- BRAUNSTEIN, S. New developments in type 2 diabetes mellitus: Combination therapy with a thiazolidinedione *Clinical Therapeutics.*, v. 25(7), p. 1895–1917, 2003.
- CHANG, E.; PARK, C.; PARK, S. W. Role of thiazolidinediones, insulin sensitizers, in non-alcoholic fatty liver disease. *J Diabetes Invest.*, v. 4(6), p. 517–524, 2013.
- COX, P.J. *et al.* Absorption, Disposition, and Metabolism of Rosiglitazone, a Potent Thiazolidinedione Insulin Sensitizer, in Humans. *Drug Metabolism and Disposition.*, v. 28(7), p. 772-780, 2000;
- ECKLAND, D. A.; DANHOF, M. Clinical pharmacokinetics of pioglitazone. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.*, v. 108, p 234-242, 2000.
- GILES, T. D.; SANDER G. E. Effects of thiazolidinediones on blood pressure. *Current Hypertension Reports.*, v 9, p 332-337, 2007.
- HONMA, W. *et al.* Phenol sulfotransferase, ST1A3, as the main enzyme catalyzing sulfation of troglitazone in human liver. *Drug Metab Dispos*, v. 30, p. 944–952, 2002.
- ISLEY, W.L. Hepatotoxicity of thiazolidinediones. *Expert Opin. Drug. Saf.*, v.2 (6), p 581 – 586, 2003.

- ISLEY, W.L.; OKI, J.C. Hepatotoxicity of thiazolidinediones. *Diabetes, Obesity and Metabolism.*, v. 3, p. 389-392, 2001.
- JAMES KOHLROSER, *et al.* Hepatotoxicity Due to Troglitazone: Report of Two Cases and Review of Adverse Events Reported to the United States Food and Drug Administration. *Am. Coll. of Gastroenterology*, v. 95(1), 272-276, 2000.
- LALLOYER, F.; STAELS, B. Fibrates, glitazones, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, v. 30(5), p. 894-899, 2010.
- MARCY, T.R.; BRITTON, M.L.; BLEVINS, S.M. Second-Generation Thiazolidinediones and Hepatotoxicity. *The Annals of Pharmacotherapy*, v. 38(9), p. 1419-1423, 2004.
- MOREL, J.; SINGER, M. Statins, fibrates, thiazolidinediones and resveratrol as adjunctive therapies in sepsis: could mitochondria be a common target?. *Care Medicine Experimental*, v. 2(1), p. 9, 2014.
- QUEIROZ, J. C. F. *et al.* Controle da adipogênese por ácidos graxos. *Arq Bras Endocrinol Metab.*, v. 53(5), p. 582-594, 2009.
- RIZOS, C.V. *et al.* How safe is the use of thiazolidinediones in clinical practice?. *Expert Opin. Drug Saf.*, v. 8(1), p. 15-32, 2009.
- SCHEEN, A.J. Drug Interactions of Clinical Importance with Antihyperglycaemic Agents : An Update. *Drug Saf.*, v. 28(7), p. 601-631, 2005.
- SCHEEN, A. J. Hepatotoxicity with thiazolidinediones: is it a class effect?. *Drug Saf.*, v. 24(12), p. 873-88, 2001.
- SCHULTZ, W.A.; EICKERLMANN, P.; SIES, H. Free radicals in toxicology: redox cycling and NAD(P)H:quinone oxidoreductase. *Arch Toxicol Suppl*, v. 18, p. 217-222, 1996.
- SZAPARY, P.O. *et al.* Effects of pioglitazone on lipoproteins, inflammatory markers, and adipokines in nondiabetic patients with metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, v.26(1), p.182-8, 2006
- The Food and Drug Administration (FDA). *JAMA*, v. 283, p. 2228, 2000.
- WATANABE, Y.; NAKAJIMA, M.; YOKOI, T. Troglitazone glucuronidation in human liver and intestine microsomes: high catalytic activity of UGT1A8 and UGT1A10. *Drug Metab Dispos*, v. 30, p. 1462-1469, 2002.
- YAMAMOTO, Y. *et al.* Cytotoxicity and apoptosis produced by troglitazone in human hepatoma cells. *Life Sci*, v. 70, p. 471-482, 2001.
- YAMAZAKI, H. *et al.* Oxidation of troglitazone to a quinone-type metabolite catalyzed by cytochrome P-450 2C8 and P-450 3A4 in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos*, v. 27, p. 1260-1266, 1999.
- YKI-JÄRVINEN, H. Thiazolidinediones. *N Engl J Med.*, v. 351(11), p. 1106-18, 2004.
- YOKOI, T. Troglitazone. *Adverse Drug Reactions*. Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010.
- ZHANG, B. *et al.* Characterization of Protein-DNA Interactions within the Peroxisome Proliferator-responsive Element of the Rat Hydratase-Dehydrogenase Gen. *The journal of biological chemistr.*, v. 268(17), p. 12939-12945, 1993.



## **6. AGRADECIMENTOS**

Nossos agradecimentos ao Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT) e à Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).



ÁREA DE SUBMISSÃO: PESQUISA CLÍNICA E PRÉ-CLÍNICA – PC 4

## AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA CENTRAL DE QUATRO DERIVADOS SINTÉTICOS DE ISATINA EM RATOS.

N. S. LIMA<sup>1</sup>, J. C. LEAL<sup>1</sup>, C. C. S. PINHO<sup>1</sup>, P. A. T. M. GOMES<sup>2</sup>; A. C. L. LEITE<sup>2</sup> e F. S. DUARTE<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências (CB), Departamento de Fisiologia e Farmacologia,

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Departamento de Ciências Farmacêuticas

E-mail para contato: nata\_1\_22@hotmail.com

**RESUMO** – *Muitos estudos vêm revelando que a isatina representa uma molécula privilegiada para descoberta de novos potenciais agentes bioativos, e seus derivados constituem uma classe importante de compostos heterocíclicos que demonstram possuir um amplo espectro de atividade biológica. O presente trabalho teve por objetivo investigar os possíveis efeitos de quatro novos derivados sintéticos da isatina (PAInt1, PAIA, PA3A e PAIC) em ratos avaliados em modelos animais de screening para atividade farmacológica central. Ratos Wistar adultos machos foram tratados por via oral com veículo (cremofor a 10% em água destilada), PAlnt1 (10 ou 50 mg/kg), PAIA (10 ou 50 mg/kg), PA3A (10 ou 50 mg/kg) ou PAIC (10 ou 50 mg/kg) e, uma hora após, cada rato foi avaliado nos seguintes testes comportamentais: teste da transição claro-escuro, campo aberto, roda giratória e convulsões quimicamente induzidas por pentilenotetrazol (PTZ). Nossos resultados mostraram que o derivado sintético de isatina PAlnt1 apresentou um perfil de atividade farmacológica característico de drogas do tipo ansiolíticas, enquanto o derivado PAIA apresentou um perfil compatível com drogas hipnosedativas. Os demais compostos foram desprovidos de ações centrais quando avaliados nos testes comportamentais aqui utilizados. Entretanto, novos estudos são necessários para melhor caracterizarmos o perfil de atividade farmacológica das moléculas derivadas de isatina.*

*Palavras chave: isatina, síntese, heterocíclicos, ansiolítico, anticonvulsivante.*

**ABSTRACT** – *Many studies revealed that isatin is a privileged lead molecule for scheming potential bioactive agents, and their derivatives constitute an important class of heterocyclic compounds and are shown to possess a broad spectrum of bioactivity. This*



*study aimed to investigate the possible effects of four new synthetic derivatives of isatin (PAInt1, PA1A, PA3A and PA1C) in animal models for screening of central pharmacological activity. Adult male Wistar rats were orally treated with vehicle (cremophor 10% in distilled water), PAlnt1 (10 or 50 mg/kg), PA1A (10 or 50 mg/kg), PA3A (10 or 50 mg/kg) or PA1C (10 or 50 mg/kg) and, an hour later, each rat was evaluated in the following behavioral tests: light-dark transition test, open-field, rota-rod and seizures chemically induced by pentylenetetrazole (PTZ). Our results showed that the PAlnt1 isatin synthetic derivative induced an anxiolytic-like effect while PA1A derivative showed a profile similar to hypnosedative drugs. The other compounds tested were devoid of central actions in the behavioral tests used in the present study. However, further studies are needed to better characterize the profile of pharmacological activity of molecules derived from isatin.*

*Keywords: isatin, synthesis, heterocyclic, anxiolytic, anticonvulsant.*

## 1. INTRODUÇÃO

A molécula de isatina apresenta grande versatilidade sintética, podendo ser utilizada na elaboração de diversos sistemas heterocíclicos, como derivados indólicos e quinolínicos, o que torna esta molécula importante matéria-prima na síntese de fármacos, segundo Da Silva (2001).

Vários relatos existem quanto às ações centrais de isatina e derivados relacionados, entre eles se destacando as propriedades ansiolíticas, hipnosedativas e anticonvulsivantes, relatadas por Pandeya et al. (2005) e Saravanan et al. (2014). Dentro desse contexto, o presente trabalho teve por objetivo investigar os possíveis efeitos de quatro novos derivados sintéticos da isatina (PAInt1, PA1A, PA3A e PA1C) em ratos avaliados em modelos animais de *screening* para atividade farmacológica central.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais: Ratos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*, adultos machos com idade entre 2,5 e 3,0 meses, com peso em média 300 g, alojados em caixas de polipropileno e mantidos em Biotério com condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2$  °C) e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas, com luz ligada às 7:00 h), recebendo água e ração “*ad libitum*”. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética Local para Uso de Animais (CEUA) da UFPE, com o processo nº. 23076.040157/2014-01.

2.2. Drogas e soluções: Cremofor a 10% em água destilada (veículo), PAlnt1 (10 ou 50 mg/kg), PA1A (10 ou 50 mg/kg), PA3A (10 ou 50 mg/kg) e PA1C (10 ou 50mg/kg). Os compostos PAlnt1, PA1A, PA3A e PA1C foram solubilizados em cremofor a 10 % em água destilada.

2.3. Tratamentos: Ratos previamente selecionados durante dois minutos no teste do rota-rod foram tratados por via oral com veículo (cremofor a 10% em água destilada; utilizado como grupo controle), PAlnt1 (10 ou 50 mg/kg), PA1A (10 ou 50 mg/kg), PA3A (10 ou 50 mg/kg) ou PA1C (10



ou 50 mg/kg). Uma hora após os tratamentos, cada rato foi avaliado individualmente nos seguintes testes comportamentais: teste da transição claro-escuro, campo aberto, roda giratória e convulsões quimicamente induzidas por pentilenotetrazol (PTZ; 80 mg/kg).

### 2.3. Teste da transição claro-escuro

O teste da transição claro-escuro foi inicialmente desenvolvido por Crawley e Goodwin em 1980 e, atualmente, é um teste amplamente validado e utilizado para avaliar comportamentos relacionados à ansiedade em roedores. O aparato é constituído por uma caixa construída em acrílico, com dimensões de 45 x 27 x 27 cm, dividida em dois compartimentos: um de cor branca, representando 2/3 do tamanho total da caixa e altamente iluminado (400 lux), e um compartimento pintado de preto e sem iluminação, representando 1/3 do tamanho total. Os compartimentos são conectados entre si por meio de uma abertura (5 x 5 cm). Os animais foram colocados no centro do compartimento claro com a cabeça voltada para a porta divisória e observados durante 5 min após a primeira entrada no compartimento escuro. Serão considerados para análise: o número de transições entre os compartimentos e o tempo total de permanência dos animais no compartimento claro da caixa, em segundos.

### 2.4. Teste do campo aberto (*open-field*)

O campo aberto (ou arena) foi constituído de madeira coberto com fórmica impermeável branca, com o chão branco de 100 x 100 cm (dividida por linhas pretas em 25 quadrantes de 20 x 20 cm) e paredes brancas (40 cm de altura). Os animais foram colocados individualmente no centro da arena e a frequência de locomoção foi contabilizada pelo número de quadrantes percorridos bem como o número de comportamentos de levantar (*rearing*) (Kelly, 1993).

### 2.5. Teste da roda giratória (*rotarod*)

O *rotarod* foi utilizado para avaliar a coordenação motora e equilíbrio. É um dos testes mais utilizados para medir função motora nos roedores, por ser considerado um dos mais sensíveis para isso. Foi utilizado um aparelho *rotarod* automatizado (EFF 411, Insight® Equipamentos LTDA), que consistiu em uma caixa de acrílico com um cilindro de 7 cm de diâmetro, instalado transversalmente a aproximadamente 20 cm do piso do equipamento, mantido em rotação (16 r.p.m) através de um motor. A caixa era dividida em quatro baias, de aproximadamente 10 cm de largura, permitindo a análise de quatro animais simultaneamente. Ratos pré-selecionados (animais que permaneceram por pelo menos 1 min sobre a barra giratória do rotarod em uma sessão de 2 min, 24 h antes do teste) foram colocados sobre a barra giratória 1 h após cada tratamento oral com veículo ou substâncias-teste. A latência para a primeira queda (em s) e o número de quedas durante a sessão foram registrados. Este teste permite avaliar se os tratamentos promovem incoordenação motora nos animais, por sedação e/ou relaxamento muscular (Duham e Myia, 1957).

### 2.6. Teste de convulsões quimicamente induzidas por pentilenotetrazol

As convulsões foram induzidas com pentilenotetrazol (PTZ) na dose de 80 mg/kg por via intraperitoneal. A latência para a primeira convulsão clônica generalizada e a sua duração, além da

severidade convulsiva e a letalidade, foram registrados. Seiscentos segundos foi o tempo máximo (*cutoff*) utilizado no cálculo dos parâmetros de latência e duração. A severidade foi registrada durante 1 h utilizando a escala de reatividade convulsiva proposta por Czuczwar & Frey (1986): estágio 0: nenhum comportamento convulsivo, estágio 1: abalos mioclônicos, estágio 2: crises clônicas sem perda do reflexo de endireitamento, estágio 3: crises clônicas com perda do reflexo de endireitamento, estágio 4: extensão tônica das patas posteriores, estágio 5: extensão tônica com morte. O índice de severidade foi considerado o maior escore convulsivo alcançado por cada animal.

2.7. Análise estatística: Foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 5.0. As comparações estatísticas foram realizadas pela ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls. O nível de probabilidade igual ou inferior a 5% foi considerado indicativo de significância ( $P \leq 0,05$ ).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme mostra a figura 1 (A), o tratamento oral com o PAInt1 50 mg/kg aumentou a latência de fuga (controle =  $15.6 \pm 2.0$ ; PAInt1 10 mg/kg =  $20.7 \pm 5.1$ , PAInt1 50 mg/kg =  $35.6 \pm 5.4$ ) e, conforme a figura 1 (B), o tempo total de permanência no compartimento claro (controle =  $29.4 \pm 5.8$ ; PAInt1 10 mg/kg =  $29.6 \pm 8.3$ , PAInt1 50 mg/kg =  $61.4 \pm 11.0$ ) no teste da transição claro-escuro, sugerindo um efeito do tipo ansiolítico.

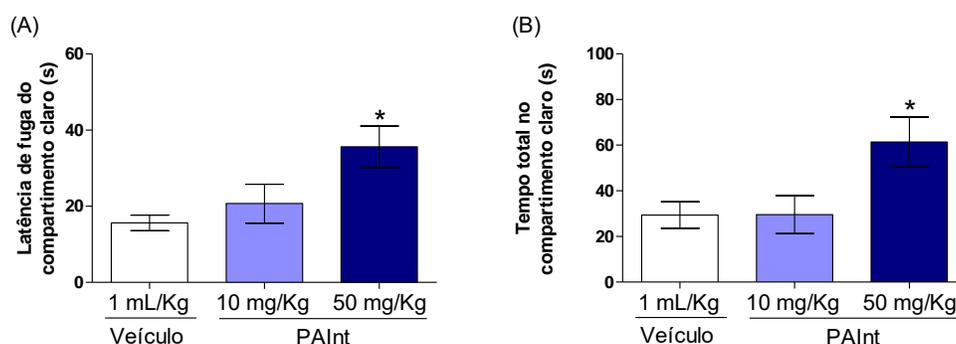
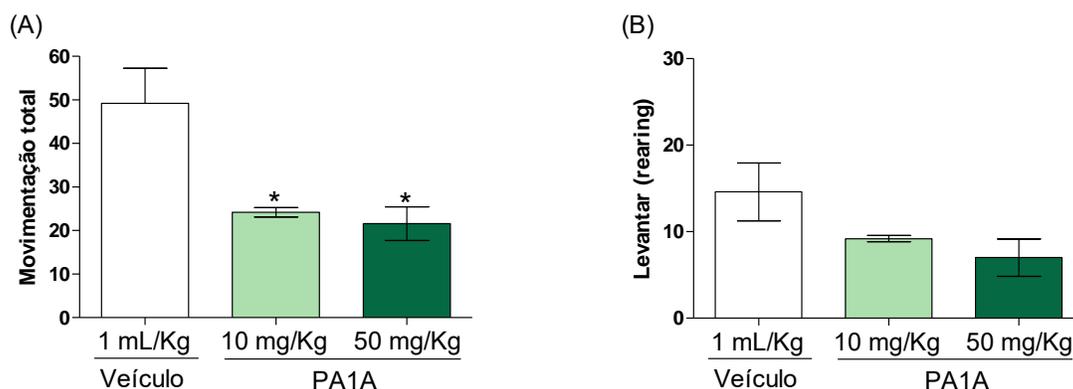


Figura 1. Teste da Transição claro-escuro. A. latência de fuga do compartimento claro, B. Tempo total no compartimento claro.

Conforme a figura 2 (A), o composto PA1A (10 mg/kg e 30 mg/kg) reduziu



significativamente a movimentação total no teste do campo aberto (controle =  $49.2 \pm 8.1$ ; PA1A 10 mg/kg =  $24.2 \pm 1.1$ , PA1A 50 mg/kg =  $21.6 \pm 3.9$ ) e, conforme a figura 2 (B), o comportamento de levantar (*rearing*) (controle =  $14.6 \pm 3.3$ ; PA1A 10 mg/kg =  $9.2 \pm 0.4$ , PA1A 50 mg/kg =  $7.0 \pm 2.2$ ), sugerindo um efeito sedativo.

Figura 2. Teste do campo aberto (*open-field*). A. Movimentação total, B. Comportamento de levantar.

Segundo a figura 3 (A), foi observado uma tendência em reduzir a latência para a primeira convulsão generalizada, compatível com efeito anticonvulsivante, entretanto, não houve diferença estatística em relação ao controle. Já a duração da convulsão não foi modificada quando comparada ao grupo controle, como pode ser visto na figura 3 (B).

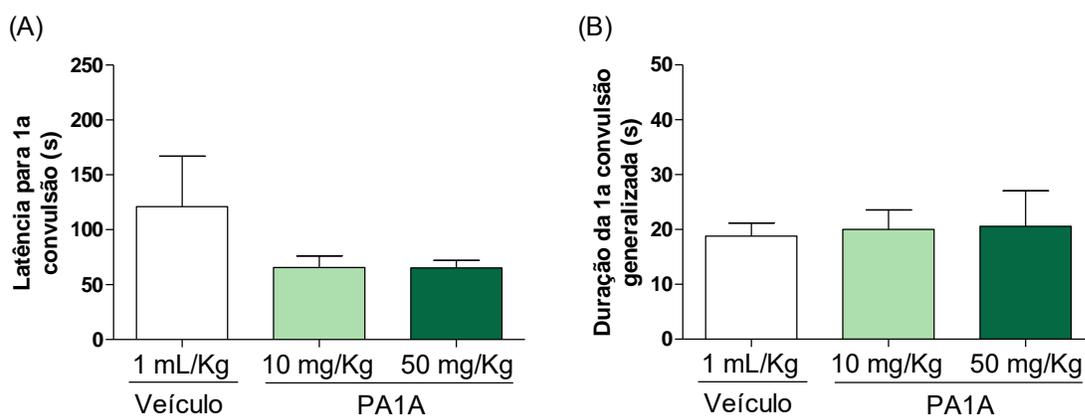


Figura 3. Teste de convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ). A. Latência para 1ª convulsão generalizada, B. Duração da 1ª convulsão generalizada.

Nos demais testes, os compostos aqui estudados não foram capazes de promover alterações comportamentais, na faixa de doses aqui empregadas.

## 4. CONCLUSÃO

Nossos resultados preliminares mostraram que o derivado sintético de isatina PAInt1 apresentou um perfil de atividade farmacológica característico de drogas do tipo ansiolíticas, enquanto o derivado PA1A apresentou um perfil compatível com drogas hipnosedativas. Os demais compostos foram desprovidos de ações centrais, nos testes comportamentais aqui utilizados. Entretanto, novos estudos são necessários para melhor caracterizarmos o perfil de atividade farmacológica das moléculas derivadas de isatina.



## 5. REFERÊNCIAS

- CRAWLEY J, GOODWIN FK.; Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav.*, v. 13, p. 167-170, 1980.
- DA SILVA, J. F. M.; The Chemistry of Isatins: a Review from 1975 to 1999. *Chem. Soc.*, v. 12, p. 273-324, 2001.
- DUNHAM, N. W.; MIYA, T.S.; A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J. Amer. Pharm. Assoc.*, v.46, p.208-210, 1957.
- KELLY, A. E. Locomotor activity and exploration. In: *Behavioural Neuroscience: a Practical Approach*. vol. II. Oxford: Ed. A. Sahgal, 1993. p. 121.
- PANDEYA, S.N et al.; Biological activities of isatin and its derivatives. *Acta Pharm.*, v.1, p. 27-46, 2005.
- SARAVANAN, G.; Anticonvulsant activity of novel 1-(morpholinomethyl)-3-substituted isatin derivatives. *Bulletin of Faculty of Pharmacy.*, v. 52, p.115-124, 2014.

## 6. AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ, ao Laboratório de Neurofarmacologia Experimental - UFPE e ao Laboratório de Planejamento e Síntese em Química Medicinal – UFPE.



ÁREA DE SUBMISSÃO: PESQUISA CLÍNICA E PRÉ-CLÍNICA – PC 5

## AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE IL-33 EM PACIENTES PORTADORES DE ARTRITE REUMATÓIDE COM ATIVIDADE DA DOENÇA

<sup>2</sup>K.M. VILAR; <sup>2</sup>M.C. PEREIRA; <sup>2</sup>M.J.B.M. RÊGO; <sup>3</sup>L.F. ROCHA-JUNIOR; <sup>3</sup>A.T. DANTAS;  
<sup>1</sup>I.R. PITTA; <sup>3</sup>A. L. B. P. D. DUARTE; <sup>2</sup>M. G. R. PITTA.

<sup>1</sup> Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino, Universidade Federal de Pernambuco.

<sup>2</sup> Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas Suely Galdino, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco.

<sup>3</sup> Serviço de Reumatologia, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco  
E-mail para contato: kamilamelo\_vilar@hotmail.com

**RESUMO** – A Artrite reumatóide é uma doença inflamatória crônica, que afeta aproximadamente 1% da população. Acomete especialmente os tecidos sinoviais, podendo haver envolvimento extra-articular. A interleucina 33 (IL-33) é uma citocina pró-inflamatória que está envolvida no processo inflamatório de várias doenças. Nosso objetivo foi determinar o perfil sérico de IL-33 no pacientes portadores de artrite reumatóide, correlacionando os achados com a gravidade da doença. Através da metodologia do ELISA, quantificamos a IL-33 nos pacientes com AR e nos controles. Nossos resultados sugerem uma associação entre a citocina e o CDAI, sendo necessário aumentar o grupo amostral para correlacionar a IL-33 com outros achados clínicos.

*Palavras-chave:* Doença autoimune, Citocina, Inflamação

**ABSTRACT** - Rheumatoid arthritis is a chronic inflammatory disease that affects approximately 1% of the population. Affects the synovial tissues, and there may be extra-articular involvement. Interleukin 33 (IL-33) is a proinflammatory cytokine that is involved in inflammatory processes of various diseases. Our objective was to determine IL-33 serum profile in patients with rheumatoid arthritis, correlating with the severity of disease. Using ELISA methodology, we quantify IL-33 in patients with RA and controls. Our results suggest an association between cytokine and the CDAI, being necessary to increase the sample group to correlate the IL-33 with other clinical findings.

*Keywords:* Autoimmune disease, Cytokine, Inflammation



## 1. INTRODUÇÃO

A artrite reumatóide (AR) é uma doença inflamatória crônica, de etiologia desconhecida que afeta aproximadamente 1% da população mundial (McInnes *et al.*, 2011). A doença costuma se apresentar entre a 4ª e a 6ª década de vida, acometendo três vezes mais mulheres com idade inferior a 45 anos em relação aos homens. A qualidade de vida dos pacientes com AR é significativamente reduzida pela dor, fadiga, perda de função corporal (Silman *et al.*, 2002).

O sítio inflamatório primário da AR é a membrana sinovial, que mostra um hiperplasia celular e processo inflamatório configurando a sinovite. Quando evolui sem tratamento, ou mesmo nos casos mais refratários, há destruição articular progressiva com perda cartilaginosa e óssea (Firestein *et al.*, 2013). O entendimento do papel das citocinas tem permitido o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento da AR. Estudos em humanos e experimentais têm demonstrado o potencial papel da interleucina 33 (IL-33) (Hong *et al.*, 2010).

A IL-33 foi recentemente descrita como um novo membro da família da IL-1, cuja característica comum é a atividade pró-inflamatória, atuando na indução de lesão por esforço, agentes patogênicos, ou a morte celular por ativação de células imunes locais. Apresenta um importante papel imunológico associado à resposta Th2, estimulando de modo significativo a secreção de IL-5 e IL-13 por células Th2 polarizadas (Lukens *et al.*, 2012).

A IL-33 é produzida intracelularmente como pró-IL-33 e, após sofrer clivagem, é secretada no meio extracelular como IL-33 madura. Sua forma bioativa é liberada como resultado de necrose celular e funciona como um gatilho inflamatório através de ação autócrina e parácrina (Liew *et al.*, 2014). Essa citocina é expressa principalmente pelos queratinócitos, células epiteliais e endoteliais (Moussion *et al.*, 2008), bem como por monócitos humanos (Nile *et al.*, 2010) e astrócitos de rato (Kempuraj *et al.*, 2013).

Como a citocina apresenta funções em diversos tipos celulares e em diferentes condições clínicas como asma, sepse, aterosclerose e artrite reumatóide, nosso objetivo foi determinar o perfil sérico de IL-33 nos pacientes portadores de artrite reumatóide, correlacionando os achados com a gravidade da doença.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Seleção e coleta dos pacientes e controles

Foram selecionados 30 pacientes sem distinção de gênero, com idades acima de 18 anos, atendidos no Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, com diagnóstico de AR de acordo com os critérios do *American College of Rheumatology* (ACR) de 1987.

O grupo controle foi formado por 30 pacientes, escolhidos ao acaso, sem uso de medicamentos imunossupressores ou doenças reumatológicas. Os dois grupos foram pareados por sexo e idade.

Para o estudo, foi necessário coletar amostras do sangue periférico, cerca de 10 ml em tubo seco, dos pacientes e do grupo controle. O soro foi separado e estocado no freezer -80°C para as dosagens.

### 2.1 Quantificação da IL-33

A IL-33 presente no soro dos pacientes e dos controles foi quantificada através do teste imunoenzimático ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) do tipo sanduíche, que consiste num teste de alta especificidade e sensibilidade para detecção do antígeno desejado a partir da ligação de anticorpos específicos, seguindo as informações recomendadas pelos fornecedores (R&D, limite de detecção 11,7187pg/mL). As placas foram lidas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 450 e 570 nm.

### 2.2 Análise estatística

A estatística utilizada foi pelo teste de Mann-Whitney, que é um teste não paramétrico aplicado para duas amostras independentes. Foram consideradas estatisticamente significantes as análises com o  $p < 0,05$ .

A aprovação do CEP é a de número CCAE-53554116.6.0000.5208

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados que tivemos foram com base de 30 pacientes diagnosticados com artrite reumatóide, sendo 26 mulheres e 4 homens. O grupo controle constituído por 30 indivíduos saudáveis, dentre eles 26 mulheres e 4 homens (Tabela 1).

Tabela 1 – Paciente AR e Controles

<b>Artrite Reumatóide</b>	<b>30</b>
Mulheres	26
Homens	4
<b>Controles</b>	<b>30</b>
Mulheres	26
Homens	4

A dosagem da citocina encontrou-se elevada tanto nos pacientes com AR (n=30) quanto nos controles (n=30), não encontrando diferenças significativas entre os grupos ( $p = 0.4063$ , mediana = 11.72), como demonstrado na figura 1.

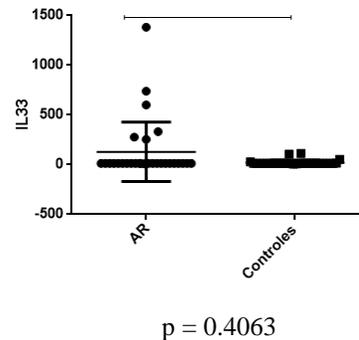


Figura 1 – Níveis de IL-33 nos pacientes e controles.

A atividade da doença foi avaliada pelo escore de atividade da doença em 28 articulações (Disease Activity Score 28 – DAS28), sendo dividida em atividade moderada ( $<3,2$ ) e atividade grave ( $>3,2$ ) ( $p=0.2388$ ; mediana= 11.72; mínimo =8.381; máximo =277).

Outro parâmetro avaliado foi o índice clínico de atividade de doença (Clinical Disease Activity Index – CDAI), semelhante ao DAS28, porém sem utilizar nenhum dado laboratorial. O CDAI foi avaliado tendo como base valores  $<22$ , pacientes em atividade leve e  $>22$  pacientes em atividade grave, no qual encontramos níveis significativamente aumentados da citocina neste último grupo ( $p=0.0110$ , mediana =11.72, mínimo =11.72, máximo = 738.9) (Figura 2).

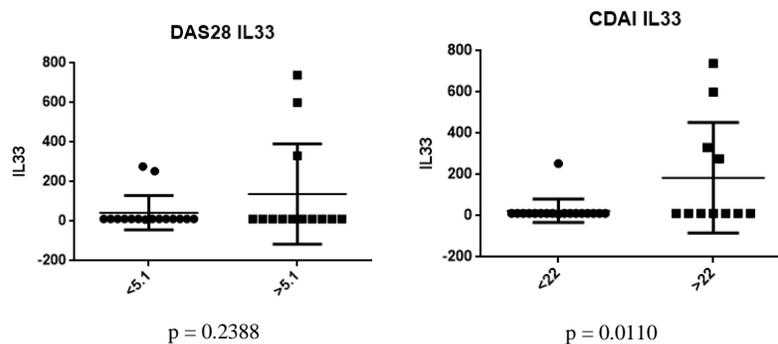


Figura 2 – DAS28 e CDAI.

#### 4. CONCLUSÃO

Nossos resultados não seguiram os dados que encontramos na literatura, onde a IL-33 encontra-se aumentada nos pacientes quando comparada ao grupo controle. No entanto, encontramos um aumento dos níveis séricos da citocina nos pacientes com índice clínico de atividade de doença grave, esse resultado sugere que a IL-33 pode estar relacionada com a



gravidade da doença nos nossos pacientes. Diante desse achado, se faz necessário aumentar nosso grupo amostral e correlacionar com outros achados clínicos para compreender melhor o papel da citocina na patogenia da doença nos nossos pacientes atendidos no HC.

## 5. REFERÊNCIAS

- MCINNES IB, SCHETT G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2011;365(23):2205-2219.
- SILMAN AJ, PEARSON JE. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2002; 4: 265-72.
- FIRESTEIN GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*. 2003;423(6937):356–61.
- HONG YS, MOON SJ, JOO YB, JEON CH, CHO ML, JU JH, et al. Measurement of interleukin-33 (IL-33) and IL-33 receptors (sST2 and ST2L) in patients with rheumatoid arthritis. *J Korean Med Sci*. 2011;26(9):1132–9.
- LUKENS JR, GROSS JM, AND KANNEGANTI TD (2012) IL-1 family cytokines trigger sterile inflammatory disease. *Front Immunol* 3:315
- LIEW FY, PITMAN NI, McInnes IB. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(2):103–10.
- MOUSSION C, ORTEGA N, AND GIRARD JP (2008) The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel ‘alarmin’? *PLoS ONE* 3:e3331
- NILE CJ, BARKSBY E, JITPRASERTWONG P, PRESHAW PM, AND TAYLOR JJ (2010) Expression and regulation of interleukin-33 in human monocytes. *Immunology* 130: 172–180.
- KEMPURAJ D, KHAN MM, THANGAVEL R, XIONG Z, YANG E, AND Zaheer A (2013) Glia maturation factor induces interleukin-33 release from astrocytes: implications for neurodegenerative diseases. *J Neuroimmune Pharmacol* 8:643–650.

## 6. AGRADECIMENTOS

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT).



ÁREA DE SUBMISSÃO: PESQUISA CLÍNICA E PRÉ-CLÍNICA – PC 10

## AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE INDUÇÃO DE MORTE DO DERIVADO LPSF/AA-29 NA LINHAGEM DE CÂNCER DE MAMA MCF-7

F. A. SANTOS<sup>1</sup>, M. S. SILVA<sup>1</sup>, M. C. PEREIRA<sup>1</sup>, M. J. B. M. RÊGO<sup>1</sup>,  
M. C. O. LIMA<sup>3</sup>, M. G. ROCHA-PITTA<sup>2</sup>, I. R. PITTA<sup>1,2</sup> e M. G. R. PITTA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêutica (LINAT), Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT)

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Laboratório de Síntese e planejamento de fármacos (LPSF), Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT)

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de antibióticos, Laboratório de Química e Inovação(LQIT).

E-mail: flaviana\_federal@hotmail.com

**RESUMO:** *O câncer se configura como uma das doenças de maior morbidade e mortalidade do mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) o número de casos novos deve aumentar em 70% nas próximas duas décadas. Apesar dos muitos avanços nos tratamentos disponíveis a maioria dos quimioterápicos possui baixa seletividade e muitos efeitos colaterais, além de muitos pacientes acabarem desenvolvendo resistência aos tratamentos disponíveis. O objetivo do estudo foi avaliar o mecanismo de indução de morte do derivado tiazacridinico composto LPSF/AA-29 na linhagem de câncer de mama MCF-7. Foram avaliados o efeito do LPSF/AA-29 no ciclo celular com iodeto de propídeo, na indução da morte pela dupla marcação DAPI e acridina orange e a avaliação da clivagem de caspase 7 efetora, por citometria de fluxo. O derivado tiazacridínico LPSF/AA-29 induziu um arrasto no ciclo celular na fase G0/G1 na linhagem MCF-7 de câncer de mama (60,2%) comparado com as células não tratadas. Ademais o derivado aumentou a porcentagem para 56,24% de células em apoptose como também conseguiu induzir a clivagem das caspase 7 aumentando a porcentagem de células marcadas de 6,43% (células não tratadas) para 61%(p=0,0242), na dose do IC50. Desta forma, os resultados obtidos indicam que o composto LPSF/AA-29 induziu a morte celular através da clivagem da caspase 7 e de arrasto no ciclo celular na linhagem de câncer de mama MCF-7.*

**Palavras-chave:** *Atividade antineoplásica, tiazacridina, apoptose*



**ABSTRACT:** *Cancer is configured as a disease of increased morbidity and mortality in worldwide. According to the World Health Organization (WHO) the number of new cases is expected to increase by 70% over the next two decades ). Despite many advances in treatments available most chemotherapy has low selectivity and many side effects and many patients end up developing resistance to available treatments. The aim of the study was to evaluate the death induction mechanism of tiazacridinic derivative LPSF / AA-29 in breast cancer cell line MCF-7. We evaluated the effect of LPSF / AA-29 in the cell cycle with propidium iodide and induction of death by DAPI double labeling and acridine orange and assessment of caspase 7, by flow cytometry. The tiazacridinic derivative LPSF / AA-29 induced cell cycle arrest in G0 / G1 phase in MCF-7 cells (60.2%) compared to untreated cells. Moreover the derivative increased to 56.24% percentage of cells undergoing apoptosis and could also induce cleavage of caspase-7 by increasing the percentage of labeled cells in 6.43% (untreated cells) to 61% ( $p = 0.0242$ ) in the IC50 dose. Thus, the results indicate that the compound LPSF / AA-29 induced cell death through cleavage of caspase 7 and drag the cell cycle in breast cancer cell line MCF-7.*

*Keywords: Antineoplastic activity, tiazacridine, apoptosis*

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer é definido como um conjunto de mais de 200 tipos de doenças que têm em comum o crescimento descontrolado de células que invadem os tecidos buscando ambientes de manutenção das células tumorais (Almeida *et al.*, 2005). De acordo com dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), somente no Brasil, surgem cerca de 500 mil novos casos com aproximadamente 175 mil mortes anuais decorrentes de complicações ocorridas durante o percurso da doença ou do tratamento. O câncer é um problema de saúde pública em todo o mundo e uma das causas mais relevantes de morbimortalidade entre crianças e adultos (WHO, 2013)

O câncer de mama é o tipo de câncer mais comum entre as mulheres no mundo e no Brasil, depois do de pele não melanoma, respondendo por cerca de 25% dos casos novos a cada ano (INCA). Atualmente, o principal método de tratamento para pacientes com câncer é a quimioterapia sistêmica difusa. No entanto muitos pacientes desenvolvem resistência aos tratamentos e esse é um dos maiores obstáculos que interferem significativamente na eficácia da quimioterapia frente às neoplasias, levando as células a desenvolverem adaptações aos agentes quimioterápicos (González-Sánchez *et al.*, 2011).

Assim a busca de novos compostos com atividade anticâncer é de fundamental importância. Uma estratégia da química medicinal é a hibridização molecular, na qual em uma mesma molécula são arranjos grupo farmacofórico com atividade conhecida. Os derivados tiazacridínicos, são derivados formados a partir da fusão de dois importantes farmacóforos o anel tiazolidínico e o anel acridínico. O anel tiazolidínico atua como agonista sintético dos receptores PPARs (receptores ativados por proliferador de peroxissoma). Alguns estudos recentes mostram o papel antineoplásico deste receptor, participando na indução da apoptose celular (Elrod *et al.*



2008). Ligantes sintéticos do PPAR $\gamma$  tem papel antitumoral frente a linhagens de câncer de pulmão (Han, 2010), câncer esofágico (Sawayama *et al.*, 2014) e leucemias entre outras neoplasias (Rocha-Pitta *et al.*, 2013). A atividade antitumoral dos compostos da classe das acridinas vem sendo extensivamente estudadas ao longo das últimas décadas (Cui *et al.*, 2016). As acridinas têm sido apontadas como fortes candidatas a fármacos antineoplásicos devido a sua capacidade de ligar-se ao DNA, intercalando-se entre os pares de bases, e inibindo as enzimas topoisomerase I e II, essenciais na divisão celular (Salem *et al.*, 2016; Ketron *et al.*, 2012). Esses mecanismos interferem na estrutura e na integridade funcional do genoma alterando ou impedindo o processo vital da progressão celular, promovendo a morte da célula maligna. Esse estudo tem como objetivo avaliar a atividade anticâncer de um derivado híbrido, com atividade antitumoral já reportada em estudos do mesmo grupo, a fim de identificar seu mecanismo de indução de morte na linhagem de câncer de mama MCF-7.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Derivado tiazacridínico

O composto LPSF/AA-29 (3-Acridina-9- ilmetileno-5-(5-bromo- 1H-indol-3- ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona) foi sintetizado pelo grupo Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF). Para os experimentos com a linhagem de mama, o derivado foi diluído em DMSO (Sigma) e diluições mais baixas foram feitas diretamente no meio de cultura. A concentração final de DMSO, em todos os testes, incluindo os controles, foi no máximo de 0,2%.

### 2.2 Cultivo de células

As células da linhagem tumoral de mama MCF-7 foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, 10 mM de HEPES e 1% U/mL de Penicilina/Estreptomicina. Essa linhagem foi mantida em estufa de CO<sub>2</sub> 5% a 37°C.

### 2.3 Análise do Ciclo celular

As células foram distribuídas em placas de 6 poços numa concentração de  $0,5 \times 10^6$  células por poço e tratadas na concentração do IC<sub>50</sub> e após 48 horas as células foram tripsinizadas e lavadas 2x com PBS e fixadas em álcool 70 % à 4-6 °C. Em seguida, as células foram incubadas por 24 horas à - 20 °C. Em uma segunda etapa, as células foram marcadas com iodeto de propídeo (5 mg/mL)/RNase A (0,25 mg/mL) em PBS por 30 minutos sobre o gelo e protegido da luz. O conteúdo de DNA celular foi quantificado através de citometria de fluxo utilizando o citômetro de fluxo Accuri C6, onde a porcentagem de DNA em cada fase do ciclo foi obtida pelo programa C6 software (Becton, Dickinson and Company, USA).

### 2.4 Análise da indução de morte celular



A apoptose também foi avaliada por dupla coloração de fluorescência com DAPI (Sigma) e laranja de acridina (AO) (AO/DAPI). As células MCF-7 foram tratadas com o composto LPSF/AA-29 ( $IC_{50} = 40,76 \mu M$ ) durante 48 horas e depois as células foram lavadas 2 vezes com PBS 1X e fixadas com paraformaldeído a 4% durante 20 minutos. As células foram coradas com AO (8,5  $\mu g/ml$ ) e o corante nuclear com DAPI (5  $\mu g/ml$ ) durante 15 min no escuro e lavadas novamente por 2 vezes com PBS 1x. Posteriormente as lamínas foram analisadas sob uma ampliação de X10 utilizando um microscópio de fluorescência. As células em apoptose exibem um núcleo verde-claro em que a condensação da cromatina era observada pela presença de áreas verdes densas. As células apoptóticas foram calculadas como a razão de células apoptóticas (células com características apoptóticas) para o total de células. Foram contados 10 campos com o auxílio do programa ImageJ (Versão 1.49) (NIH, USA).

### 2.5 Avaliação da clivagem de caspase 7

As células MCF-7 foram cultivadas  $5 \times 10^5$  por poço em placas de 6 poços e incubadas à 37 °C sob atmosfera de 5% de  $CO_2$  por 24 horas. As células foram tratadas na concentração do  $IC_{50}$  com os compostos LPSF/AA-29 e após 48 horas as células foram tripsinizadas e lavadas 2x com PBS. Posteriormente foram ressuspensas em meio completo e marcadas com o reagente Cell Event® Caspase 3/7 Green (Thermo Fisher) por 30 minutos e incubadas à 37 °C a 5% de  $CO_2$ . E durante 5 minutos marcado com SYTOX® AADvanced para marcar as células necróticas. Sendo lido utilizando o citômetro ATTUNE. E posteriormente os resultados foram analisados utilizando o software flowjow. O kit utilizado não distingue as caspases efetoras 3 e 7; no entanto as células de mama MCF-7 possuem o gene da caspase 3 truncado. Desta forma, não expressam essa proteína (KUMAR et al., 2013; TOR et al., 2015).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

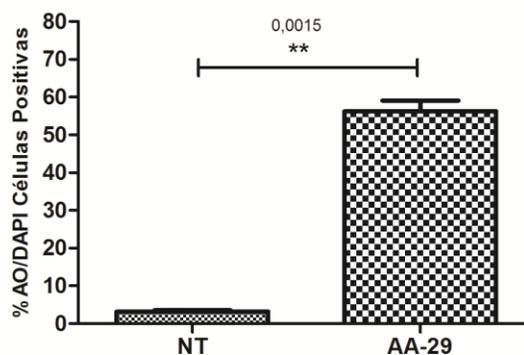
A síntese, seletividade e atividade antineoplásica do derivado tiazacridínico LPSF/AA-29 foi estudada em trabalho prévio do grupo. No presente estudo decidimos aprofundar o mecanismo antitumoral do derivado na linhagem de mama MCF-7, visto que o composto mostrou potencial atividade citotóxica na linhagem de câncer de mama com  $IC_{50}$  de 40,76  $\mu M$ . O derivado tiazacridínico, no presente estudo, induziu um aumento da porcentagem de células na fase G0/G1 de 52,93% para 60,2% quando comparado a condição não tratada na linhagem MCF-7 (tabela 1). A indução da alteração no ciclo celular pode levar às células tumorais a morte. Muitos agentes antiproliferativos interferem na maquinaria do ciclo celular e para podem reter as células em diversas fases do ciclo celular (Kim *et al.*, 2007; Karthik *et al.*, 2014). O anel tiazolidínico pode estar envolvido no mecanismo de indução do arrasto do ciclo celular. Trabalhos mostram que a Troglitazona, é uma molécula da família das tiazolidinodionas, induz o arrasto no ciclo celular em linhagens de carcinoma de próstata (PC-3) (Zhu *et al.*, 2010; Elrod *et al.*, 2008). Fajas e colaboradores também demonstraram a capacidade do Troglitazona induzir arrasto no ciclo celular na fase G1 em células de hepatocarcinoma celular (HLF) (Fajas *et al.*, 2003). González-Sánchez e colaboradores, 2011 também encontraram alteração no ciclo celular, fase G2/M em células de leucemia (K562) tratada com um derivado acridínico, 9-

anilinoacridines. O derivado LPSF/AA-29 possui o anel 5-Bromo-indol na sua estrutura química. Esse grupamento químico pode ter aumentando capacidade citotóxica desse derivado. Alguns artigos sugerem que esse grupamento aumenta a atividade citotóxica frente a células de câncer de bexiga, câncer colón retal, de câncer de mama (Kassouf *et al.*, 2006; Mansure *et al.*, 2013; Revelant *et al.*, 2015). Adicionalmente, Romagnoli e colaboradores (2013) destacaram que o substituinte indol aumenta a inibição do crescimento de células de câncer de mama MCF-7.

Tabela 1. Efeito do derivado AA-29 no ciclo célula da linhagem MCF7. A tabela mostra a porcentagem de células em cada fase do ciclo. na fase G0/G1 de 52,93% para 60,2%.

	Sub-G0	G0/G1	S	G2/M
NT	0,5 ±0,45	52,93±6,15	5,43±2,10	42,06±6,12
LPSF/AA-29	1,7±1,56	60,2±0,14	4,85±4,85	32,75±3,46

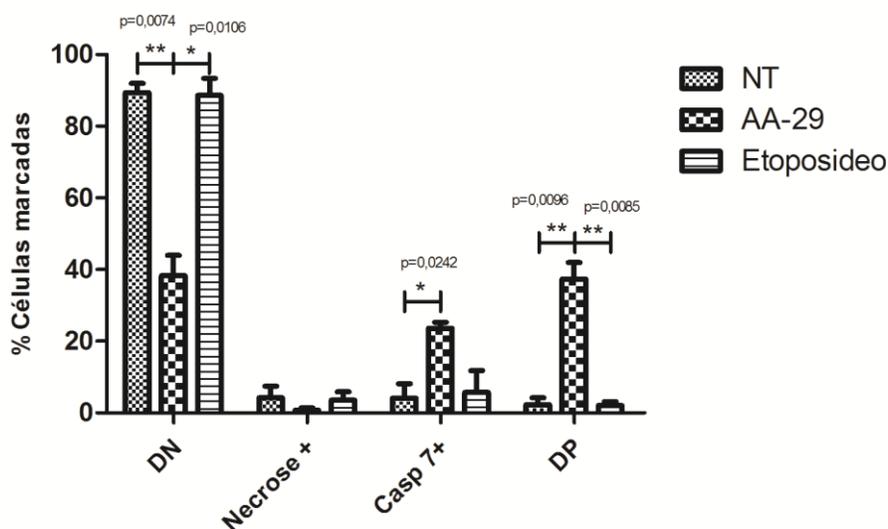
A análise semi-quantitativa do número de células apoptóticas marcadas com Laranja de acridina/DAPI em células MCF-7 tratadas derivado tiazacridínico LPSF/AA-29 mostrou um aumento significativo da indução da apoptose quando comparada as células sem tratamento ( $p=0,0015$ ). Foi observado um aumento de 56.24% de células com características morfológicas de apoptose, incluindo contração nuclear comparado a 3,34% nas células não tratadas, (figura 1). Esses resultados sugerem que o derivado LPSF/AA-29 induz a apoptose celular. O D3CLP, um derivado tiazocquinona e outros derivados acridínicos induziram o aumento de células apoptóticas (Gonzalez-Sánchez *et al.*, 2011). As células tumorais ativam várias vias de sobrevivência celular como genes envolvidos na supressão tumoral, induzir a apoptose celular é uma ferramenta terapêutica valiosa no desenvolvimento de novos fármacos (Hanahan *et al.*, 2011).



**Figura 1.** Porcentagem de células marcadas com laranja de acridina/DAPI não tratadas e tratadas após 48 horas com o derivado LPSF/AA-29.

Visando avaliar o mecanismo de indução de apoptose avaliamos a clivagem da caspase efetora 7 ela é uma proteína que permanecem inativa no citoplasma celular, mas durante o processo de morte celular, são clivadas e se tornam ativas tendo a função de desmontar todo o aparato nuclear e o citoesqueleto (Xu *et al.*, 2014). Observamos que o derivado tiazacridínico LPSF/AA-29

induziu um aumento significativo da porcentagem de células marcadas para caspase 7 clivada. Como pode ser observado na figura 2 o LPSF/AA-29 induziu um aumento das células não tratadas de 4,15% para 23,6% ( $p=0,0074$ ) na marcação com caspase efetora 7 e aumentou de 2,28% para 38,12% ( $p=0,0096$ ) duplamente marcadas para caspase 7 e morte celular por iodeto de propídio. Mostrando assim que a caspase 7 foi recrutada para indução da apoptose mediada pelo derivado LPSF/AA-29. Não foi observado indução da clivagem da caspase 7 efetora na concentração de 25  $\mu$ M em 48 horas de tratamento com o controle etoposídeo. Salem e colaboradores (2016) encontraram que derivados acridínicos induziram apoptose significativamente em células de HL-60. Cui *et al.*, 2016 encontrou derivados acridínicos apresentaram boa citotoxicidade em células tumorais K562 e HepG-2 *in vitro*.



**Figura 2.** Indução da clivagem de caspase 7 em células de mama (MCF-7) não tratadas, tratadas com o derivado LPSF/AA-29 e o controle antitumoral etoposídeo. Os asteriscos representam os valores de  $p$  inferiores a 0,005. DN= Duplamente negativo e DP= Duplamente positivo

#### 4. CONCLUSÃO

O derivado LPSF/AA-29 induziu a morte das células por apoptose, e induz a clivagem da caspase 7. Ademais o derivado induziu um arrasto no ciclo celular. Portanto, este derivado mostra-se promissor para futuros estudos *in vivo*, como nova alternativa para o tratamento do câncer de mama.

#### 5. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; BARRETT REINA, L. D. C.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. *Quim. Nova*, vol. 28,



no. 1, pp. 118–129, 2005.

CUI, Z.; LI, X.; LI, L.; ZHANG, B.; GAO, C.; CHEN, Y.; TAN, C.; LIU, H.; XIE, W.; YANG, T.; JIANG, Y. Design, synthesis and evaluation of acridine derivatives as multi-target Src and MEK kinase inhibitors for anti-tumor treatment. *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 24, no. 2, pp. 261–269, 2016.

CUI, Z.; LI, X.; LI, L.; ZHANG, B.; GAO, C.; CHEN, Y.; TAN, C.; LIU, H.; XIE, W.; YANG, T.; JIANG, Y. Design, synthesis and evaluation of acridine derivatives as multi-target Src and MEK kinase inhibitors for anti-tumor treatment. *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 24, no. 2, pp. 261–269, 2016.

ELROD, H. A.; SUN, S. Y. PPAR $\gamma$ nd Apoptosis in Cancer. *PPAR Res.*, vol. 2008, pp. 1–12, 2008.

FAJAS, L.; EGLER, V.; REITER, R.; MIARD, S.; LEFEBVRE, A. M.; AUWERX, J. PPAR $\gamma$  controls cell proliferation and apoptosis in an RB-dependent manner. *Oncogene*, vol. 22, no. 27, pp. 4186–4193, 2003.

GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, I.; SOLANO, J. D.; LOZA-MEJÍA, M. A.; OLVERA-VÁZQUEZ, S.; RODRÍGUEZ-SOTRES, R.; MORÁN, J.; LIRA-ROCHA, A.; CERBÓN, M. A.; Antineoplastic activity of the thiazolo[5,4-b]quinoline derivative D3CLP in K-562 cells is mediated through effector caspases activation. *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 46, no. 6, pp. 2102–2108, 2011.

HAN, S. W. Anticancer actions of PPAR $\gamma$  ligands: Current state and future perspectives in human lung cancer. *World J. Biol. Chem.*, vol. 1, no. 3, p. 31, 2010.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *CELL*, VOL. 144, NO. 5, PP. 646–74, 2011.

KARTHIK, S.; SANKAR, R.; VARUNKUMAR, K.; RAVIKUMAR, V. Romidepsin induces cell cycle arrest, apoptosis, histone hyperacetylation and reduces matrix metalloproteinases 2 and 9 expression in bortezomib sensitized non-small cell lung cancer cells. *Biomed. Pharmacother.*, vol. 68, no. 3, pp. 327–334, 2014.

KASSOUF, W. S. C.; ABDELRAHIM, G. N. M.; SAFE, S.; KAMAT, A. M. Inhibition of Bladder Tumor Growth by 1,1-Bis(3'-Indolyl)-1-(p-Substitutedphenyl)Methanes: A New Class of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Agonists. *Cancer Res.*, vol. 66, no. 1, pp. 412–418, 2006.

KETRON, A. C.; DENNY, W. A.; GRAVES, D. E.; OSHEROFF, V. Amsacrine as a topoisomerase II poison: Importance of drug-DNA interactions. *Biochemistry*, vol. 51, no. 8, pp. 1730–1739, 2012.

KIM, V.; KWON, K. B.; HAN, M. J.; SONG, M. Y.; LEE, J. H.; KO, Y. S.; SHIN, B. C.; YU, J.; LEE, Y. R.; RYU, D. G.; PARK, J. W.; PARK, B.-H. Induction of G1 arrest and apoptosis by *Scutellaria barbata* in the human promyelocytic leukemia HL-60 cell line. *Int. J. Mol. Med.*, vol. 20, no. 1, pp. 123–8, 2007.

KUMAR, D. R. N.; GEORGE, V. C.; SURESH, P. K.; KUMAR, R. A. Acceleration Of Pro-Caspase-3 Maturation And Cell Migration Inhibition In Human Breast Cancer Cells By Phytoconstituents Of *Rheum Emodi* Rhizome Extracts. *EXCLI Jour.* 462–478, 2013.

MANSURE, J. J.; NASSIM, R.; CHEVALIER, S.; SZYMANSKI, K.; ROCHA, J.; ALDOUSARI, S.; KASSOUF, W. A Novel Mechanism of PPAR Gamma Induction via EGFR Signalling Constitutes Rational for Combination Therapy in Bladder Cancer. *PLoS One*, vol. 8,



no. 2, p. e55997, 2013.

REVELANT, G.; HUBER-VILLAUME, S.; DUNAND, S.; KIRSCH, G. Synthesis and biological evaluation of novel 2-heteroarylimino-1,3-thiazolidin-4-ones as potential anti-tumor agents. *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 94, pp. 102–112, 2015.

ROCHA-PITTA, M. G.; SOUZA, É. S.; BARROS, F. W. A.; MORAES FILHO, M. O.; PESSOA, C. O.; HERNANDES, M. Z.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; PITTA, I.R. Synthesis and in vitro anticancer activity of novel thiazacridine derivatives. *Med. Chem. Res.*, vol. 22, no. 5, pp. 2421–2429, 2013.

ROMAGNOLI, R.; BARALDI, P. G.; SALVADOR, M. K.; PRETI, D.; TABRIZI, M. A.; BASSETTO, M.; BRANCALE, A.; HAMEL, E.; CASTAGLIUOLO, I.; BORTOLOZZI, R.; BASSO, G.; VIOLA, G. Synthesis and Biological Evaluation of 2 - (Alkoxy carbonyl)-3-Anilinobenzo[ b ]thiophenes and Thieno[2,3 - b ]pyridines as New Potent Anticancer Agents. vol. 4, 2013.

SALEM, O. M.; VILKOVÁ, M.; JANOČKOVÁ, J.; JENDŽELOVSKÝ, R.; FEDOROČKO, P.; ŽILECKÁ, E. ; KAŠPÁRKOVÁ, J.; BRABEC, V. ; IMRICH, J.; KOŽURKOVÁ, M. New spiro tria(thia)zolidine-acridines as topoisomerase inhibitors, DNA binders and cytostatic compounds. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2016.

SAWAYAMA, H.; ISHIMOTO, T.; WATANABE, M.; YOSHIDA, N.; SUGIHARA, H. ; KURASHIGE, J.; HIRASHIMA, K.; IWATSUKI, M.; BABA, Y.; OKI, E.; MORITA, M.; SHIOSE, Y.; BABA, H. Small Molecule Agonists of PPAR- Exert Therapeutic Effects in Esophageal Cancer. *Cancer Res.*, vol. 74, no. 2, pp. 575–585, 2014.

TOR, Y. S.; YAZAN, L. S.; FOO, J. B.; WIBOWO, A.; ISMAIL, N.; CHEAH, Y. K.; ABDULLAH, R.; ISMAIL, M.; ISMAIL, I. S.; YEAP, S. K. Induction of apoptosis in MCF-7 cells via oxidative stress generation, mitochondria-dependent and caspase-independent pathway by ethyl acetate extract of *Dillenia suffruticosa* and its chemical profile. *PLoS One*, vol. 10, no. 6, pp. 1–25, 2015.

WHO. Globocan, 2013. *Int. Agency Res. Cancer, World Heal. Organ.*, no. December, pp. 2012–2014, 2013.

XU, W. S.; LI, T.; WU, G. S.; DANG, Y. Y.; HAO, W. H.; CHEN, X. P.; LU, J. J.; WANG, Y. T. Effects of Furanodiene on 95-D Lung Cancer Cells: Apoptosis, Autophagy and G1 Phase Cell Cycle Arrest. *Am. J. Chin. Med.*, vol. 42, no. 01, pp. 243–255, 2014.

ZHU, H.; PAN, X.; QI, H.; WANG, X.; HOU, G.; HAN, B. Troglitazone attenuates epidermal growth factor receptor signaling independently of peroxisome proliferator- activated receptor in PC-3 cells. *Oncol. Rep.*, vol. 25, pp. 81–90, 2010.

## 6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos o apoio os órgãos de fomento Capes, CNPQ, FACEPE e INCT-if pelo apoio financeiro para o desenvolvimento da pesquisa.



ÁREA DE SUBMISSÃO: PESQUISA CLÍNICA E PRÉ-CLÍNICA – PC 11

## AVALIAÇÃO DE CÉLULAS T REGULADORAS DE PACIENTES BRASILEIROS COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

H.L.S NETA<sup>1</sup>, M.C.A.B. CASTRO, M.B.O.CHAGAS, H.A. MARIZ <sup>2</sup>, M.J.B.M. RÊGO <sup>1</sup>, M.C. PEREIRA <sup>1</sup>, I.R. PITTA <sup>1</sup>, C.D.L. MARQUES<sup>2</sup>, A.L.B.P. DUARTE <sup>2</sup>, M.G.R. PITTA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Imunomodulação e novas abordagens terapêuticas/ LINAT, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino – NUPIT SG, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

<sup>2</sup> Hospital das Clínicas de Pernambuco, UFPE, Recife-PE.

E-mail para contato: [silvanetahlj@gmail.com](mailto:silvanetahlj@gmail.com)

**RESUMO** – *O objetivo deste estudo foi investigar as células Treg de pacientes com LES em relação às características clínicas da doença. A imunofenotipagem das células Treg foi realizada utilizando os marcadores para CD4, CD25, FOXP3 e CD127 em amostras de 30 pacientes com LES (15 em atividade/15 em remissão) e 15 voluntários saudáveis. Nós encontramos uma significativa redução de células TCD4<sup>+</sup> em pacientes com LES (p = 0,006). Esta redução foi mais significativa para o grupo com a doença ativa (p <0,001) em relação aos controles. Por outro lado, houve um aumento significativo na frequência de células Treg CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> em todos os pacientes com LES (p = 0,003), mas a frequência destas células não variou de acordo com a atividade da doença ou características clínicas específicas. Além disso, o fenótipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>CD127 manteve-se em proporções constantes dentre todos os grupos avaliados, independente da atividade da doença. Nossos resultados mostraram um aumento de células Treg em pacientes com LES, no entanto novos estudos são necessários para identificar os subtipos de células Treg relacionadas à progressão da doença.*

**Palavras-chave:** *doença autoimune; SLEDAI, linfócitos, células T reguladoras; FOXP3.*

**ABSTRACT** – *The aim of this study was to investigate Treg cells of SLE patients in relation to disease clinical features. Treg cells immunophenotyping was performed using CD4, CD25, FOXP3, CD127 markers in samples of 30 SLE patients (15 active/15 SLE remission) and 15 healthy volunteers. We showed a significant TCD4<sup>+</sup> cells reduction in SLE patients (p=0,006). The most significant reduction*



*was recorded in active disease group ( $p < 0.001$ ) compared to controls. On the other hand, there was a significant increase in frequency of  $CD4^+FOXP3^+$  Treg cells in all SLE patients ( $p = 0.003$ ), but the frequency of these cells did not vary according to the disease activity or specific clinical features. In addition,  $CD4^+CD25^+FOXP3^+CD127^-$  phenotype remained in constant proportions among all groups evaluated, regardless of disease activity. Our results showed a Treg cells increased in SLE patients, however further investigations are needed to identify Tregs cells subsets related to disease progression.*

*Keywords: autoimmune disease; SLEDAI; lymphocytes; regulatory T cells; FOXP3*

## 1. INTRODUÇÃO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é considerado o protótipo das doenças autoimunes sistêmicas. Além de ser uma doença cuja etiopatogenia permanece pouco esclarecida, ela se destaca por acometer múltiplos órgãos e sistemas, com manifestações clínicas imprevisíveis, fenótipo multifacetado e elevado potencial mórbido (Tsokos, 2011; Mohan; Putterman, 2015).

Sem tratamento específico, vários são os medicamentos aplicados na terapêutica do LES, tais como cloroquina, talidomida, antiinflamatórios não-esteróides e os corticosteroides; ou ainda, medicamentos utilizados no tratamento do câncer como a azatioprina e a ciclofosfamida (Carvalho *et al.*, 2014). No entanto, a exposição por longos períodos a estas drogas pode acarretar sérios problemas associados a efeitos colaterais, à ausência de resposta a droga e ao aumento do risco de morte (Tsuji-mura, 2012; Picchianti-Diamanti *et al.*, 2014).

Visando novas estratégias terapêuticas, diversas alterações relacionadas à resposta imune no LES vêm sendo investigadas. Em destaque neste cenário estão os estudos acerca das células T reguladoras (Treg) em um importante eixo do desenvolvimento da doença. As células Treg são fundamentais para a manutenção da auto tolerância e prevenção de doenças autoimunes como o LES (Chavele; Ehrenstein, 2011; Miyara, *et al.*, 2014).

Fortes desregulações na homeostase das células Treg tem sido descritas no desenvolvimento do LES, contudo grande parte dos estudos que investigam estas células no contexto da doença apresentam dados contraditórios. Portanto, o presente estudo visa investigar as células Treg ( $CD4^+FOXP3^+CD25^+CD127^-$ ) de pacientes com LES em relação às manifestações clínicas da doença.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### PACIENTES E VOLUNTÁRIOS SADIOS



Foram convidados a participar deste estudo 30 pacientes (28 mulheres e 2 homens) com média de idade de 35,33 ( $\pm 10,40$ ) anos. O grupo controle foi formado por 15 mulheres saudáveis, com idade média de 34,19 ( $\pm 11,16$ ). Todos os pacientes deste estudo foram recrutados do serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, Brasil e preencheram os critérios de classificação para o LES do *American College of Rheumatology*. O índice de atividade da doença - *SLE disease activity index 2000 (SLEDAI – 2K)* foi utilizado para mensurar a atividade do LES. Pacientes com SLEDAI  $\geq 6$  foram considerados em atividade (n=15), e, com SLEDAI  $< 6$  em remissão (n=15) (Gladman, 2000). Todos os pacientes e voluntários sadios que participaram deste estudo assinaram o TCLE aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pernambuco – Brazil (CEP/CCS/UFPE N° 145/09).

#### OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMCs)

O sangue periférico coletado em tubos de heparina (9 mL) foi diretamente submetido ao protocolo padrão (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare) para obtenção das PBMCs. As PBMCs, assim obtidas, foram lavadas e ressuspensas em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com L-Glutamina, 10% de Soro Bovino Fetal (Lonza), 10 mM de HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (Gibco) e 200 U/mL de Penicilina/Estreptomicina (Gibco). Uma alíquota destas células foi retirada para a contagem em câmara de Neubauer com a utilização do corante azul de Trypan (Sigma, St. Louis, MO) para análise de viabilidade.

#### DETERMINAÇÃO DOS FENÓTIPOS CELULARES DE CÉLULAS TREGs

As PBMCs foram dispostas na concentração de  $10^5$  células/tubo de citometria e foram subsequentemente lavadas com PBS (pH 7.2, TA). Em seguida, estas células foram ressuspensas em 100  $\mu$ L de PBS para a marcação com os anticorpos de superfície celular (anti-CD4, CD25 adquiridos da Ebioscience, e anti-CD127, da BD Biosciences). Para a marcação com os anticorpos intracelulares (anti-FOXP3-eBiosciences) as células foram permeabilizadas e processadas de acordo com o protocolo “*Human FoxP3 Buffer Set*” BD Pharmigen (San Diego, CA). As amostras foram avaliadas por citometria de fluxo (Attune® Cytometric) com a utilização dos softwares *Attune® Cytometric Software version 1.2.5* e *FlowJo 7.6.5 (r Tree Star Inc.)*. A população de linfócitos positiva para CD4 foi avaliada quanto à expressão dos marcadores FOXP3, CD25 e CD127. A delimitação das regiões positivas foi feita com base na população não marcada para o anticorpo de interesse e na definição da região negativa a partir do controle FMO (Fluorescence Minus One).

#### ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises de dados foram realizadas através de comparações univariadas por meio de testes não paramétricos (Mann-Whitney, Kruskal-Wallis ou Kolmogorov-Smirnov) no software Graphpad Prism.



Os resultados foram indicados considerando o valor da mediana, máximo e mínimo.  $P < 0.05$  foi considerado significativo para todos os testes.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As células nTreg foram investigadas em pacientes com LES e indivíduos saudáveis de acordo com a figura 1A. O LES geralmente cursa com distúrbios hematológicos tais como anemia, leucopenia, linfopenia e trombocitopenia (Berbert; Mantese, 2005; Buanec *et al.*, 2011; Turchetti *et al.*, 2012). No nosso estudo isto pode ser confirmado pelas reduzidas proporções de linfócitos TCD4 encontradas em pacientes com a doença em atividade ( $SLEDAI \geq 6$ ) ou remissão ( $SLEDAI \leq 6$ ) (21.10%, 3.76 - 49.20% e 33.9%, 5.12 - 45%, respectivamente) em relação ao grupo de indivíduos saudáveis (37.6%; 31.5 de 46.7%). Uma maior redução deste fenótipo foi observada nos pacientes com a doença em atividade ( $p < 0.001$ ) em relação ao grupo controle. Por outro lado, pacientes com a doença em atividade (3.73%, 1.31 to 7.01%) e remissão (3.54%, 1.39 - 6.97%) apresentaram as maiores taxas de células Treg  $CD4^+FOXP3^+$  em contraste ao grupo de indivíduos saudáveis (1.63%, 1.05 - 2.79%) ( $p = 0.003$ ). Contudo este fenótipo não variou de acordo com a atividade da doença ( $p > 0.05$ ) (Figura 1B). Pan e colaboradores (2012) também encontraram elevadas proporções destas células em pacientes com LES, no entanto, foi em um grupo de pacientes com  $SLEDAI > 5$ . Enquanto que outros estudos mostram que não há variações significativas destas células de acordo com a doença (Vargas-Rojas *et al.*, 2008; Miyara *et al.*, 2011; Alvarado-Sánchez *et al.*, 2006).

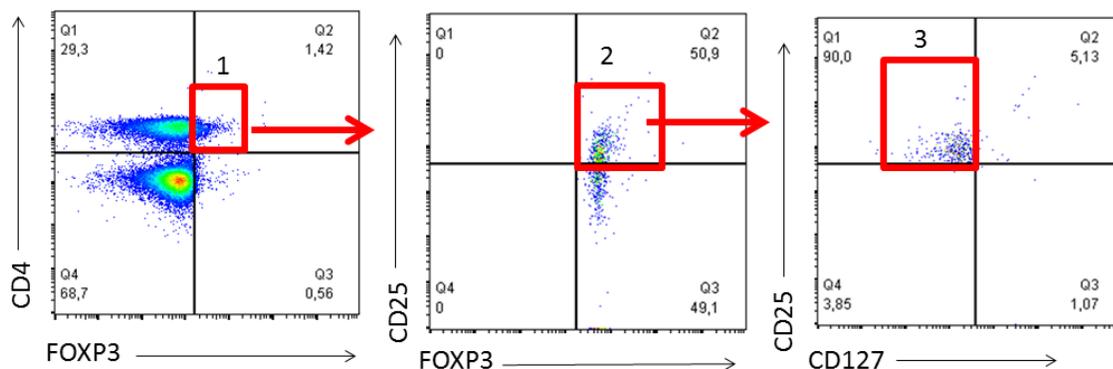
Para uma análise mais específica do perfil T regulador, também foram avaliadas a expressão de CD25 e CD127 nas células Treg  $CD4^+FOXP3^+$ ; uma vez que de acordo com estudos prévios a elevada expressão de CD25 e baixa expressão de CD127 correspondem a expressão de FOXP3 que caracteriza o fenótipo Treg (LIU *et al.*, 2006; SEDDIKI *et al.*, 2006). Contudo as proporções das células  $CD4^+FOXP3^+CD25^+CD127^-$  não sofreram variações significativas entre os grupos de pacientes com a doença em atividade (36.38%, 4.70 - 61.80%), remissão (28.12%, 3.12 - 63.83%) e indivíduos saudáveis (38.80%, 19.72 - 68.07%) ( $p > 0.05$ ). Da mesma forma, não houve diferença significativa entre o grupo com todos os pacientes (32%; 31.23-63,83%) em relação aos indivíduos saudáveis ( $p > 0,05$ ) (Figura 1C). As populações de células Treg estudadas também não variaram de maneira significativa em relação ao acometimento de nefrite, redução de proteínas do complemento, formação de auto anticorpos, ou demais características clínicas da doença ( $p > 0,05$ ).

O estudo das células Treg tem emergido como um importante eixo de pesquisa na busca de alternativas terapêuticas para doenças autoimunes. De acordo com Miyara e colaboradores (2009), o estudo das subpopulações de células Tregs é fundamental para se avaliar o estado imunológico do paciente; tendo em vista que prováveis manipulações de uma subpopulação, em particular, poderiam tanto promover quanto atenuar uma variedade de respostas imunes, de natureza fisiológica ou patológica.

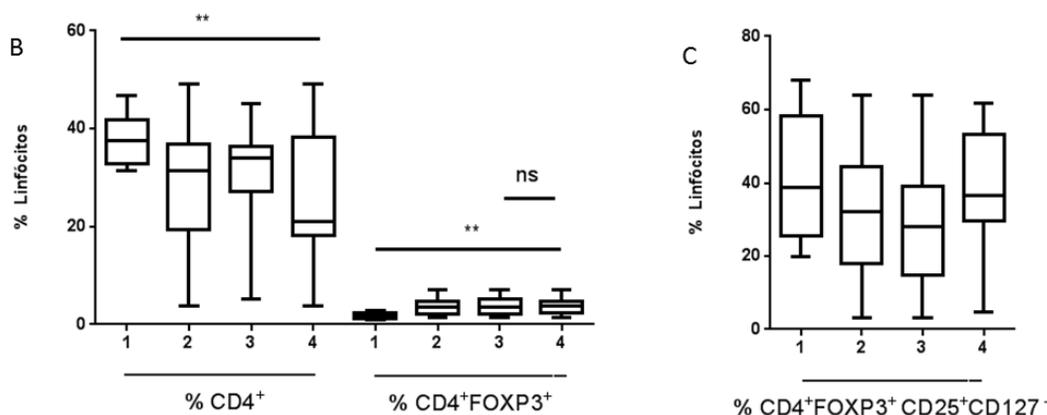
Uma vez que o percentual das subpopulações de células Tregs e suas respectivas funções podem variar não apenas de acordo com o grau de atividade da doença e diferentes intervenções terapêuticas adotadas (Sakaguchi *et al.*, 2010; Tselios *et al.*, 2014; Ohl; Tenbrock, 2015); nós

suspeitamos que estas divergências encontradas no LES podem resultar dos diferentes parâmetros clínicos que constituem a pontuação do SLEDAI de cada amostra investigada.

A



1. Indivíduos saudáveis
2. Todos os pacientes
3. Pacientes em remissão
4. Pacientes em atividade



**Figura 1:** Células Treg de ocorrência natural (nTreg) de pacientes com LES e indivíduos saudáveis. (A) Estratégia de análise para a caracterização do fenótipo  $CD4^+FOXP3^+CD25^+CD127^-$ : Células  $CD4^+FOXP3^+$  (1), Células  $CD4^+FOXP3^+CD25^+$  (2) e Células  $CD4^+FOXP3^+CD25^+CD127^-$  no grupo  $CD4^+FOXP3^+$  (3); (B) Linfócitos TCD4<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>; (C) nTregs CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>. \*\* $p \leq 0,002$ .



#### 4. CONCLUSÃO

Embora tenha sido identificada a elevação do fenótipo de células Treg CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> de pacientes com LES, não foi possível constatar que esta elevação está associada as manifestações clínicas da doença. Além disso, nossos dados sugerem que esta elevação do fenótipo CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> não esta relacionada ao fenótipo CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> de células T reguladoras naturais com função efetora. Portanto, novos estudos são necessários para identificar os subtipos de células Treg relacionadas a progressão da doença.

#### 5. REFERÊNCIAS

- ALVARADO-SÁNCHEZ B.; HERNÁNDEZ-CASTRO B.; PORTALES-PÉREZ D.; BARANDA L.; LAYSECA-ESPINOSA E.; ABUD-MENDOZA C.; et al. Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun.*, v. 27 n. 2. P. 110-8, 2006.
- BERBERT ALCV, MANTESE SAO. Cutaneous lupus erythematosus – Clinical and laboratory aspects. *An Bras Dermatol.*, v. 80, n. 2, p.119-3, 2005.
- BONELLI M, SAVITSKAYA A, VON DALWIGK K, STEINER CW, ALETAHA D, SMOLEN JS, et al. Quantitative and qualitative deficiencies of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Int Immunol.*, v. 20, n. 7, p.861-8, 2008.
- CARVALHO, MAP. et al. *Reumatologia - Diagnóstico e Tratamento*, 4ª ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2014.
- CHAVELE KM, EHRENSTEIN MR. Regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *FEBS Lett.*; v. 585, n. 23, p.3603-10, 2011.
- GLADMAN DD, IBAÑEZ D, UROWITZ MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol.*, v. 29, n. 2, p.288-91, 2002.
- HOCHBERG MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, v. 40, n. 9, p. 1725, 1997.
- LE BUANEC H, GOUGEON ML, MATHIAN A, LEBON P, DUPONT JM, PELTRE G, et al. IFN- $\alpha$  and CD46 stimulation are associated with active lupus and skew natural T regulatory cell differentiation to type 1 regulatory T (Tr1) cells. *Proc Natl Acad Sci.*, v. 108, n. 47, p.18995-9000, 2011.
- LEE HY, HONG YK, YUN HJ, KIM YM, KIM JR, YOO WH. Altered frequency and migration capacity of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*, v. 47, n. 6, p.789-94, 2008.
- LIU W, PUTNAM AL, XU-YU Z, SZOT GL, LEE MR, ZHU S, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4<sup>+</sup> T reg cells. *J Exp Med.*,v. 203, n. 7, p.1701-11, 2006.
- MIYARA M, GOROCHOV G, EHRENSTEIN M, MUSSET L, SAKAGUCHI S, AMOURA Z. Human FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* v. 10, n. 12, p.744-55, 2011.
- MIYARA M, ITO Y, SAKAGUCHI S. TREG-cell therapies for autoimmune rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.*, v. 10, n. 9, p. 543-51, 2014.



- MOHAN C, PUTTERMAN C. Genetics and pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Nat Rev Nephrol.*, v.11, n. 6, p. 329-41, 2015.
- PAN X, YUAN X, ZHENG Y, WANG W, SHAN J, LIN F, et al. Increased CD45RA+ FoxP3(low) regulatory T cells with impaired suppressive function in patients with systemic lupus erythematosus. *PLoS One.* v.7, n. 4, p.e34662, 2012.
- PICCHIANTI-DIAMANTI A, ROSADO MM, SCARSELLA M, LAGANÀ B, D'AMELIO R. P-glycoprotein and drug resistance in systemic autoimmune diseases. *Int J Mol Sci.* v. 15, n. 3, p. 4965-76, 2014.
- SEDDIKI N, SANTNER-NANAN B, MARTINSON J, ZAUNDERS J, SASSON S, LANDAY A et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med.*, v. 203, n. 7, p. 1693-700, 2006.
- TSOKOS GC. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* v. 365, n. 22, p. 2110-21, 2011.
- TSUJIMURA, S.; TANAKA, Y. Treatment strategy based on targeting P-glycoprotein on peripheral lymphocytes in patients with systemic autoimmune disease. *Clin Exp Nephrol.*, v. 6, n. 1, p. 102-08, 2012.
- TURCHETTI G, YAZDANY J, PALLA I, YELIN E, MOSCA M. Systemic lupus erythematosus and the economic perspective: a systematic literature review. *Clin Exp Rheumatol.*, v. 30, n. 4073, p. S116-22, 2012.
- VARGAS-ROJAS MI, CRISPÍN JC, RICHAUD-PATIN Y, ALCOCER-VARELA J. Quantitative and qualitative normal regulatory T cells are not capable of inducing suppression in SLE patients due to T-cell resistance. *Lupus.*, v. 17, n. 4, p. 289-94, 2008.
- YAN B, YE S, CHEN G, KUANG M, SHEN N, CHEN S. Dysfunctional CD4+,CD25+ regulatory T cells in untreated active systemic lupus erythematosus secondary to interferon-alpha-producing antigen-presenting cells. *Arthritis Rheum*, v. 58, n. 3, p. 801, 2008.
- ZHANG B, ZHANG X, TANG FL, ZHU LP, LIU Y, LIPSKY PE. Clinical significance of increased CD4+CD25-Foxp3+ T cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*, v. 67, n. 7, p. 1037-40, 2008.

## 6. AGRADECIMENTOS

INCT-if, CAPES.



ÁREA DE SUBMISSÃO: PESQUISA CLÍNICA E PRÉ-CLÍNICA – PC 14

## AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR E DA INDUÇÃO DE APOPTOSE DO DERIVADO TIAZACRIDÍNICO LPSF/AA29 EM CÉLULAS DE LEUCEMIA E LINFOMA

V. C. M. COSTA<sup>1</sup>; M. B. O. CHAGAS<sup>1</sup>; N. C. C. CORDEIRO<sup>2</sup>; K. M. R. MARQUES<sup>3</sup>; M. C. A. LIMA<sup>4</sup>; M. G. R. PITTA<sup>1</sup>; I. R. PITTA<sup>2</sup>; M. J. B. M. REGO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT)

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF)

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de antibióticos, Laboratório de Química e Inovação Terapêutica (LQIT)

E-mail para contato: valeciadecassia@hotmail.com

**RESUMO** – *O câncer é caracterizado por apresentar o crescimento descontrolado de células. Dentre os principais tipos encontram-se as leucemias e linfomas. Os tratamentos mais utilizados atualmente são: radioterapia, quimioterapia, cirurgia e transplante de medula óssea. Derivados acridínicos são caracterizados por apresentar a capacidade de se intercalar com pares de base de DNA possuindo atividade anticâncer. Foi utilizado o derivado acridínico tiazacridina LPSF/AA29 com o objetivo de avaliar ciclo celular e a indução de morte por apoptose. Utilizou-se o kit Apo-BrdU para os ensaios de apoptose e para análise de ciclo celular realizou-se a marcação com iodeto de propídeo (PI). A tiazacridina testada apresentou resultados significativos nos ensaios de ciclo celular obtendo uma porcentagem significativa de células nas fases sub/G1 e G2/M para as linhagens de leucemia e linfoma. Quando se refere a apoptose observou-se uma maior porcentagem de células em morte celular programada tratadas com o LPSF/AA29 sendo 28,27% para a linhagem jurkat e 33,21% em Raji. Dessa maneira a tiazacridina utilizada apresentou atividade anticâncer para as linhagens testadas podendo ser um novo agente anticâncer.*

*Palavras chave: câncer; acridina; morte celular*

**ABSTRACT** - *Cancer is characterized by uncontrolled cell growth. Among the main types of cancer are leukemia and lymphomas. The treatments currently used include chemotherapy, radiation, surgery, and bone marrow transplant. Acridine derivatives are*

*characterized by the ability to intercalate between DNA base pairs and their anticancer activity. Tiazacridine derivative LPSF/AA29 was used to assess its influence on cell cycle progression and cell death induction by apoptosis. Apo-BrdU kit was used for apoptosis assays and cell cycle analysis was performed using propidium iodide (PI) staining. The tiazacridine molecule tested showed significant results in cell cycle assays, with a significant percentage of cells in Sub-G1 and G2/M phases for leukemia and lymphoma cell lines. In apoptosis assays, it was observed an increased in the percentage of cells in programmed cell death after treatment with LPSF/AA29 (28,27% for Jurkat cell line and 33,21% for Raji cell line). Thus, the tiazacridine derivative used showed anticancer activity for cell lines tested, and may be a novel anticancer agent.*

*Keywords: cancer; acridine; cell death*

## 1. INTRODUÇÃO

Câncer, neoplasia, tumor maligno, são termos utilizados para designar um conjunto de mais de 100 doenças caracterizadas pelo crescimento descontrolado e desordenado de células. As causas que estão relacionadas ao câncer são diversas, dentre elas, alterações genéticas, exposição aos fatores de riscos ambientais (poluição e radiação), adoção de um estilo de vida sedentário, consumo de alimentos processados e uso de álcool, tabaco e outras drogas. Entre os principais tipos de câncer destacam-se as leucemias, caracterizadas pelo acúmulo de células anormais na medula óssea e os linfomas, originados nos linfonodos (INCA, 2016).

O Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima que para os anos de 2016 e 2017 ocorram aproximadamente 15 mil novos casos de leucemias e linfomas. Atualmente, são exploradas muitas formas de tratamento do câncer, dentre elas, cirurgias, radioterapia, imunoterapia, transplantes e, principalmente, a quimioterapia. Este último método é utilizado por cerca de 60-70 % dos pacientes, porém, os fármacos disponíveis atuam tanto em células neoplásicas como em células normais levando a um grande número de efeitos colaterais. Dessa forma, o estudo voltado para o desenvolvimento e aplicação de novos agentes anticâncer tem sido cada vez mais necessário.

As acridinas e seus análogos estruturais são moléculas que possuem propriedade intercalante com os pares de bases do DNA constituindo, assim, eficazes e promissores agentes anticâncer. (Deweese *et al.*, 2008; Pitta, 2012). As tiazolidinas ou glitazonas pertencem a uma classe de moléculas que aumentam a sensibilidade à insulina e foram utilizadas no tratamento da diabetes. Ademais, a exposição de células tumorais à troglitazona e ciglitazona conduziu à inibição da proliferação celular (Nesto *et al.*, 2003; Davis, 2006).

Nesse contexto, utilizou-se como uma nova estratégia terapêutica o composto LPSF/AA29, uma molécula bioativa resultante da hibridização dos núcleos acridina/tiazolidina, com o objetivo de avaliar a sua atuação no ciclo celular e seu potencial de indução de apoptose em células de leucemia e linfoma.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS



## 2.1 Obtenção e manutenção de células tumorais

As linhagens celulares de leucemia aguda de células T (Jurkat) e linfoma Burkitt (Raji) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e foram mantidas em meio RPMI-1640 (Gibco), suplementado com soro fetal bovino 10 % (Gibco), Hespes 10 mM (Gibco), 200 U/ml de estreptomicina e de penicilina (Gibco) a 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub>.

## 2.2 Ciclo celular

As células foram cultivadas, em placa de seis poços, na concentração de  $5 \times 10^5$  por poço e tratadas com LPSFAA/29 e amsacrina (controle positivo), em doses (IC<sub>50</sub>) obtidas previamente durante o estudo de citotoxicidade (Chagas, 2016). As doses de LPSF/AA29 utilizadas em Jurkat e Raji foram 34,2 e 4,15 µM, respectivamente. Quando tratadas com amsacrina foram utilizadas as doses de 0,25 µM em Jurkat e 1,1 µM para Raji. Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo. Após 24 horas, as células foram lavadas com PBS1X e fixadas no etanol 70%, *overnight*, a -20 °C. Em seguida, as células foram novamente lavadas com PBS 1X e incubadas com iodeto de propídeo (PI) (5ug/mL)/RNase A (100ug/mL) durante 30 minutos sobre o gelo. (SOLHAUG *et al.*, 2013). O conteúdo de DNA celular foi quantificado através de citometria de fluxo utilizando o citômetro de fluxo Accuri C6, onde a porcentagem de DNA em cada fase do ciclo foi obtida pelo programa C6 software (Becton, Dickinson and Company, USA).

## 2.3 Indução de morte por apoptose

As células foram cultivadas e tratadas nas mesmas condições do item 2.2. Em seguida, as placas foram incubadas por um período de 48 horas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> e, posteriormente, marcadas com bromodesoxiuridina trifosfato (Br-dUTP) e reincubadas por uma hora a 37 °C. Após esse período foi adicionado anticorpo monoclonal de detecção FITC-anti Br-dU, PI e RNase A. A porcentagem de células conjugadas com o anticorpo foi analisada através de citometria de fluxo utilizando o citômetro de fluxo Accuri C6 (Becton, Dickinson and Company, USA), sendo os dados obtidos analisados pelo programa C6 software (Becton, Dickinson and Company, USA).

## 2.4 Análise estatística dos resultados

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e em três experimentos independentes. A significância estatística foi obtida aplicando-se o Teste T de Student através do programa GraphPad Prism (Versão 5.0, GraphPad software, USA), em relação ao controle positivo ou não tratado. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

# 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1 Atuação do LPSF/AA29 no ciclo celular de células de leucemia e linfoma.

Em relação aos efeitos do LPSF/AA29 sobre o ciclo celular nas linhagens de leucemia e linfoma foi observado o aumento, significativo, da porcentagem de células, na fase sub-G1 para o composto testado em Jurkat ( $p=0.0006$ ) e Raji ( $p = 0.0012$ ), e amsacrina em Jurkat ( $p=0.0105$ ) e Raji ( $p=0.0001$ ), população hipodiplóide (tabela 01 e 02). A presença desta população nesta fase é considerada um indicador de morte celular (Queiroz *et al.*, 2013). Além disso, foi observado um arrasto celular, significativo, na fase G2/M após o tratamento com LPSF/AA29 ( $p = 0.0015$ ) e ( $p = 0.0078$ ) Jurkat e Raji respectivamente, quando comparado ao controle não tratado (NT). Este resultado pode ser considerado como um atraso no ciclo celular de modo que a reorganização de vários processos pode ocorrer nesta fase, incluindo a regulação da segregação dos cromossomos e a tentativa de reparar danos ao DNA (Foster, 2008). Estudos moleculares têm revelado que compostos sintéticos e naturais são capazes de induzir o arrasto na fase G2/M do ciclo celular e promover a morte celular por apoptose, demonstrando que a parada do ciclo nesta fase também está associada com mecanismos de morte celular (Lee et al., 2010; Liu et al., 2013). A desorganização do ciclo celular está relacionada com o desenvolvimento de doenças como o câncer, sendo de grande importância seu estudo e compreensão (Malumbres, 2009).

	JURKAT		
	NT	LPSF/AA29	AMSACRINA
SubG1	1,95±0,35	38,70±1,27	66,43±9,43
G0/G1	44,30±3,39	11,50±0,98	10,30±0,14
S	37,65±2,05	5,80±0,56	9,40±1,41
G2/M	15,65±0,63	46,70±1,55	17,50±6,64

Tabela 01 - Efeitos do LPSF/AA29 e da amsacrina sobre o ciclo celular, linhagem Jurkat - leucemia aguda de células T.

	RAJI		
	NT	LPSF/AA29	AMSACRINA
Sub/G1	0,56±0,51	40,30±8,40	69,87±7,35
G0/G1	46,93±4,59	14,60±3,10	14,73±0,96
S	39,26±5,40	8,80±2,08	11,50±1,85
G2/M	16,23±6,10	47,86±9,24	10,63±3,41

Tabela 02 - Efeitos do LPSF/AA29 e da amsacrina sobre o ciclo celular, linhagem Raji - linfoma de Burkitt.

### 3.2 Efeito do LPSF/AA29 na indução de morte por apoptose

Observou-se que o composto LPSF/AA29 induziu, significativamente, a morte por apoptose das células de leucemia e linfoma, quando comparado a amsacrina e ao controle negativo (tabela 03). A análise estatística revelou que o tratamento com LPSF/AA29 induziu de forma significativa a morte por apoptose em Jurkat com valores de  $p=0.0376$  e  $p=0.0268$ , em comparação com as células não tratadas e tratadas com amsacrina, respectivamente. Para a linhagem Raji, a análise estatística revelou que o tratamento com LPSF/AA29 induziu de forma significativa a morte por apoptose também, com valores de  $p=0.0025$  e  $p=0.0322$ , em comparação com as células não tratadas e tratadas com amsacrina, respectivamente.

A resistência à morte celular é uma das principais características do câncer através da evasão apoptótica, uma habilidade biológica adquirida durante as várias etapas do desenvolvimento de tumores humanos (Hanahan e Weinberg, 2011). A identificação de potenciais agentes que induzam a morte celular, em particular a apoptose, tem despertado o interesse da comunidade científica mundial (De et al., 2010; Okumura, 2010; Jin et al., 2012).

LINHAGENS	% CÉLULAS EM APOPTOSE		
	NT	LPSF/AA29	AMSACRINA
JURKAT	0,85±0,35	28,27±6,47	5,07±1,02
RAJI	0,55±0,13	33,21±8,35	9,12±2,36

Tabela 03 - Avaliação do potencial de indução por apoptose em Jurkat (leucemia aguda de células T) e Raji (linfoma de Burkitt) - após o tratamento com LPSF/AA29, amsacrina (controle positivo) e NT (controle negativo).

## 4. CONCLUSÃO

O derivado tiazacridínico LPSF/AA29 demonstrou-se como um potencial agente de indução de morte celular por apoptose e inibidor da progressão do ciclo celular nas fases sub/G1 e G2/M, dessa forma apresentando-se como um promissor agente antineoplásico para as linhagens de leucemia e linfoma testadas.

## 5. REFERÊNCIAS

AMARAVADI, R. K., & THOMPSON, C. B. (2007). The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(24), 7271–9. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1595.



CHAGAS, MBO. *Avaliação da atividade anticâncer e mecanismo de ação de novos agentes acridínicos*. 2016. 154 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 18 de janeiro de 2016.

DAVIS, S.N. Insulin, oral hypoglycemic agents, and the pharmacology of the endocrine pancreas. In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, editors. *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York: McGraw- Hill; 2006. p. 1613–45.

DE, P., BALTAS, M., LAMORAL-THEYS, D., BRUYÈRE, C., KISS, R., BEDOS-BELVAL, F., & SAFFON, N. (2010). Synthesis and anticancer activity evaluation of 2(4-alkoxyphenyl)cyclopropyl hydrazides and triazolo phthalazines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(7), 2537–48. doi:10.1016/j.bmc.2010.02.041.

DENNY WA. Acridine derivatives as chemotherapeutic agents. *Curr Med Chem* 2002;9(18):1655-1665.

DEWEESE, J.E., *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, 37(1), 2-10 (2008).

Foster, I. (2008). Cancer: A cell cycle defect. *Radiography*, 14(2), 144–149. doi:10.1016/j.radi.2006.12.001.

HANAHAN, D., & WEINBERG, R. a. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, Brasil (2016). Disponível: [www2.inca.gov.br](http://www2.inca.gov.br) em 25/10/2016.

JIN, F., ZHANG, N., TAN, C., GAO, D., ZHANG, C., LIU, F., ... JIANG, Y. (2012). 2'-chloro-4'-aminoflavone derivatives selectively targeting hepatocarcinoma cells: convenient synthetic process, G(2)/M cell cycle arrest and apoptosis triggers. *Archiv Der Pharmazie*, 345(7), 525–34. doi:10.1002/ardp.201100383.

LEE, Y.B.; GONG, Y.; YOON, H.; AHN, C.; JEON, M.; KONG, J. (2010). Synthesis and anticancer activity of new 1-[(5 or 6-substituted 2-alkoxyquinoxalin-3-yl)aminocarbonyl]-4-(hetero)arylpiperazine derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(22), 7966-7974. doi: 10.1016/j.bmc.2010.09.028

LIU, Y.; WANG, W.; FANG, B.; MA, F.; ZHENG, Q. ... (2013). Anti-tumor effect of germacrone on human hepatoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest and promoting apoptosis. *European Journal of Pharmacology*, 698(1-3), 95-102. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.10.013.

MALUMBRES, M., & BARBACID, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews. Cancer*, 9(3), 153–66. doi:10.1038/nrc2602.



NESTO RW, BELL D, BONOW RO, FONSECA V, et al. Thiazolidinedione use, fluid retention, and congestive heart failure: a consensus statement from the American Heart Association and American Diabetes Association. *Circulation*. 2003;108:2941-2948.

OKUMURA, T. (2010). Mechanisms by which thiazolidinediones induce anti-cancer effects in cancers in digestive organs. *Journal of Gastroenterology*, 45(11), 1097–102. doi:10.1007/s00535-010-0310-9.

PITTA, MARINA GALDINO DA ROCHA; LIMA, MARIA DO CARMO ALVES DE ORIENTADORA; ANDRADE, CÉSAR AUGUSTO SOUZA DE Coorientador. *Novos agentes tiazacridínicos com propriedades anticâncer*. 2012. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco.

QUEIROZ, M.J.R.P., PEIXOTO, D. CALHELA, R.C., SOARES, P., SANTOS, T., LIMA, R.T., CAMPOS, J.F., ABREU, R.M.V., FERREIRA, I.C.F.R., VASCONCELOS, M.H. (2013). New di(hetero)arylethers and di(hetero)arylamines in the thieno [3,2-b]pyridine series: Synthesis, growth inhibitory activity on human tumor cell lines and non-tumor cells, effects on cell cycle and on programmed cell death. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 69, 855-862. doi: dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.09.023.

SOLHAUG, A, HOLME, J. A, HAGLUND, K., DENDELE, B., SERGENT, O., PESTKA, J., ... ERIKSEN, G. S. (2013). Alternariol induces abnormal nuclear morphology and cell cycle arrest in murine RAW 264.7 macrophages. *Toxicology Letters*, 219(1), 8–17. doi:10.1016/j.toxlet.2013.02.012.

## 6. AGRADECIMENTOS

INCT\_if. FACEPE, UFPE



ÁREA DE SUBMISSÃO: PESQUISA CLÍNICA E PRÉ-CLÍNICA – PC 15

## AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DE CÉLULAS DENDRÍTICAS ESTIMULADAS COM PEPTÍDEOS RECOMBINANTES DE *LEISHMANIA VIANNIA BRAZILISIENSES*

AILTON ALVARO DA SILVA<sup>1,\*</sup>; RAFAEL DE FREITAS E SILVA<sup>1,2</sup>; BEATRIZ COUTINHO DE OLIVEIRA<sup>1</sup>, MARIA CAROLINA ACCIOLY BRELAZ DE CASTRO<sup>1,3</sup>, LUIZ FELIPE GOMES REBELLO FERREIRA<sup>4</sup>, MARCELO ZALDINI HERNANDES<sup>4</sup>, OSVALDO POMPÍLIO DE MELO NETO<sup>1</sup>; ANTÔNIO MAURO REZENDE<sup>1</sup>; VALÉRIA RÊGO ALVES PEREIRA<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE, 50.740-465, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade de Pernambuco *campus* Garanhuns, 55294-902, Garanhuns, PE.

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pernambuco – Centro Acadêmico de Vitória (CAV), Vitória de Santo Antão

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pernambuco *campus* Recife, Dept. de Ciências Farmacêuticas  
E-mail para contato: ailtonsilvao@hotmail.com

**RESUMO** – *As leishmanioses são um grupo de doenças negligenciadas, causadas por protozoários do gênero Leishmania, transmitidos pela picada de flebotomíneos infectados. O tratamento utiliza drogas que apresentam algumas limitações, com relatos de resistência ao tratamento. A vacinação vem como proposta promissora para o controle da doença, devendo promover uma correta ativação e geração de memória imunológica, necessitando a apresentação de um antígeno ideal por células dendríticas (DCs). Desta forma, o objetivo desse trabalho foi analisar, in vitro, a imunogenicidade de DCs murinas estimuladas com peptídeos derivados de proteínas de Leishmania (Viannia) braziliensis. Para produção de DCs, foram isoladas células de medula óssea (MO) de camundongos BALB/c. As células da MO foram depositadas em placa de cultivo e estimuladas na presença do fator GM-CSF por 10 dias. Após esse período as células foram estimuladas com os peptídeos por 24h e 48h. Após o período, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais: anti-CD11c, anti-CD40, anti-MHC I, anti-MHC II, conjugados à fluorocromos para análise por citometria de fluxo. Os resultados preliminares das análises demonstraram expressão de todos os marcadores após 24h e 48h, e é observada uma forte redução na expressão do CD11c, quando comparado ao grupo controle não estimulado. Pode-se concluir que, estes resultados são promissores para futuros estudos de desenvolvimento de uma vacina eficaz no controle das leishmanioses.*

*Palavras-chave: Vacina; Leishmaniose; Epítomos peptídicos.*



**ABSTRACT** – *Leishmaniasis is a group of neglected diseases caused by protozoans from the genus Leishmania, transmitted by the bite of infected sand flies. The treatment is by the use of drugs that have some limitations such as resistance. Vaccination is the best option for disease control and should promote proper activation and generation of immune memory, requiring the presentation of an ideal antigen by dendritic cells (DCs). Thus, the aim of this study was to analyze, in vitro, the immunogenicity of murine DCs stimulated with peptides derived from Leishmania (Viannia) braziliensis proteins. For production of DCs, bone marrow (MO) cells were isolated from BALB / c mice. MO cells were deposited at culture plates and induced in the presence of GM-CSF for 10 days. After this period, the cells were stimulated with peptides for 24h and 48h. Cells were transferred and labeled with monoclonal antibodies: anti-CD11c, anti-CD40, anti-MHC I, anti-MHC II conjugated to a fluorochrome for analysis by flow cytometry. Preliminary results of the analysis showed expression of all markers after 24h and 48h, and it is observed a reduction in the expression of CD11c when compared to unstimulated control group. It can be concluded that these results are promising for further studies to develop a vaccine for the control of leishmaniasis.*

*Keywords: Vaccine; leishmaniasis; Peptide epitopes.*

## 1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses representam um grupo de doenças tropicais negligenciadas (DTNs) presentes em cerca de 98 países, e de acordo com dados estimados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), há 2 milhões de novos casos de pessoas infectadas por ano. Os agentes etiológicos responsáveis por essas doenças são protozoários do gênero *Leishmania*, ocorrendo a transmissão no momento em que fêmeas de flebótomos infectadas realizam repasto sanguíneo, injetando os protozoários no mamífero, como descrito em Murray *et al.* (2005) e segundo dados da WHO (2010). A leishmaniose pode apresentar as manifestações clínicas tegumentar, mucocutânea, e a visceral, de acordo com Carvalho *et al.* (2012).

O tratamento é com drogas de primeira escolha, como antimoniais, porém são limitados por serem caros, altamente tóxicos e requerem repetidas doses para atingir a concentração ideal de tratamento, como tem sido mostrado em Sundar e Chakravarty (2010). Meheus *et al.* (2010) e Oliveira *et al.* (2011) demonstram que outro fator limitante é a resistência ao tratamento pelo parasita. Neste contexto, a vacinação se mostra uma opção de controle viável, uma vez que ela deve ativar corretamente o sistema imunológico e induzir uma resposta imunológica e memória imune adequadas. As células dendríticas (DCs) são as principais apresentadoras de antígenos e sua ativação é espécie específica, como relatado em Ghosh e Bandyopadhyay (2004). Foi visto em Vargas-Inchaustegui *et al.* (2008), que a infecção por *L.V. braziliensis* está relacionada com a ativação das DCs e consequente ativação de linfócitos T efetores e a indução de uma resposta imune protetora. Ademais, frações antigênicas derivadas de outras espécies de leishmania são capazes de induzir a ativação de DCs, estimulando a expressão de moléculas de MHC de classe II e moléculas co-estimulatórias, bem observado em Masic *et al.* (2012).



Neste sentido, este trabalho avaliou a expressão de marcadores de superfície e as citocinas secretadas por DCs murinas estimuladas, *in vitro*, com peptídeos derivados de *L.V. braziliensis*.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

**Aspectos éticos** – Os camundongos BALB/c utilizados para realização do trabalho foram criados e alimentados no biotério do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM-FIOCRUZ), Recife, Brasil. O protocolo utilizados neste trabalho foi previamente aprovado pelo comitê de ética no uso de animais do CPqAM-FIOCRUZ (Protocolo 47/2013).

**Obtenção de células de medula óssea (MO)** - Em cada experimento, foram utilizados cinco camundongos *Mus musculus* BALB/c machos, com 6 a 8 semanas de idade. Inicialmente, foi realizada a eutanásia dos animais em câmara de CO<sub>2</sub> em condições assépticas, em seguida foram extraídos o fêmur e tíbia de cada animal e depositados em tubo cônico com meio RPMI 1640. Em seguida, foi feita higienização dos ossos em álcool 70%, e então as epífises dos ossos foram removidas, realizando lavagem no canal medular com seringas de insulina com agulha 30G preenchidas com meio RPMI 1640, extraindo as células de medula. As células foram contadas em câmara de Neubauer e sua concentração foi ajustada para 2x10<sup>6</sup> células/mL.

**Diferenciação de células dendríticas murinas (BMDCs)** – O protocolo de indução de células dendríticas (DCs) foi uma modificação de Lutz *et al.* (1999). As células de MO foram distribuídas em placas de cultura de 6 poços, na concentração final de 2x10<sup>6</sup> células/poço, em volume final de 10ml de meio RPMI 1640, suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SFB) e 20 µg/mL de Fator de Estimulação de Macrófagos e Granulócitos (GM-CSF), as células então foram incubadas por 10 dias em estufa a 37°C/5%CO<sub>2</sub>. No dia três, seis e oito de cultura, foi realizada a renovação do meio de cultura.

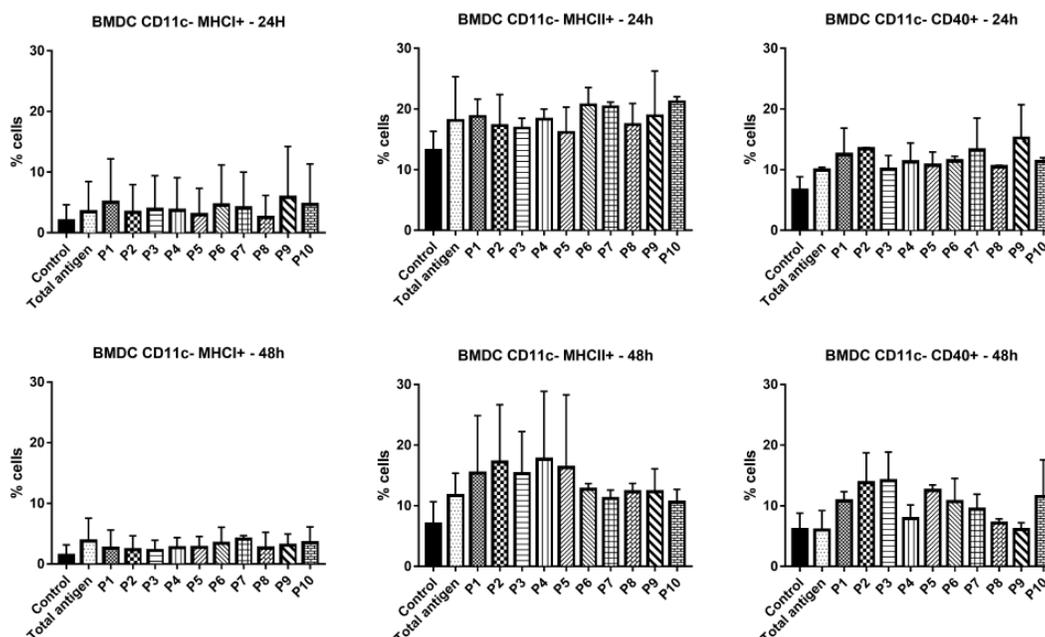
**Estímulo de células dendríticas murinas com peptídeos derivados de proteínas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*** - Após o período de diferenciação, as DCs foram depositadas em placas de 96 poços na concentração de 2x10<sup>5</sup> cel/poço e incubadas, individualmente, com cada um dos 10 peptídeos na concentração de 20 µg/ml por 24 e 48 horas. No intervalo de cada período, o sobrenadante de cultura foi coletado e armazenado a -80°C para dosagem das citocinas, as células foram distribuídas em tubos para citometria, e marcadas com anticorpos monoclonais: anti-CD11c-FITC, anti-CD40-APC, anti-MHCI-PE, anti-MHCII-APC, conjugados à fluorocromos para análise por citometria de fluxo. As análises foram feitas em citômetro de fluxo FACScalibur.

**Dosagem de citocinas de sobrenadante de cultura de células dendríticas murinas** – Os sobrenadantes de BMDCs foram descongelados e mediu-se quanto para quantificação das citocinas IFN-γ, IL-2, IL-10, IL-4, TNF, IL-6, IL-17a utilizando o kit de CBA Th1, Th2, Th17 de camundongo (Cytometry Bead Array kit, BD Bioscience). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a recomendação do fabricante. Posteriormente, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo num citômetro de fluxo FACScalibur. Para cada amostra, foram adquiridos 2.100 eventos conforme recomendado pelo fabricante. A curva padrão para o ensaio CBA foi determinada utilizando 9 diluições e os dados foram analisados com o software FCAP Array fornecido por BD Bioscience.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes ao estímulo com os peptídeos indicam que todos os peptídeos promoveram expressão dos marcadores utilizados nos dois tempos observados, conforme mostram as Figura 1 e 2. Cerca de 60% - 80% das células CD11c<sup>+</sup> expressaram os marcadores investigados. Contudo, observou-se uma redução nos níveis de expressão de MHC I, MHC II e CD40 nas BMDC CD11c<sup>+</sup> estimuladas com os peptídeos por 24h e 48h. De modo geral, para a população de BMDC CD11c<sup>-</sup> foram observados nas amostras basais e nas estimuladas com os peptídeos para ambos os tempos de cultivo analisados. Contudo, os níveis de MHC II e CD40 para as células estimuladas com grande parte dos peptídeos foi maior que o valor basal para ambos os períodos avaliados.

Figura 1 – Percentual médio de células dendríticas CD11c<sup>-</sup>, após estímulo *in vitro* com peptídeos derivados de proteínas de *L. V. braziliensis*, expressando os marcadores MHC I, MHC II e CD40.



A

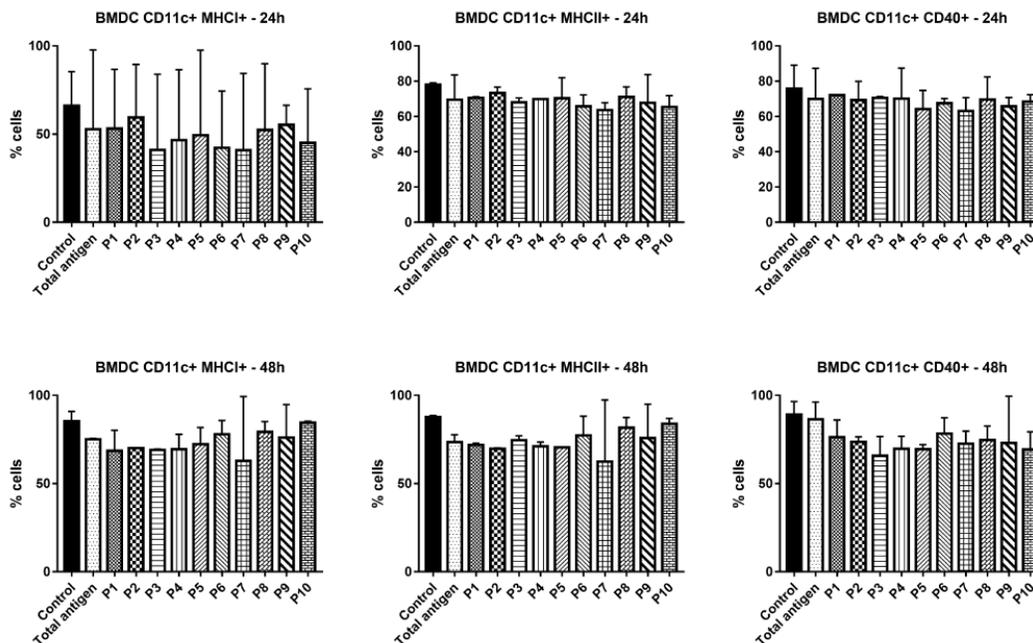


Figura 2 – Percentual médio de células dendríticas CD11c+, após estímulo in vitro com peptídeos derivados de proteínas de *L. V. braziliensis*, expressando os marcadores MHC I, MHC II e CD40.

Provavelmente na população de BMDCs CD11c+, os peptídeos possam ter induzido ativação celular e de algum modo a redução da expressão dos marcadores analisados. Por outro lado, níveis crescentes de MHC II e CD40 foram observados na população de células BMDCs CD11c- para os intervalos de tempo. A ativação do CD40 é uma das principais vias que estimulam a produção de IL-12, que, por sua vez, estimula o perfil Th1 com IFN- $\gamma$  e resistência a *L. Major*, como descrito recentemente por Okwor e Uzonna (2016).

Níveis baixos ou indetectáveis de citocinas IL-17a, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-4 e IL-2 foram encontrados nas amostras. Conforme mostra a Figura 3, as duas citocinas principais, TNF e IL-6, pode-se observar um maior nível destas citocinas no sobrenadante das células estimuladas com os peptídeos 1, 3, 4, 7, 9 e 10 quando comparados com o controle basal. Entre os peptídeos avaliados, os peptídeos 5, 6 e 8 foram os que induziram os níveis mais baixos de TNF e IL-6, quando comparados com o controle. Baixos níveis de citocinas foram encontrados para as células estimuladas com o antígeno total de *L. V. braziliensis*, exceto para IL-6 após 48h, nos quais os níveis foram maiores do que o controle.

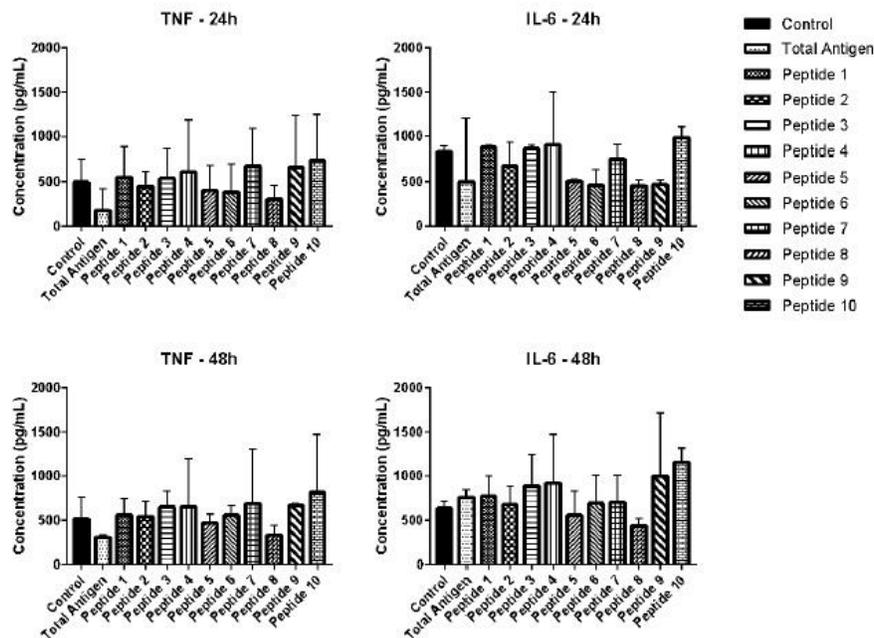


Figura 3 –Níveis de duas citocinas, TNF e IL-6, no sobrenadante da BMDCs estimulada com peptídeos de *L. V. braziliensis* durante 24h e 48h.

Níveis consideráveis destas citocinas também foram produzidos pelos controles, principalmente para a IL-6. A produção crescente de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-6 e TNF por BMDC foi relatada após estimulação com lipopolissacárido (LPS), por exemplo, demonstrado por Boonstra *et al.* (2006) e Geisel *et al.* (2007).

#### 4. CONCLUSÃO

Os resultados das análises indicam que, em células CD11c-, há uma forte redução na expressão do marcadores investigados em células controle, nos tempos de 24h e 48h. Contudo, o percentual de células positivas para MHC II e CD40 foi maior que o do controle para ambos os intervalos investigados. Os resultados sugerem que a diminuição ou ausência de CD11c nas células estimuladas, não acompanha a redução de marcadores de ativação, indicando que durante a ativação dessas células há diminuição da expressão de CD11c. Em células CD11c+, demonstraram expressão dos marcadores nas amostras controle não estimuladas com os peptídeos. As amostras controle estimuladas com antígeno total de *L.V. braziliensis* também expressaram altos níveis dos marcadores. Entretanto, para as amostras estimuladas com os peptídeos, observou-se uma diminuição nos níveis de expressão de MHC I, MHC II e CD40. O ambiente de citocinas de DCs é importante para a ativação de células T e foram encontrados níveis mais elevados de IL-6 e TNF entre as células estimuladas com os peptídeos 1, 3, 4, 7, 9 e 10, quando comparado com o controle não estimulado. Em conclusão, as células estimuladas com peptídeos de *L.V. braziliensis*, não mostraram boa expressão dos marcadores, nesta subpopulação de BMDCs

CD11c+, entretanto a observação de que epítopos peptídicos testados desencadearia a produção de IL-6 e TNF é interessante.

## 5. REFERÊNCIAS

- BOONSTRA, A., R. RAJSBAUM, M. HOLMAN, R. MARQUES, C. ASSELIN-PATUREL, J. P. PEREIRA, E. E. M. BATES, *ET AL.* 2006. “Macrophages and Myeloid Dendritic Cells, but Not Plasmacytoid Dendritic Cells, Produce IL-10 in Response to MyD88- and TRIF-Dependent TLR Signals, and TLR-Independent Signals.” *The Journal of Immunology* 177 (11). *American Association of Immunologists*: 7551–58. doi:10.4049/jimmunol.177.11.7551.
- CARVALHO LP, PASSOS S, SCHRIEFER A, CARVALHO EM. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Front Immunol* (2012) 3:301. doi:10.3389/fimmu.2012.00301
- GEISEL, JULIA, FRAUKE KAHL, MARTINA MÜLLER, HERMANN WAGNER, CARSTEN J KIRSCHNING, INGO B AUTENRIETH, AND JULIA-STEFANIE FRICK. 2007. “IL-6 and Maturation Govern TLR2 and TLR4 Induced TLR Agonist Tolerance and Cross-Tolerance in Dendritic Cells.” *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 179 (9): 5811–18.
- GHOSH M, BANDYOPADHYAY S (2004) Interaction of Leishmania parasites with dendritic cells and its functional consequences. *Immunobiology* 209: 173–177. doi: 10.1016/j.imbio.2004.02.007
- LUTZ MB, KUKUTSCH N, OGILVIE AL, RÖSSNER S, KOCH F, ROMANI N, SCHULER G (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods*. 1999 Feb 1;223(1):77-92.
- MASIC *et al.* Dendritic cell-mediated vaccination relies on interleukin-4 receptor signaling to avoid tissue damage after Leishmania major infection of BALB/c mice. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(7):e1721. doi: 10.1371/journal.pntd.0001721.
- MEHEUS *et al.* Cost-effectiveness analysis of combination therapies for visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010 Sep 7;4(9). pii: e818. doi: 10.1371/journal.pntd.0000818.
- MURRAY HW, BERMAN JD, DAVIES CR, SARAVIA NG. 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366:1561–1577. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67629-5.
- OLIVEIRA LF, *et al.* Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Tropica*. 2011; 118(2):87–96.
- OKWOR, IFEOMA, AND JUDE E. UZONNA. 2016. “Pathways Leading to Interleukin-12 Production and Protective Immunity in Cutaneous Leishmaniasis.” *Cellular Immunology*. doi:10.1016/j.cellimm.2016.06.004.
- Sundar, Chakravarty. Antimony toxicity. *Int J Environ Res Public Health*. 2010 Dec;7(12):4267-77. doi: 10.3390/ijerph7124267.
- VARGAS-INCHAUSTEGUI *et al.* Leishmania braziliensis infection induces dendritic cell activation, ISG15 transcription, and the generation of protective immune responses. *J Immunol*. 2008 Jun 1;180(11):7537-45.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases (WHO, Geneva, 2010).



## **6. AGRADECIMENTOS**

Ailton Alvaro agradece a bolsa de iniciação científica recebida da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE). Agradecemos ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ-PE, pelo espaço e infraestrutura fornecidos. Às agências de fomento, Conselho Nacional de Pesquisa Científica (CNPq) e FACEPE, pelo apoio financeiro ao projeto para realização desse trabalho.



ÁREA DE SUBMISSÃO: PESQUISA CLÍNICA E PRÉ-CLÍNICA – PC 16

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DA DIETILCARBAMAZINA NA SECREÇÃO DE IFN- $\gamma$ E IL-17A EM SOBRENADANTE DE CULTURA DE CÉLULAS MONONUCLEADAS DE SANGUE PERIFÉRICO DE ASMÁTICOS

E. G. C. CUNHA<sup>1</sup>, R. V. C. SANTOS<sup>1</sup>, G. S. VIEIRA-DE-MELO<sup>1</sup>, J. A. RIZZO<sup>2</sup>, V. C. M COSTA<sup>1</sup>, C. A. PEIXOTO<sup>3</sup>, M. J. B. M. RÊGO<sup>1</sup>, I. R. PITTA<sup>4</sup> e M. G. R PITTA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica – Suely Galdino, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Hospital da Clínicas de Pernambuco, Serviço de Pneumologia

<sup>3</sup>Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Laboratório de Ultraestrutura

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica – Suely Galdino, Laboratório de Síntese e Planejamento de Fármacos

E-mail para contato: renata.vcsantos@gmail.com

*RESUMO – A asma é uma doença das vias aéreas que prejudica significativamente a qualidade de vida de várias faixas etárias em vários locais do mundo. O tratamento atualmente, baseado em corticoides, tem encontrado resistência, além de seus efeitos colaterais. Diante da necessidade da busca de novos fármacos, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito imunomodulador da Dietilcarbamazina (DEC), frente a duas citocinas importantes para o processo inflamatório da asma. A DEC já mostrou efeitos anti-inflamatórios promissores em modelos murinos de inflamação crônica e hipertensão pulmonar. Amostras sanguíneas de voluntários sadios e asmáticos foram coletadas, a partir das quais as células periféricas mononucleares do sangue (PBMCs) foram isoladas e incubadas com a DEC nas concentrações de 10, 100, 400 e 600 $\mu$ M. Após 48 horas, o sobrenadante da cultura foi coletado e as citocinas Interleucina-17A e Interferon- $\gamma$  foram quantificadas através do ensaio de Elisa. A análise estatística foi feita pelo GraphPad para o teste de Wilcoxon e os dados foram expressos em mediana, mínimo e máximo e a significância  $p < 0.05$ . Os resultados preliminares de amostras de pacientes asmáticos não apresentaram significância estatística até mesmo quando foi analisado o estímulo com a maior dose, isto é, 600 $\mu$ M, para ambas citocinas IL-17A [132,11  $\mu$ g/mL (286,94 – 3.90)], e IFN- $\gamma$  [989,42  $\mu$ g/mL (2498,30 - 331,02)] provavelmente devido à quantidade de amostras ainda insuficiente. Contudo, descritivamente os resultados sugerem um perfil*



*imunomodulador da DEC sobre as IL-17A e um efeito de reação “tudo ou nada” sobre o IFN- $\gamma$ .*

*Palavras-chave: Asma. Citocinas. DEC. Imunomodulação.*

**ABSTRACT** – *Asthma is a disease of the airways that significantly prejudicet the quality of life of various age groups in various places in the world. The current treatment based on corticosteroids, has found resistance, besides its side effects. On the necessity of the search for new drugs, the objective of this work was to evaluate the immunomodulatory effect of Diethylcarbamazine (DEC), in front of two cytokines important in the inflammatory process of asthma. DEC has shown promising anti-inflammatory effects in murine models of chronic inflammation and pulmonary hypertension. Blood samples from healthy and asthmatic volunteers were collected, which after isolation from peripheral mononuclear blood cells (PBMCs) they were incubated with DEC at concentrations of 10, 100, 400 and 600 $\mu$ M. After 48 hours, the culture supernatant was collected and Interleukin-17A and Interferon- $\gamma$  cytokines were quantified by ELISA assay. Statistical analysis was performed by GraphPad for the Wilcoxon test and the data were expressed as median, minimum and maximum and significance  $p < 0.05$ . Preliminary results of asthmatic patients samples did not show statistical significance even when the stimulus was analyzed with the higher dose, i.e. 600 $\mu$ M, for both cytokines IL-17A [132,11  $\mu$ g/mL (286,94 – 3.90)], and IFN- $\gamma$  probably due to the amount of samples still insufficient. However, descriptively the results suggest an immunomodulatory profile of DEC on IL-17A, and a reaction effect "all or nothing" of IFN- $\gamma$ .*

*Keywords: Asthma. Cytokines. DEC. Immunomodulation.*

## 1. INTRODUÇÃO

A asma é uma doença heterogênea que prejudica de forma significativa a qualidade de vida de diversas faixas etárias e que está presente nos mais diversos países do mundo. Infelizmente, ainda é uma doença cujo tratamento, além de não ter cura, na maioria das vezes apresenta refratariedade frente aos medicamentos atualmente utilizados (Stachler, 2015). Os corticosteróides inalatórios constituem um grupo de medicamentos de fundamental importância para o combate da asma moderada e severa, no entanto estes medicamentos possuem diversos efeitos colaterais, além de existir um considerável número de pacientes resistentes aos mesmos (Choby & Lee, 2015). A Dietilcarbamazina (DEC) é um filaricida disponível no mercado, pertencente à classe das piperazinas (Dreyer e Norões, 1997; Ribeiro *et al.*, 2014). A DEC é hidrossolúvel, possui absorção por via oral, além de ser bem absorvida no intestino e já mostrou efeitos anti-inflamatórios em modelos murinos de inflamação crônica e hipertensão pulmonar (Ribeiro, 2016). As interleucinas pró-inflamatórias interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e interleucina-17A (IL-17A), são citocinas produzidas por diferentes tipos celulares e que medeiam as reações imunológicas e inflamatórias, destacando-se pela sua importância



na asma (Robinson, 2010). Dentro do contexto de resistência a tratamentos, o reposicionamento de fármacos se justifica como essencial a busca de melhoria na qualidade de vida desses pacientes. Os objetivos do presente trabalho foram testar a efeitos da DEC em células de pacientes com asma moderada a grave em comparação a voluntários sadios no que concerne à modulação da IL-17A e do IFN- $\gamma$ .

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram recrutados 04 voluntários sadios e 06 pacientes asmáticos moderados a grave no Ambulatório de Pneumologia do Hospital das Clínicas – Universidade Federal de Pernambuco. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Centro de Ciências da Saúde (CCS), número 711/514 e todos os voluntários assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). A partir das amostras de sangue colhidas em tubos sem anticoagulante, foi feito o isolamento das células periféricas mononucleares do sangue (PBMCs) e consequente cultivo das mesmas em placas de 96 poços na concentração de  $1 \times 10^4$  células por poço. No mesmo dia as células foram incubadas com as concentrações de 10, 100, 400 e 600 $\mu$ M de DEC; o controle negativo foi feito com 100 $\mu$ M de Metilprednisolona; além da estimulação com PMA e ionomicina em todos os poços, excetuando-se a triplicata que só continha células. Após 48 horas, o sobrenadante de cultura foi coletado para quantificação de IFN- $\gamma$  e IL-17A pelo método Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA). A análise estatística foi feita pelo GraphPad com o teste de Wilcoxon, os dados estão expressos em mediana, mínimo e máximo e a significância  $p < 0.05$ .

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantificação da citocina IL-17A não apresentou diferença significativa para as concentrações de DEC, contudo apresentou um perfil imunomodulador, tanto nos voluntários saudáveis, quanto nos pacientes asmáticos, sendo bem mais expressiva no grupo experimental, conforma mostra a Figura 1.

Após o tratamento com a DEC nas PBMCs de voluntário sadios e pacientes asmáticos, a IL-17A foi quantificada. Nos sobrenadantes das culturas de PBMCs de voluntários sadios as condições tratadas com a DEC nas doses de 10 $\mu$ M [211,44  $\mu$ g/mL (3351,44 - 25,85)], 100 $\mu$ M [53,98  $\mu$ g/mL (2473,84 - 25,84)], 400 $\mu$ M [33,58  $\mu$ g/mL (933,32 - 3,90)], e 600 $\mu$ M [34,38  $\mu$ g/mL (937,32 - 3,90)] não reduziram os níveis da IL-17A a ponto de serem estatisticamente significante quando comparadas com a condição estimulada [153,57  $\mu$ g/mL (2758,64 - 22,64)] (Figura 1A). De igual modo, os níveis de IL-17A nas condições DEC nas doses de 10 $\mu$ M [166,05  $\mu$ g/mL (2021,79 - 23,89)], 100 $\mu$ M [225,50  $\mu$ g/mL (2334,10 - 3,90)], 400 $\mu$ M [3,90  $\mu$ g/mL (92,26 - 2,02)], e 600 $\mu$ M [132,11  $\mu$ g/mL (286,94 - 3,90)] não foram estatisticamente significativa em PBMCs de pacientes asmáticos depois de feita a comparação com o estímulo [399,32  $\mu$ g/mL (2328,10 - 3,89)], por certo devido ao número amostral insuficiente (Figura 1B).

O IFN- $\gamma$  também não apresentou diferença significativa estatisticamente, mas mostra um potencial inibidor num mecanismo “tudo ou nada”, dado que entre as doses de 10 e 100 $\mu$ M de DEC não ocorreu imunomodulação, mas para as doses de 400 e 600 $\mu$ M há uma inibição da produção do interferon de forma brusca (Figura 2).

Depois de tratar as PBMCs de voluntários saudáveis com a DEC nas concentrações 10 $\mu$ M [2445,77  $\mu$ g/mL (31006,92 - 1336,88)], 100 $\mu$ M [2115,77  $\mu$ g/mL (31376,15 - 1048,0)], 400 $\mu$ M [476,88  $\mu$ g/mL (28437,69 - 228,0)], e 600 $\mu$ M [179,11  $\mu$ g/mL (25499,23 - 101,33)] não foi encontrada significância estatística para os níveis de IFN- $\gamma$  quando comparadas com a condição estimulada [7445,55  $\mu$ g/mL (31883,61 - 728,88)] (Figura 2A). De igual modo, os níveis de IFN- $\gamma$  em PBMCs de pacientes asmáticos nas condições de 10 $\mu$ M [10800,51  $\mu$ g/mL (54752,31 - 10,45)], 100 $\mu$ M [10336,86  $\mu$ g/mL (60475,38 - 30,06)], 400 $\mu$ M [1388,71  $\mu$ g/mL (5598,69 - 1001,91)], e 600 $\mu$ M [989,42  $\mu$ g/mL (2498,30 - 331,02)] da DEC não apresentaram dados estatisticamente significantes após comparação com o estímulo [642,00  $\mu$ g/mL (27971,24 - 157,51)], por certo, ocasionado pelo baixo número amostral (Figura 2B).

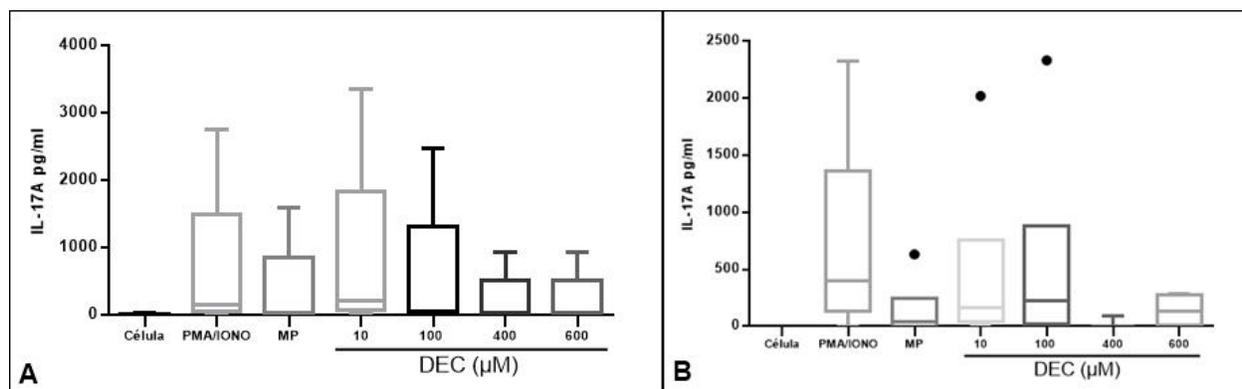


Figura 1 – Níveis de IL-17A (picogramas/mililitros) em células de voluntários saudáveis (A) e pacientes asmáticos (B) estimuladas com PMA/Ionicina.

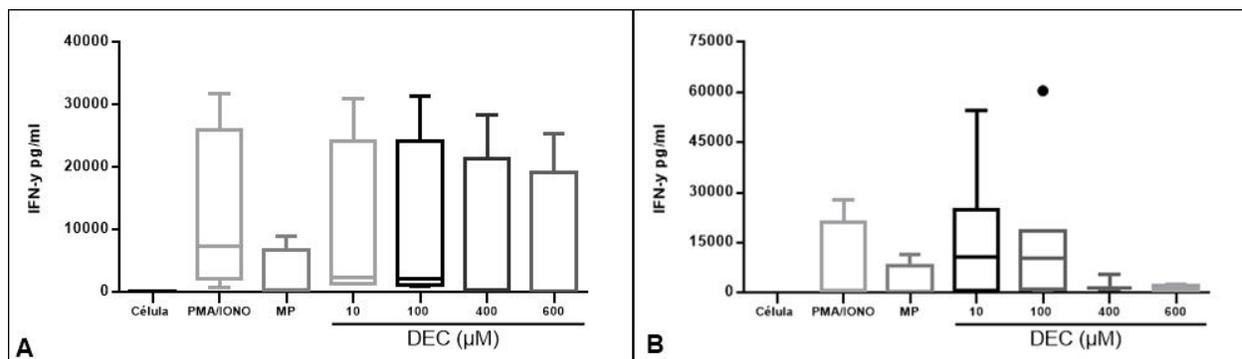


Figura 2 – Níveis de INF- $\gamma$  (picogramas/mililitros) em células de voluntários saudáveis (A) e pacientes asmáticos (B) estimuladas com PMA/Ionomicina.

Os dados preliminares sugerem que a DEC tem capacidade para modular o sistema imune através de duas importantes citocinas relacionadas à asma, a IL-17A e o INF- $\gamma$ . A literatura já destacou o papel do INF- $\gamma$  na resistência a corticosteroides em camundongos (Yang *et al.*, 2009), bem como a IL-17A como fundamental para os processos inflamatórios da asma (Kim *et al.*, 2010). Bem como recentemente foi mostrado que a DEC tem papel anti-inflamatório no contexto de doenças das vias aéreas como a hipertensão pulmonar em modelos murinos (Ribeiro, 2016). O aumento do número amostral possivelmente esclarecerá a potencial importância da DEC para o tratamento contra a asma.

#### 4. CONCLUSÃO

Os resultados sugerem uma redução na mediana referente à secreção das citocinas quando em doses acima de 400 $\mu$ M, apesar da quantidade amostral do estudo não ter sido suficiente para gerar resultados com significância estatística devido ao baixo número amostral visto que são resultados preliminares. É importante salientar que o perfil descritivo dos dados gerados mostrou que a DEC tem potencial de imunomodular essas duas importantes citocinas participantes do processo da asma, reduzindo seus níveis e, conseqüentemente, diminuindo os efeitos inflamatórios desta doença.

#### 5. REFERÊNCIAS

- CHOBY, G.W.; LEE, S. Pharmacotherapy for the treatment of asthma: current treatment options and future directions. *Int. Forum of Allergy and Rhinology*, v. 5 (1), 35-40, 2015.
- DREYER, G.; NORÕES, J. Dietilcarbamazina no tratamento de filariose bacteriana. *Rev. da Soc. Bras. de Med. Trop.*, v. 30 (3), p. 229-240, 1997.
- KIM, H.Y.; DEKRUYFF, R.H.; UMETSU, D.T.. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nat. Imm.*, v. 11 (7), p. 577-84, 2010.
- RIBEIRO, E.L.; BARBOSA, K.P.S.; FRAGOSO, I.T.; DONATO, M.A.M.; GOMES, F.O.S.;



SILVA, B.S.; SOARES E SILVA, A.K.; ROCHA, S.W.S.; SILVA JUNIOR, A.M.; e PEIXOTO, C.A. Diethylcarbamazine Attenuates the Development of Carrageenan-Induced Lung Injury in Mice. *Med. of inflamm.*, v. 2014, p. 1-12, 2014.

RIBEIRO, E.L. Avaliação do efeito anti-inflamatório da Dietilcarbamazina em modelo murino de inflamação crônica e hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina. Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco. UFPE/CCB-2016-100. 2016

ROBINSON, D.S. The role of the T cell in asthma. *Jour. of Allergy and Clin. Imm.*, v. 126 (6), p.1081–1091, 2010.

STACHLER, R.J. Comorbidities of asthma and the unified airway. *Int. Forum of Allergy & Rhinology*, v. 5 (1), p. 17-22, 2015.

YANG M.; KUMAR R.K.; FOSTER P.S.. Pathogenesis of steroid-resistant airway hyperresponsiveness: interaction between IFN-gamma and TLR4/MyD88 pathways. *Jour. of Imm.*, v. 182, p. 5107–5115, 2009.

## 6. AGRADECIMENTOS

Agradecimentos às agências de fomento que permitiram a realização desse trabalho, a saber, Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT\_if).



ÁREA DE SUBMISSÃO: PESQUISA CLÍNICA E PRÉ-CLÍNICA – PC 17

## NÍVEIS SÉRICOS DE IL-29 EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO.

M. F. D. SOUZA<sup>1</sup>, H.L.S NETA<sup>1</sup>, H.A. MARIZ<sup>2</sup>, M.J.B.M. RÊGO<sup>1</sup>, M.C. PEREIRA<sup>1</sup>, I.R. PITTA<sup>1</sup>,  
C.D.L. MARQUES<sup>2</sup>, A.L.B.P. DUARTE<sup>2</sup>, M.G.R. PITTA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Imunomodulação e novas abordagens terapêuticas/ LINAT, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino – NUPIT SG, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

<sup>2</sup> Hospital das Clínicas de Pernambuco, UFPE, Recife-PE.

E-mail para contato: deodatomariadefatima@gmail.com

**RESUMO** – *O objetivo deste estudo foi avaliar os níveis séricos de IL-29 em pacientes com LES frente às manifestações clínicas da doença. Quarenta e nove pacientes (47 mulheres e 2 homens, 37,5 ± 10,2 anos) que preencheram os critérios de classificação do American College of Rheumatology para o LES foram incluídos neste estudo. Vinte indivíduos saudáveis (19 mulheres e 1 homem, 37,1 ± 6.6 anos) constituíram o grupo controle. Os níveis séricos de IL-29 foram determinados por kits de ELISA específicos e as análises estatísticas foram realizadas por teste não paramétrico (Mann-Whitney);  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Pacientes com LES apresentaram os maiores níveis de IL-29 em relação aos voluntários sadios ( $p < 0,0001$ ). Adicionalmente, pacientes com redução de proteínas do complemento foram os que apresentaram os menores níveis séricos de IL-29 ( $p = 0,028$ ). Não houve correlações significativas em relação aos demais parâmetros clínicos da doença tais como formação de auto-anticorpos, nefrite ou SLEDAI ( $p > 0,05$ ). Nossos resultados demonstram que os níveis séricos de IL-29 aumentam de forma significativa no LES. Para o nosso conhecimento este é o primeiro estudo que avalia os níveis séricos desta citocina em relação às manifestações clínicas da doença. Estes dados podem promover novas investigações acerca do envolvimento de IL-29 na patogênese do LES.*

**Palavras-chave:** Doença autoimune. SLEDAI. Interleucina 29.

**ABSTRACT** – *The aim of this study was to evaluate serum levels of IL-29 in patients with SLE in relation to disease clinical manifestations. Forty-nine patients (47 women and 2 men, 37.5 ± 10.2 years) who met the American College of Rheumatology classification criteria for SLE were included in this study. Twenty healthy individuals (19 women and 1 man, 37.1 ± 6.6 years) were the control group. Serum levels of IL-29 were determined by*



*ELISA specific kit and statistics analysis were performed by non-parametric tests (Mann-Whitney or Spearman);  $p < 0,05$  was considered significant. Patients with SLE presented the highest levels of IL-29 in relation to healthy volunteers ( $p < 0,0001$ ). In addition, patients with complement proteins reduction were those with lower serum levels of IL-29 ( $p = 0.028$ ). There were no significant correlations in relation to other clinical parameters of disease such as formation of autoantibodies, nephritis or SLEDAI ( $p > 0.05$ ). Our results demonstrate IL-29 serum levels increased in SLE. To our knowledge this is the first study evaluating the serum levels of this cytokine compared to disease clinical manifestations. These data may promote further investigations into the involvement of IL-29 in the pathogenesis of SLE.*

*Keywords: Autoimmune disease. SLEDAI. Interleukin 29.*

## 1. INTRODUÇÃO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune que afeta múltiplos órgãos e sistemas, com uma ampla gama de manifestações clínicas e laboratoriais que segue um padrão característico de recaídas e remissões. De etiologia desconhecida, o desenvolvimento do LES está ligado à predisposição genética e a fatores ambientais. Esta doença possui distribuição universal, podendo afetar indivíduos de todas as raças e idades, incidindo principalmente em mulheres na idade reprodutiva (L. Samuel *et al*, 2013; EI, Sato *et al*, 2006; Jacobson, *et al*, 1997). Segundo o Ministério da Saúde, a incidência estimada em diferentes locais do mundo é de aproximadamente 1 a 22 casos para cada 100.000 pessoas por ano.

As citocinas estão fortemente relacionadas à patogênese do LES, uma vez que são elementos fundamentais na regulação da resposta imunitária, intervindo em ambas as respostas celular e humoral (El-Sayed *et al.*, 2008; Emerah *et al.*, 2015).

A interleucina 29 (IL-29) é uma citocina membro da família interferon Lambda I (IFN- $\lambda$ 1), um interferon tipo III. O papel biológico mais estudado dos IFN- $\lambda$ s é a sua atividade antiviral. Além disso, citocinas desta família estão relacionadas ao desenvolvimento de doenças autoimunes (Wu *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2016). Contudo pouco se sabe sobre o papel de IL-29 no LES. Além disso, permanece pouco explorado o envolvimento de IL-29 nas manifestações clínicas desta doença. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo avaliar os níveis séricos de IL-29 em pacientes com LES e suas possíveis correlações com as manifestações clínicas da doença.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

***Pacientes:*** Quarenta e nove pacientes com LES (47 mulheres e 2 homens,  $37,5 \pm 10,2$  anos) que preencheram os critérios do *American College of Rheumatology* para classificação do LES foram incluídas neste estudo. A atividade da doença foi mensurada utilizando o *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index* (SLEDAI) (Gladman *et al*, 2002). Quarenta pacientes foram classificados com a doença em remissão (SLEDAI $<$ 6) e nove em atividade (SLEDAI $>$ 6). Vinte indivíduos saudáveis (19 mulheres e 1 homem,  $37,1 \pm 6.6$  anos) constituíram o grupo controle.



***ELISA:*** Os níveis séricos de IL-29 foram determinados através de kits específicos de ELISA de acordo com as instruções do fabricante (limite de detecção: 7.8-1000 pg/mL, eBiosciences).

***Análises estatísticas:*** As análises estatísticas foram realizadas por meio de comparações univariadas, utilizando o teste não paramétrico (Mann-Whitney). Os resultados foram mostrados considerando o valor da mediana, mínimo e máximo, sendo  $P < 0,05$  considerado como significativo.

***Considerações éticas:*** O projeto foi aprovado pelo COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE N° 145/09).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 49 pacientes com LES incluídos neste estudo, 81,7% foram identificados com a doença em remissão e 18,3% em atividade, de acordo com a tabela 1.

Tabela 1. Caracterização clínica e demográfica dos pacientes com LES recrutados para este estudo

Número de	N = 49
pacientes	
Idade (anos),	
Média $\pm$ dp	37,5 $\pm$ 10,2 (20-61)
Sexo, N (%)	
Masculino	2 (4.1)
Feminino	47 (95.9)
Anti-DNA, N	
(%)	
Positivo	9 (18.3)
Negativo	40 (81.7)
Complemento, N	
(%)	

Baixo	28 (57.1)
Normal	21 (42.9)
Atividade da doença (SLEDAI), N (%)	
< 6	40 (81,7)
≥ 6	9 (18,3)
Nefrite, N (%)	
Ativa	9 (18.3)
Inativa	40 (81.7)

Os níveis séricos de IL-29 de pacientes com LES (29,2 pg/mL; 7,8-512,2 pg/mL) foram mais elevados do que os encontrados nos indivíduos saudáveis (7,8pg/mL; 7,8-7,8pg/mL) ( $p < 0,0001$ ) (Figura 1).

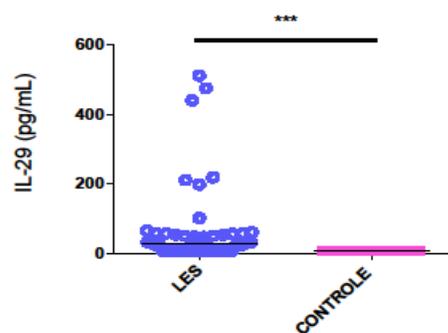


Figura 1. Níveis séricos de IL-29 em voluntários saudáveis e pacientes com LES ( $p < 0.0001$ ).

A expressão sérica da citocina IL-29 também foi investigada em relação à atividade da doença. Pacientes com redução de proteínas do complemento foram os que apresentaram as menores

taxas de IL-29 ( $p=0,028$ ) (Figura 2). Análises adicionais referentes ao SLEDAI, acometimento de nefrite, formação de auto-anticorpos ou demais complicações clínicas da doença em relação à expressão IL-29 não foram significativas ( $p > 0,05$ ).

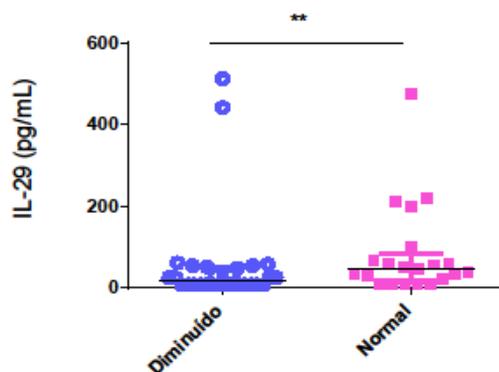


Figura 2. Níveis séricos de IL-29 em pacientes com LES com proteínas do complemento diminuída e normal ( $p=0,028$ ).

A citocina IL-29 é membro da família IFN- $\lambda$ 1 um interferon tipo III, esta família agrupa importantes citocinas que regulam o sistema imunológico (Wu et al., 2011). Para nosso conhecimento o papel da IL-29 no desenvolvimento do LES ainda permanece pouco esclarecido.

Nossos dados demonstraram que pacientes com LES apresentaram maiores níveis de IL-29 comparado ao grupo de indivíduos saudáveis. Dessa forma sugerimos um possível envolvimento dessa citocina na patogênese da doença. Importaneamente, verificamos que pacientes com redução de proteínas do complemento foram os que apresentaram as menores taxas de IL-29. Além disso, não encontramos demais correlações clínicas. Tal fato pode estar associado ao baixo número de pacientes em fase ativa da doença segundo a pontuação do SLEDAI.

Ainda são escassos estudos que investigam os níveis séricos dessa citocina no LES. No entanto, há estudos que demonstram o papel do IFN no LES através de análises dos níveis séricos e da expressão gênica (Wu et al., 2011; Hua et al., 2006). Contudo, IL-29 membro da família do IFN, ainda permanece pouco explorado neste contexto. Para o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avalia os níveis séricos de IL-29 em um grupo de pacientes com LES em relação à clínica.

#### 4. CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram que os níveis séricos de IL-29 aumentaram de forma significativa no LES. Para o nosso conhecimento este é o primeiro estudo que investiga os níveis séricos de IL-29 de pacientes com LES. Portanto, nossos dados podem promover novos estudos sobre o papel de IL-29 na patogênese desta doença.



## 5. REFERÊNCIAS

- EI, Sato et al. Lúpus eritematoso sistêmico: acometimento cutâneo/articular. *Rev. da Assoc. Méd. Bras.*52: 0104-4230, 2006.
- EL-Sayed, M. *et al.* Correlative Study of Serum Th1/Th2 Cytokines Levels in Patients with Systemic Lupus Erythematosus with SLEDAI M. *Egyp. Dermatol. Onl. J.*, v. 4, p. 3–19, 2008.
- Emerah, A. A. *et al.* Effects of interleukin-10 gene polymorphism on clinical diversity and activity of systemic lupus erythematosus. *Egyp. Rheumatol. & Rehab.*, v. 42, n. 2, p. 49–54, 2015.
- Gladman DD, Ibanez D, Urowitz MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol.*,29: 288, 2002.
- Hua, J. et al. Functional Assay of Type I Interferon in Systemic Lupus Erythematosus Plasma Association With Anti–RNA Binding Protein Autoantibodies. *Arth. & Rheumat.*, v. 54, p. 1906–1916, 2006.
- Jacobson, Denise L. *et al.* Epidemiology and Estimated Population Burden of Selected Autoimmune Diseases in the United States. *Clin. Immunol. And Immunop.*, p.223-243, 1997.
- L., Samuel *et al.* Systemic Lupus Erythematosus: A Review of the Disease Treatment Options. *Clin. Rev.*, Indianapolis, p.110-121, 2013.
- Ministério da saúde. Secretária de Atenção á Saúde. Portaria N° 100, de 7 de fevereiro de2013. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2013/prt0100\\_07\\_02\\_2013.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2013/prt0100_07_02_2013.html)>. Acesso em: 24/10/2016.
- Wu, Q. et al. Interferon-lambda1 induces peripheral blood mononuclear cell-derived chemokines secretion in patients with systemic lupus erythematosus: its correlation with disease activity. *Arth. Res. & Therapy*, 2011.
- Xu, L. et al. Interleukin-29 Enhances Synovial Inflammation and Cartilage Degradation in Osteoarthritis. *Mediat. of Inflamm.*, v. 2016, p. 1–13, 2016.

## 6. AGRADECIMENTOS

CNPq, INCT-if, CAPES.



ÁREA DE SUBMISSÃO: PESQUISA CLÍNICA E PRÉ-CLÍNICA – PC 20

## SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS: PROCESSO INFLAMATORIO?

A.G. FONSECA<sup>1</sup>, H. H. G. de CARVALHO<sup>1</sup>, Dias, C. N. N. C<sub>1</sub>; Fonseca, Carvalho, H. H. G<sup>1</sup>M. M. G. LOPES<sup>2</sup>, T. R. A, Lopes<sup>1</sup>, G. D. AZEVEDO<sup>3</sup> e T. M. A. M. LEMOS<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Doutoranda do Programa de PPGITM da Universidade Federal do Rio Grande do Norte

<sup>2</sup>Docente do Departamento de Nutrição - Universidade Federal do Rio Grande do Norte

<sup>3</sup>Professor do departamento de morfologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte

<sup>4</sup>Docente do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia.

Email:telmaml@yahoo.com.br.

**RESUMO:** *avaliar a influência da RI e da obesidade no estado inflamatório de mulheres com síndrome dos ovários policísticos (SOP). Foram avaliadas 50 mulheres nos parâmetros: teste de tolerância à glicose oral (TTGO), perfil lipídico, os indicadores antropométricos, circunferência da cintura (CC) e a proteína c reativa ultrasensível (hsCRP). Foi usado HOMA-IR, QUICKI, relação glicemia/insulina. As pacientes apresentaram média de idade de 26(±6) e o IMC 34,5(±5,7). Foram detectados valores aumentados dos indicadores de obesidade central e de RI nas mulheres avaliadas. A hsCRP apresentou correlações estatisticamente significativas com todos os indicadores de obesidade central e RI exceto a glicemia de jejum e a CC (p<0,01). Os resultados estabelecem uma associação entre a RI e o estado inflamatório, bem como a influência da obesidade nas alterações metabólicas características da síndrome.*

**Palavras chave:** *síndrome dos ovários policísticos, resistência à insulina, inflamação e obesidade.*

**ABSTRACT:** *To evaluate the influence of the insulin resistance (IR) and obesity in the inflammatory status of women with polycystic ovary syndrome (PCOS). A total of 50 women to the following parameters: Test oral glucose tolerance (OGTT), the dosage of the lipid profile, the central obesity anthropometric indexes, waist circumference (WC) and ultrasensitive C-reactive protein (hsCRP). The IR obtained using insulin, HOMA-IR, QUICKI, glucose / insulin ratio. The patients had a mean age of 26 (± 6) and IMC index of 34.5 (± 5.7). Increased levels of central obesity indicators and IR in women studied were detected. The hsCRP showed statistically significant correlations with all*



*central obesity indicators and RI except fasting plasma glucose and the CC ( $p < 0.01$ ). The results establish the association between IR and the inflammatory state in PCOS, as well as the influence of obesity on metabolic changes syndrome.*  
*Keywords: polycystic ovary syndrome, insulin resistance, inflammation and obesity.*

## 1. INTRODUÇÃO

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é considerada a endocrinopatia mais comum na fase reprodutiva da mulher, com prevalência que varia entre 5 a 10%. (Whitaker, 2011). e engloba um amplo espectro de sinais e sintomas de disfunção ovariana. Em 2003, o consenso de Rotterdam propôs que a síndrome pode ser diagnosticada após a exclusão de outras causas de irregularidade menstrual e hiperandrogenismo, tais como: hiperprolactinemia, formas não-clássicas das hiperplasias adrenais congênitas, síndrome de Cushing, neoplasias secretoras de andrógenos, hipotireoidismo, e pela presença de pelo menos dois dos seguintes critérios: oligo e/ou anovulação (cujas manifestações clínicas são a oligomenorréia ou amenorréia, o sangramento uterino disfuncional e a infertilidade), níveis elevados de andrógenos circulantes (hiperandrogenemia) e/ou manifestações clínicas do excesso androgênico (hiperandrogenismo, caracterizado por hirsutismo, acne e alopecia) e morfologia policística dos ovários (presença de 12 ou mais folículos, medindo 2 a 9 mm de diâmetro e/ou volume ovariano acima de 10 cm<sup>3</sup>) à ultra-sonografia (US) (Azzir *et al*, 2005; The Rotterdam, 2005).

Apesar de não estar incluída nos critérios de diagnóstico da síndrome, a RI e a hiperinsulinemia compensatória a este quadro está presente em mais de 70% das pacientes com SOP (Nandi *et al*, 2014). Vários estudos confirmam a hipótese de que a RI e a hiperinsulinemia desenvolvem um papel de destaque na patogenia da SOP e parece ser um importante marcador de doença metabólica, e do risco cardiovascular (Progress, 1995). A obesidade, principalmente a obesidade abdominal é fundamental para o monitoramento da SOP por estar presente em aproximadamente 80% dessas pacientes (Norman *et al*, 2002) e além disso está relacionada diretamente a RI e associadas elevam o risco em desenvolver diabetes mellitus, doença cardiovascular e / ou dislipidemia (Zhao *et al*, 2012).

A SOP possui uma possível ligação com processos inflamatórios em relação às condições metabólicas, tais como, obesidade e resistência insulínica e foi estabelecido quando se demonstrou que os adipócitos expressavam uma citocina pró-inflamatória, o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), que a expressão deste nos adipócitos de animais obesos estava aumentada, e também que a neutralização do TNF-  $\alpha$  levava à diminuição da resistência insulínica nesses animais (Nandi *et al*, 2014). Estabeleceu-se, assim, a primeira conexão entre aumento da expressão e da concentração plasmática de citocina pró-inflamatória e resistência insulínica. Uma série de trabalhos posteriores na área de obesidade tem confirmado que a obesidade é um estado de inflamação crônica, pois há aumento da proteína c reativa (PCR), interleucina 6 (IL-6) e do inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1). Estudos recentes do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a SOP pode apresentar perfil inflamatório caracterizada por concentrações elevadas de PCR (Progress, 1995). Mediante a importante associação entre RI, obesidade central e inflamação na SOP o objetivo deste estudo foi investigar a correlação entre os indicadores antropométricos de obesidade central, os



métodos de avaliação clínica para RI e a inflamação na SOP. Esta avaliação é fundamental para uma melhor caracterização das anormalidades metabólicas presentes na síndrome.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

A população em estudo foi composta por 50 mulheres, apresentando média etária de  $26,68 \pm 5,88$  anos, recrutadas na Maternidade Escola Januário Cicco da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da instituição e todas as participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Os critérios de exclusão adotados foram: hiperprolactinemia, falência ovariana prematura, hipotireoidismo primário, gravidez, diabetes e o uso crônico de alguns medicamentos, dentre eles contraceptivos orais, agentes sensibilizadores da insulina, antiepiléticos e qualquer outro agente hormonal nos últimos três meses.

As pacientes foram submetidas ao exame clínico constando de medida da massa corporal, estatura e CC. A CC foi mensurada no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca. A RCA foi calculada dividindo-se a CC pela altura também em centímetros. Para avaliação do índice C foi utilizada a fórmula proposta por Valdez (Akemine et al, 2010). Os pontos de corte utilizados para as variáveis antropométricas foram os propostos por Pitanga e Lessa, sendo estes valores  $\geq 87,5$  cm,  $\geq 1,18$  e  $\geq 0,53$ , respectivamente para CC, índice C e RCE (Zhao et al, 2014). Para o índice LAP foi utilizado o ponto de corte estabelecido por Costa e cols. específico para a SOP (Costa et al, 2012).

Após jejum prévio de 12 horas, foram coletadas amostras de sangue periférico, para determinação das concentrações séricas de glicose de jejum, colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, triglicerídeos e hemoglobina glicada (HbA). O teste oral de tolerância a glicose (TOTG) também foi realizado, as pacientes consumiram 75g de glicose anidra, em até cinco minutos, e uma nova coleta de sangue foi realizada no intervalo de 2h. Todos os exames foram realizados por ensaios enzimático-colorimétricos, com exceção da HbA que foi realizada pelo método Trivelli que determina a porcentagem total de hemoglobina glicada, por isso apresenta uma intolerância à glicose é caracterizada pela glicemia plasmática aos 120 minutos caracterizado por valores entre  $\geq 140$  e  $< 200$  mg/dL, glicemia de jejum  $\geq 100$  mg/dL (Teede et al, 2006). e hemoglobina glicada (HbA) abaixo de 8 %. Todas as dosagens bioquímicas (curva glicêmica e perfil lipídico) foram realizadas com kits Labtest Diagnóstica-SA® de acordo com as especificações do fabricante no equipamento automatizado Labmax 100. As concentrações séricas de insulina e proteína C reativa ultrasensível (hsCRP) foram determinados pelo método de quimiluminescência, no aparelho Immulite 1000® (Diagnostic Products Corporation – Los Angeles CA, EUA).

O diagnóstico da RI, foi realizado através dos seguintes métodos indiretos: insulinemia de jejum, G/I, índice de HOMA-IR e QUICKI. Considerou-se RI quando a insulina de jejum era superior a  $12 \mu\text{IU/mL}$ , e a G/I apresentou valores inferiores a  $6,4 \mu\text{IU/mL}$  (Geloneze et al, 2005). O índice de HOMA-IR foi calculado aplicando-se a seguinte equação: (glicemia de jejum em mg/dL  $\times 0,05551$ )  $\times$  insulina de jejum em  $\mu\text{IU/mL}$  /  $22,5$ . A RI foi considerada quando os valores de HOMA-IR foram maiores ou igual que 2,71, de acordo com a distribuição de valores para a população brasileira (Geloneze et al, 2005; Legro et al, 2014). O índice de QUICKI foi determinado pela fórmula:  $\text{QUICKI} = 1 / (\log \text{insulina} (\mu\text{IU/mL}) + \log \text{glicemia} (\text{mg/dL}))$ . Considerou-se RI aqueles valores inferiores a 0,33 (Pimenta e Pontes, 2014).



#### *Análise estatística*

A distribuição de dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e estatística descritiva foi realizada para observação das medidas de tendência central e de dispersão como média, desvio padrão, mediana e percentis 25 e 75. As correlações entre os parâmetros avaliados foram analisadas utilizando o teste de correlação de Pearson. O pacote estatístico SPSS® versão 17.0 para Windows (SPSS, Inc., Chicago IL) foi utilizado para esses fins. Em todos os casos, a significância estatística foi estabelecida em 5% ( $p < 0,05$ ).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características clínicas e bioquímicas das pacientes estudadas podem ser visualizadas na Tabela 1. O grupo SOP apresentou valores superiores para os indicadores antropométricos de obesidade central: IMC ( $34,5 \pm 5,7$ ) kg/m<sup>2</sup>, índice LAP ( $52 \pm 39$ ) cm.mmol/L, índice C ( $1,20 \pm 0,07$ ), circunferência da cintura ( $92 \pm 12$ ) m e relação cintura/altura ( $0,58 \pm 0,7$ ). Também foi observado um aumento nos seguintes indicadores de resistência insulínica: insulina de jejum ( $15,8 \pm 7,7$ ) mμI/mL, razão entre glicemia de jejum/insulina de jejum ( $12,3 \pm 8,4$ ) e QUICK ( $0,36(\pm 0,04)$ ). As pacientes apresentaram ainda menores valores de HDL-colesterol ( $38 \pm 11$ ) mg/dL e aumento nos triglicérides ( $178 \pm 47$ ) mg/dL, caracterizando um perfil lipídico de risco cardiovascular.

#### **Tabela1. Parâmetros antropométricos e bioquímicos das mulheres com SOP.**

Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão e percentis 25 e 75. SOP= síndrome dos ovários policísticos; HOMA-IR= homeostasis model assessment –insulin resistance; G/I: razão entre glicemia de jejum/insulina de jejum; QUICKI: quantitative-insulin-sensitivity check índice; IMC: índice de massa corpórea; hsCRP= proteína c reativa ultrasensível; Hba: hemoglobina glicosilada; índice LAP (lipid accumulation product); índice C: índice de conicidade Fonte: Dados da pesquisa.

Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão e percentis 25 e 75. SOP= síndrome dos ovários policísticos; HOMA-IR= homeostasis model assessment –insulin resistance; G/I: razão entre glicemia de jejum/insulina de jejum; QUICKI: quantitative-insulin-sensitivity check índice; IMC: índice de massa corpórea; hsCRP= proteína c reativa ultrasensível; Hba: hemoglobina glicosilada; índice LAP (lipid accumulation product); índice C: índice de conicidade Fonte: Dados da pesquisa

Parâmetros	Média ( $\pm$ DP)	Mediana (Percentil 25; Percentil 75)	Referencias
Idade (anos)	26( $\pm$ 6)	25(22; 32)	-
IMC ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	34,5( $\pm$ 5,7)	33(28,1;35,2)	18,5–24,9
Índice C	1,20( $\pm$ 0,07)	1,18(1,16; 1,25)	$\geq$ 1,18
Circunferência da Cintura (CC) (m)	92( $\pm$ 12)	93(84; 100)	< 88
Relação cintura- estatura (RCE)	0,58( $\pm$ 0,7)	0,58(0,52; 0,63)	$\geq$ 0,53
Colesterol Total (mg/dL)	155( $\pm$ 36)	157(132; 177)	$\leq$ 200
Colesterol HDL (mg/dL)	38( $\pm$ 11)	37(32,5; 41,5)	$\geq$ 50
Colesterol LDL (mg/dL)	87( $\pm$ 46)	89(72; 118)	< 100
Triglicérides (mg/dL)	178( $\pm$ 47)	160(96; 157)	< 150
Glicemia de Jejum (mg/dL)	76( $\pm$ 11)	74(67; 82)	< 99
Glicemia 120 mim (mg/dL)	111( $\pm$ 31)	110(84; 127)	< 140
Insulina Jejum ( $\mu\text{U}/\text{mL}$ )	15,8( $\pm$ 7,7)	14,9(4,6; 12,7)	> 12
HbA (%)	6,4( $\pm$ 1,4)	6,2(5,3; 7,5)	5,0 - 8,0
HOMA	1,88( $\pm$ 1,5)	1,29(0,83; 2,68)	> 2,71
QUICK	0,36( $\pm$ 0,04)	0,36(0,32; 0,39)	< 0,333
G/I	12,3( $\pm$ 8,4)	10,5(6,3; 15,1)	< 6,4
hsCRP (mg/L)	154,7 ( $\pm$ 19,33)	154.75(70,4; 274,6)	< 6,0

Os indicadores de obesidade abdominal também são importantes marcadores na predição da inflamação na SOP (Dekkers et al, 2011; Costa et al, 2012; Romano et al, 2011). Em nosso estudo,



foi possível comprovar esses dados por meio da significativa associação apresentada entre os indicadores de obesidade abdominal e a hsCRP, podendo ter como consequência aumento do risco de DCV (Stumvoll et al, 2000; Escobar-Morreale et al, 2014).

Alterações no metabolismo da glicose são características da obesidade e apresentam-se ainda mais acentuadas na SOP (Escobar-Morreale et al, 2004; Dandona et al, 2004; Norman et al, 2002). Pesquisas sugerem que a glicemia de jejum, isoladamente, não é um parâmetro confiável para o diagnóstico da Intolerante a glicose na SOP, pois a maioria das mulheres com SOP são pré-diabéticas apresentando glicemia de jejum normal (Pontes et al, 2012; Pitanga e Lessa, 2006). Esta afirmação corrobora os nossos achados, pois todas as pacientes avaliadas apresentaram esta condição com média 76 ( $\pm 11$ ), dentro dos valores de normalidade, bem como a glicemia pós- TOTG 111( $\pm 31$ ) e a HbA 6,4( $\pm 1,4$ ). A insulina apresentou valores elevados 15,8( $\pm 7,7$ ) e obteve um alto desvio padrão, caracterizando hiperinsulinemia em alguns casos. Este padrão também é demonstrado por diversos estudos, nos quais as pacientes obesas com SOP possuem uma tolerância normal à glicose, no entanto, são mais resistentes a insulina quando comparadas a mulheres obesas sem a síndrome (Martins et al, 2007). A hiperinsulinemia pode ocorrer em resposta ao aumento dos níveis de glicose no sangue e também pode ser causada por uma redução da depuração de insulina que está presente em indivíduos com RI (Akamine et al, 2010). Portanto, na SOP, hiperinsulinemia de jejum é o resultado de uma combinação de um aumento da secreção de insulina basal e diminuição da depuração hepática de insulina (Akamine et al, 2010; Pontes et al, 2012; Pitanga e Lessa, 2006). Nossos resultados mostraram que os parâmetros de avaliação da resistência insulínica, QUICK, G/I e a insulina de jejum foram significativamente mais elevados nas mulheres com SOP. Não há consenso na literatura sobre a influência da obesidade sobre essas alterações metabólicas, já que as pacientes com SOP magras também podem apresentar RI (Pontes et al, 2012). O excesso de gordura corporal tem um efeito negativo sobre a sensibilidade à insulina por estimular a produção endógena de glicose basal e, conseqüentemente, gerando uma hiperinsulinemia compensatória (Progress, 1995; Akamine et al, 2010; Geloneze et al, 2005). No entanto, alguns autores afirmam que a RI e a hiperinsulinemia podem ocorrer na SOP independente da obesidade associada (Nandi et al, 2014; Akamine et al, 2010; Dandona et al, 2004; Geloneze et al, 2005).

As concentrações de glicose no sangue de pacientes com SOP podem causar um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio pelas células mononucleares, podendo atuar como um importante fator para a modulação da liberação de TNF -  $\alpha$ , desempenhando um papel importante para o desenvolvimento da RI e do hiperandrogenismo através ativação do NF-kB (fator nuclear kappa B) e o consequente aumento na transcrição do gene TNF -  $\alpha$ , caracterizando a SOP como um estado pró-inflamatório (Pitanga e Lessa, 2006). A inflamação foi estabelecida nas mulheres avaliadas através de um aumento significativo nos níveis de hsCRP, confirmando o estado inflamatório característico desta síndrome (tabela 1) (Geloneze et al, 2005; Legro et al, 2014) . A hsCRP é uma proteína de fase aguda sintetizada pelo fígado em resposta a IL -6 e TNF -  $\alpha$ , que desempenha um papel direto na promoção componentes inflamatórios que podem contribuir para o desenvolvimento e progressão da aterosclerose, com ações inibitórias sobre a angiogênese, uma característica que faz com que seja um parâmetro importante para avaliar o risco cardiovascular da SOP (Pontes et al, 2012)

No tocante da correlação entre a inflamação e os parâmetros de avaliação da intolerância à glicose e resistência insulínica observamos que todos os parâmetros de resistência à insulina e a

glicemia aos 120mim apresentaram correlações positivas e estatisticamente significativas com a proteína c reativa ultrasensível, que foi o parâmetro escolhido para avaliação da inflamação neste grupo de pacientes (tabela 2).

**Tabela 2. Correlação entre a inflamação e os parâmetros intolerância a glicose e resistência insulínica em mulheres obesas com SOP.**

\*\*\* Nível de significância 0.00;\*\* Nível de significância 0.01;\* Nível de significância 0.05 pelo teste de correlação de Pearson. SOP= síndrome dos ovários policísticos; hsCRP= proteína c reativa ultrasensível; -IR= homeostasis model assessment –insulin resistance; G/I: razão entre glicemia de jejum/insulina de jejum; QUICKI: quantitative-insulin-sensitivity check índice Fonte: Dados da pesquisa.

Mulheres com SOP (n=50)		Glicemia de jejum.	Glicemia 120 mim	Insulina	G/I	Homa	Quick
hsCRP	<i>r</i>	0,338	0,365	0,508	0,452	0,50	-0,499
	<i>p</i>	0,17	0,01*	0,000***-	0,00**	0,01*	0,000***

Todos os indicadores antropométricos de obesidade central apresentaram correlações positivas e estatisticamente significativas com a proteína c reativa ultrasensível, com exceção da circunferência da cintura (tabela 3).

**Tabela 3. Correlação entre a inflamação e os indicadores antropométricos de obesidade central em mulheres obesas com SOP.**

Mulheres com SOP (n=50)		CC	RCE	LAP	Índice C
hsCRP	<i>r</i>	0,136	0,364	0,392	-0.426
	<i>p</i>	0,35	0,01*	0,00**	0,00**

Em 2011, o HU. W, et al observaram níveis elevados de PCR associados com HOMA-IR em pacientes com SOP quando comparadas com controles saudáveis (Geloneze et al, 2005), resultados semelhantes também foram relatados por ROLDAM et al., 2012 (Legro et al, 2014). Nossos resultados corroboram com os achados destes autores, pois também encontramos correlações positivas e estatisticamente significativas entre a hsCRP e todos parâmetros de avaliação da RI, com exceção apenas da glicemia de jejum.

#### 4. CONCLUSÃO



Os resultados deste estudo contribuem para estabelecer a associação entre a RI e o estado inflamatório na SOP, bem como a influência da obesidade nas alterações metabólicas características da síndrome. No entanto, são necessários mais estudos comparando pacientes com e sem SOP associada ou não à obesidade, a fim de compreender o mecanismo preciso que envolve as inúmeras características que fundamentam esta doença complexa.

## 5. REFERÊNCIAS

- AKAMINE E.H.; MARÇAL A.C.; CAMPOREZ J.P.; HOSHIDA M.S.; CAPERUTO L.C.; BEVILACQUA E.; CARVALHO C.R.O. Obesity induced by high-fat diet promotes insulin resistance in the ovary. *Journal of Endocrinology*, v.206, p.65–74, 2006.
- AZZIZ R.; MARIN C.; HOQ L.; BADAMGARAV E.; SONG P. Health care-related economic burden of the polycystic ovarysyndrome during the reproductive life span. *J Clin Endocrinol Metab*; v.90, p.4650-8; 2005.
- CARMINA E.; LOBO R. Use of fasting blood to assess the prevalence of insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril [Internet]*. 2004 [cited 2014 May 16];82(3):661–5. Available from: <http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf>
- COSTA E.C.; SÁ J.C.; SOARES E.M.; LEMOS T.M.; MARANHÃO T.M.; AZEVEDO GD. Anthropometric indices of central obesity how discriminators of metabolic syndrome in Brazilian women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol*. Jan; v.28, n.1; p.12-5, 2012
- DANDONA P.; ALJADA A.; CHAUDHURI A.; MOHANTY P. Endothelial dysfunction, inflammation and diabetes. *Rev Endocr Metab Dis*.; v.5, p.189-97; 2004.
- DEKKERS O.M.; ROMIJN J.A.; DIEBEN S.W.; HELMERHORST. PCOS, coronary heart disease, stroke and the influence of obesity: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. V.17, n.4, p.495-500, 2011.
- ESCOBAR-MORREALE H.F.; BOTELLA-CARRETERO J.I.; VILLUENDAS G.; SANCHO J; SAN MILLAN J.L. Serum interleukin-18 concentrations are increased in the polycystic ovary syndrome: relationship to insulin resistance and to obesity. *J Clin Endocrinol Metab*., v. 89, p. 806–811, 2004.
- GELONEZE B; REPETTO E.M.; GELONEZE S.R.; TAMBASCIA M.A.; ERMETICE M.N. The threshold value for insulin resistance (HOMA-IR) in an admixed population IR in the Brazilian Metabolic Syndrome Study. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005.
- LEGRO R.S.; KUNSELMAN A.R.; DODSON W.C.; DUNAIF A. Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *J Clin Endocrinol Metab*. V.84; p.165–169, 1999
- MARTINS W.P.; SANTANA L.F.; NASTRI C.O.; FERRIANI R.A.; SÁ M.F.S.; REIS R.M. Agreement among insulin sensitivity indexes on the diagnosis of insulin resistance in polycystic ovary syndrome and ovulatory women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. V.133, n.2, p.203-7; 2007.
- NANDI A; CHEN Z; PATEL R; PORETSKY L. Polycystic Ovary Syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am*. Elsevier Inc; Mar; v.43, n.1, p.123–47; 2014.
- NORMAN R.J.; DAVIES M.J.; LORD J; MORAN L.J. The role of lifestyle modification in polycystic ovary syndrome. *Trends Endocrinol Metab*. Aug; v.13, v.6;p. 251–7, 2002.
- PIMENTA W DE P.A; PONTES A. Resistência à insulina em mulheres com síndrome dos ovários policísticos: relação com as variáveis antropométricas e bioquímicas. CEP [Internet]. [cited 2014. May 17]; Available from: <http://www.scielo.br/pdf/rbgo/v34n2/a06v34n2.pdf>
- PITANGA F.J.G.; LESSA I. Indicadores antropométricos de obesidade como discriminadores do risco coronariano elevado em mulheres. *Rev. Bras. Cineantropom Desempenho Hum*. V.8, n.1, p. 14-21, 2006.
- PONTES A.G.; REHME M.F.B.; MARTINS A.M.V.C.; MICUSSI M.T.A.B.C.; MARANHÃO T.M.O.; PIMENTA W.P.; PONTES A. Resistência à insulina em mulheres com síndrome dos ovários policísticos: relação com as variáveis antropométricas e bioquímicas. *Rev Bras Ginecol Obstet*; v.34, p.74-79; 2012..
- Progress M, Syndrome PO. Review article. V.333, n.13; p.853–61; 1995.



ROMANO L.G.M.; BEDOSCHI G.; MELO A.S.; ALBUQUERQUE F.O.; SILVA A.C.J.S.R.; FERRIANI R.A.; NAVARRO P.A. Anormalidades metabólicas em mulheres com síndrome dos ovários policísticos: obesas e não obesas. *Rev Bras Ginecol Obstet.* v.33, n.6, p.310-6, 2011.

STUMVOLL M.; MITRAKOU A.; PIMENTA W.; JENSSEN T.; YKI-JARVIEN H.; VAN HAEFTEN T. Use of the oral glucose tolerance test to assess insulin release and insulin sensitivity. *Diabetes Care.* V.23, n3, p.295-301; 2000.

The Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome(PCOS). *Hum Reprod.* V.19:n.41-7, 2004.

ZHAO Y.; FU L.; LI R.; WANG L-N.; YANG Y.; LIU N-N, et al. Metabolic profiles characterizing different phenotypes of polycystic ovary syndrome: plasma metabolomics analysis. *BMC Med* [Internet]. 2012 Jan [cited 2014 Apr 17];10:153; 2014.

WHITAKER KN. Polycystic ovary syndrome: an overview. *J Pharm Pract.* V.24, n.1, p.94-101; 2011.

TEEDE HJ, HUTCHISON S, ZOUNGAS S, MEYER C. Insulin resistance, the metabolic syndrome, diabetes, and cardiovascular disease risk in women with PCOS. *Endocrine.* V.30, n.1; p.45-53, 2006.

## 6. AGRADECIMENTOS

À Capes, à UFRN, à FAPERN, à equipe do Laboratório de Pesquisa em Bioquímica Clínica e Experimental, à Ana Celly Souza Santos (in memoriam).



**POLÍTICAS PÚBLICAS  
EM SAÚDE**

ÁREA DE SUBMISSÃO: POLÍTICAS PÚBLICAS EM SAÚDE – PP 1

## **REDUÇÃO DE CUSTOS NO SETOR DE NUTRIÇÃO DE UM HOSPITAL REGIONAL A PARTIR DA INTERVENÇÃO DO NÚCLEO DE ECONOMIA DA SAÚDE**

B.M.B de SOUZA<sup>1</sup>, A.A.PATRIOTA<sup>1</sup>, I.E.R.COSTA<sup>2</sup>, R.S. LEMOS<sup>2</sup>, P.R.L.G. PORTELLA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Núcleo de Economia da Saúde do Hospital Regional Dom Moura, Garanhuns, Pernambuco

<sup>1</sup> Núcleo de Economia da Saúde do Hospital Regional Dom Moura, Garanhuns, Pernambuco

<sup>2</sup> Núcleo Estadual de Economia da Saúde, Secretaria Estadual de Pernambuco

<sup>2</sup> Núcleo Estadual de Economia da Saúde, Secretaria Estadual de Pernambuco

E-mail para contato: brunasouza77@hotmail.com

*RESUMO – Trata-se de um relato de experiência das ações realizadas pelo Núcleo de Economia à Saúde do Hospital Regional Dom Moura no processo de implantação da gestão de custos no hospital. O objetivo é descrever a experiência do processo de intervenção do NES como estrutura capaz de fornecer informações básicas de custos, possibilitar a criação de indicadores de desempenho, mensuração de falhas de processo que incorrem custos irrecuperáveis e por fim, subsidiar na tomada de decisão. Foi realizado mapeamento dos processos de trabalhos instituídos no Centro de Custo Nutrição, recadastramento dos servidores do hospital para a liberação de refeições, reuniões com a empresa que fornece a alimentação para adequação do sistema de informação para as necessidades do núcleo, identificado os nós críticos para a obtenção dos dados, implantação de planilhas de controle. Como resultados verificou-se uma redução nos custos do Centro de Custo Nutrição do hospital. A experiência permitiu conhecer as peculiaridades do Centro de custos nutrição e planejar orientações compreensíveis e significativas aos profissionais de saúde responsáveis pelo setor.*

*Palavras-chave: Economia da Saúde; Controle de Custos; Custos Hospitalares; Política de Saúde.*

*ABSTRACT – This is an experience report the actions taken by the Economics Center at the Regional Hospital Health Dom Moura in cost management of the implementation process at the hospital. The objective is describe the experience of NES intervention process as a structure capable of providing basic information costs, enabling the creation of performance indicators, the measurement of process failures incurred sunk costs and finally, support in decision making. Was conducted*

*mapping work processes instituted in cost Nutrition Center, re-registration of the hospital servers for the release of meals, meetings with the company that supplies the power to adapt the information system to the core requirements, identified the critical nodes to obtain the data, implementation of control spreadsheets. As a result there was a reduction in costs Cost of Nutrition Center of the hospital. The experience allowed us to know the center of the peculiarities of nutrition costs and plan understandable and meaningful guidance to health professionals responsible for the sector.*

*Keywords: Health Economics; Cost Control; Hospital costs; Health policy.*

## **1. INTRODUÇÃO**

A Economia da Saúde integra as teorias econômicas, sociais, clínicas e epidemiológicas, a fim de estudar os mecanismos e fatores que determinam e condicionam a produção, a distribuição, o consumo e o financiamento dos serviços de saúde, constituindo-se instrumento indispensável para a gestão em saúde e alocação de recursos pela orientação que oferece à tomada de decisão em busca de alternativas mais eficientes e racionais (HERRERA et al., 2002).

Na lógica de aperfeiçoamento da gestão do SUS, os Núcleos de Economia da Saúde (NES) constituem-se em pontos focais de disseminação das ações de Economia da Saúde (BRASIL, 2012). E em Pernambuco, a Política de Economia da Saúde está institucionalizada através de instâncias de referência: Núcleo de Economia da Saúde de Pernambuco (NES-PE), Núcleo de Economia da Saúde Hospitalares (NES-Hosp) e Comitê Estadual de Economia da Saúde (SES, 2016).

Os NES-Hosp têm como principal atividade a gestão de custos, além de fomentar a prática de melhoria dos processos de trabalho nos hospitais apontando para a equipe gestora aspectos que podem qualificar as práticas desenvolvidas no hospital, visando a melhoria da atenção à saúde prestada pelos usuários (SES, 2016).

Em 2015 foi iniciada a implantação da gestão de custos em oito hospitais de Pernambuco, entre eles o Hospital Regional Dom Moura (HRDM) que está localizado na cidade de Garanhuns, sendo referência para os 21 municípios que compõem a V Região de Saúde, com mais de 500 mil habitantes (SES, 2015).

A partir da implantação do NES no HRDM, em novembro de 2015, foram estabelecidos os profissionais que seriam os representantes do NES e os respectivos centros de custos da Instituição. Após essa etapa, o núcleo desenvolveu suas ações no sentido de levantar os dados referentes a produção e aos custos relativos aos centros de custos que evidenciou falhas de processo que poderiam refletir no aumento dos gastos da Unidade. Nesse contexto, a primeira intervenção do núcleo iniciou-se no setor de nutrição e dietética, setor este que representa uma das principais despesas da Unidade Hospitalar.

Sendo assim, este relato tem como objetivo descrever a experiência do processo de intervenção do NES como estrutura capaz de fornecer informações básicas de custos, possibilitar a criação de indicadores de desempenho, a mensuração de falhas de processo que incorrem custos irre recuperáveis e por fim, subsidiar na tomada de decisão.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de pesquisa descritiva que consiste em descrever características de uma determinada população ou fenômeno ou o estabelecimento de relações entre as variáveis. O objeto neste sentido não é reduzido à variável única, mas é estudado em sua complexidade e totalidade e em seu contexto diário (FLICK, 2004).

Utilizou-se como estratégia de pesquisa, um relato de experiência ocorrido no serviço de nutrição e dietética do Hospital Regional Dom Moura (unidade de análise). Um relato de experiência para Elias (2014), “Faz parte dos gêneros pertencentes ao domínio social da memorização e documentação das experiências humanas, situando-as no tempo”.

Foi realizado o acompanhamento das despesas com refeição no HRDM nos meses de janeiro a julho de 2016 sendo as refeições produzidas de responsabilidade de uma empresa terceirizada que deve seguir um padrão estabelecido no contrato. São produzidas em torno 25.300 refeições destas, 11.000 são para pacientes, 7.000 para acompanhantes e 7.300 para servidores.

O instrumento utilizado foi uma planilha para o registro do quantitativo de dietas dispensadas para pacientes, acompanhantes e funcionários de acordo com os centros de custos existentes na Unidade.

Após um mês de acompanhamento, foi observado um quantitativo excessivo de refeições de funcionários liberados para alimentação no refeitório através do “Cartão Master”, que é utilizado para liberação da refeição quando há problemas no cadastro do funcionário, sem a devida alocação nos centros de custos. Portanto, não seria possível estimar os valores gastos com refeições por cada centro assim como, impede a identificação de possíveis inconsistências. Além disso, observou-se uma grande quantidade de liberação de dietas extras, elevando os custos com refeições deste hospital.

Diante desta problemática, a partir do mês de março, o NES iniciou algumas ações no sentido de organizar os processos de trabalho do setor de nutrição, a fim de melhor apurar os custos e também reduzi-los. A situação foi apresentada ao gestor do hospital, e também realizadas reuniões com as nutricionistas do serviço e com o responsável pela empresa fornecedora; o sistema de cadastramento para acesso dos funcionários ao refeitório foi revisado, identificando o nome do profissional e o centro de custo que trabalha; e foi criada uma planilha específica de dietas liberadas por meio do Cartão Master, registrando nome do funcionário, tipo de problema com o cadastro e seu respectivo setor.

E ainda, foram pactuadas medidas com a gestão do hospital a liberação de refeições extras apenas em casos excepcionais evitando que pessoas que não fossem servidores da unidade tivessem acesso as refeições indevidamente.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise das principais atividades relevantes à implantação do NES-HRDM, a fim de conhecer os custos do setor de nutrição, e o impacto deste na instituição foi estabelecido após a realização de um diagnóstico situacional e o mapeamento dos processos de trabalho existentes.

Neste sentido, após a revisão, acompanhamento e soluções dos principais problemas no cadastramento dos funcionários houve uma redução no registro de dietas sem a devida alocação nos centros de custos, entre os meses de março a julho, conforme mostra a figura 1:

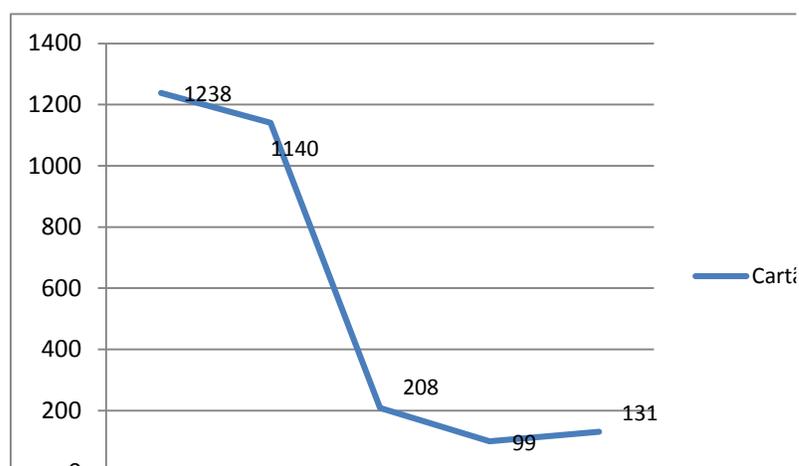


Figura 1 – Registro das dietas de funcionários sem alocação nos centros de custos, nos meses de março a julho de 2016.

Através da figura 2, observa-se queda de 14% nos gastos com refeições entre os meses de março a junho e uma elevação dos gastos entre junho e julho de 2016. Esta elevação justifica-se pela diminuição importante da temperatura incorrendo no aumento de problemas respiratórios, principalmente em crianças e idosos; e a ocorrência do principal evento do município “Festival de Inverno”, que atrai milhares de turistas, como consequência um grande fluxo de pessoas na cidade e que usam os serviços da Unidade.

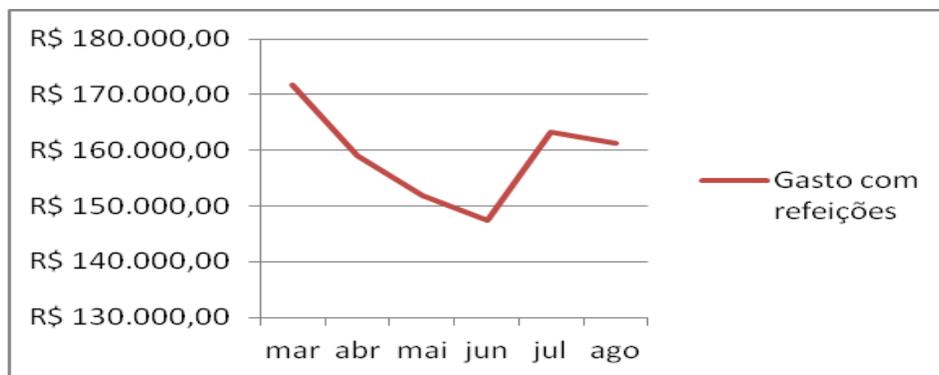


Figura 2 – Gastos com refeições no HRDM, de março a agosto de 2016.

Estima-se que com novas estratégias instituídas na rotina do centro de custo nutrição e nos demais centros de custos, haja ainda uma maior redução dos gastos.

#### 4. CONCLUSÃO

A implantação da gestão de custos em um hospital requer não apenas a identificação dos custos, mais também a identificação dos processos de trabalhos instituídos nos centros de custos, a forma como é registrado as informações e também a identificação de atores chaves que possam contribuir na efetivação dessa estratégia. Objetiva-se não apenas qualificar os gastos realizados

pelo hospital, como também empoderar o gestor no processo de pactuação de melhorias efetivas a ser destinado ao estabelecimento de saúde.

Conhecer o verdadeiro custo de cada serviço torna-se essencial considerando que os recursos são escassos. Nesse aspecto, as equipes dos NES-hosp tem um papel crucial em promover a mudança da cultura institucional com vistas ao uso racional dos recursos públicos e a implementação das ações que concorrem para uma maior qualidade no uso e destinação dos recursos existentes.

Essa experiência está sendo replicada para outros hospitais públicos sob administração direta da rede estadual, além de promover discussões do controle junto a Secretaria Estadual de Saúde, com base em dados da realidade.

O processo vivenciado pela equipe NES-HRDM está sendo bastante rico e trazendo a tona vários aspectos que perpassam pela gestão de processos de trabalho, relação pública- privada, no caso em tela com a empresa que fornece a alimentação, entendimentos sobre a importância do controle de gastos e monitoramento das ações realizadas.

## **5. REFERÊNCIAS**

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Núcleos de Economia da Saúde. Série Gestão e Economia da Saúde, volume 1, Brasília – DF, 2012

ELIAS, Leila Márcia. Como escrever um bom Relato de Experiência em “Implantação de Sistema de Informações de Custos no setor público”. In: I Seminário Regional de informação de custos e qualidade do gasto no setor público – Região Norte. FIEBA. Belém, 2014.

FLICK, U. Uma introdução à pesquisa qualitativa. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2004.

HERRERA, Manuel Collazo et al. La economía del la salud:¿debe ser de interes para Elcampo sanitario? Rev. Panam. Salud Publica, Washington, v. 12, n. 5, p. 359-365, 2002.

SES. SECRETARIA DO ESTADO DE PERNAMBUCO. 2016 Disponível: <<http://portal.saude.pe.gov.br/programa/secretaria-executiva-de-coordenacao-geral/economia-da-saude>> acesso em 15 de outubro de 2016.

SES. SECRETARIA DO ESTADO DE PERNAMBUCO. 2015 Disponível: <<http://portal.saude.pe.gov.br/unidades-de-saude-e-servicos/secretaria-executiva-de-atencao-saude/hospital-regional-dom-moura>> acesso em 15 de outubro de 2016.



ÁREA DE SUBMISSÃO: POLÍTICAS PÚBLICAS EM SAÚDE – PP 2

## IMPLANTAÇÃO DOS NÚCLEOS DE ECONOMIA DA SAÚDE NOS HOSPITAIS ESTADUAIS – O CASO DE PERNAMBUCO, BRASIL, 2016

I. E. R. da COSTA<sup>1</sup>, R. S. LEMOS<sup>1</sup>, P. R. L. G. PORTELLA<sup>1</sup>, G. E. V. B. PUÇA<sup>1</sup> e A. C. C. MATOS<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Núcleo Estadual de Economia da Saúde, Secretaria Estadual de Pernambuco

<sup>2</sup> Secretaria Estadual de Pernambuco

E-mail para contato: nucleodeeconomia.pe@gmail.com

*RESUMO – Relato de Experiência que teve como objetivo descrever o percurso adotado pelo Núcleo Estadual de Saúde para institucionalização da Política de Economia da Saúde no âmbito da Secretaria Estadual de Saúde. Inicialmente, a estratégia adotada tem como objetivo a implantação da Gestão de Custos nos Hospitais Públicos de Administração Direta no período de 2014 - 2016, ao todo pretende-se implantar 14 unidades hospitalares até 2018. As ações foram implementadas a partir de 2014, por meio de ações desenvolvidas nos hospitais e incluídas como meta prioritária de Governo. Atualmente, 4 unidades apresentam 75% das ações implantadas, restando apenas o treinamento no APURASUS e a geração de relatórios, 6 estão com mais de 50% de suas ações em andamento e 4 ainda não iniciaram a implantação. Por fim espera-se com a implantação da Gestão de Custos nas unidades estaduais qualificando os processos de trabalho de forma a subsidiar a tomada de decisão dos gestores.*

*Palavras-chave: Política de Saúde; Custos Hospitalares; Controle de Custos; Economia da Saúde.*

*ABSTRACT – Experience Report that aimed to describe the route adopted by the State Health Center for institutionalization of Health Economics Policy under the State Health Department. Initially, the strategy adopted aims the implementation of Cost Management in Public Hospitals Direct administration in the 2014 period - 2016 as a whole is intended to establish 14 hospitals by 2018. the shares were implemented from 2014 through actions undertaken in hospitals and included as a priority target of the Government. Currently, four units have 75% of the actions implemented, leaving only training in APURASUS and reporting, 6 are over 50% of its shares in progress and 4 have not started the implementation. Finally it is expected with the implementation of cost management in state units qualifying work processes in order to support decision*



*making by managers.*

*Keywords.* Health policy; Hospital costs; Cost Control; Health Economics.

## 1. INTRODUÇÃO

A elevação dos gastos e custos com a assistência à saúde decorrente do aumento e envelhecimento populacional, surgimento de novas doenças, aumento da prevalência de doenças crônicas e do trauma, complexidade tecnológica, extensão da cobertura e aumento do grau de empoderamento do cidadão em relação a seus direitos estão obrigando aos Sistemas de Saúde a adotarem instrumentos de gestão econômica que auxiliem a sustentação e manutenção das organizações de saúde (Dallora; Forster, 2008).

No Brasil, a gestão de custos no Sistema Único de Saúde (SUS) tornou-se fundamental para garantir maior eficiência na aplicação dos recursos e sustentabilidade do sistema por estabelecer processos e o consumo adequado de recursos que privilegiem a qualidade, construindo padrões de referência que possibilitem remuneração mais apropriada das ações e dos serviços públicos de saúde (Brasil, 2013).

A gestão de serviços de saúde é uma atividade complexa e se constitui numa prática administrativa que tem a finalidade de otimizar o funcionamento das organizações de forma a obter o máximo de eficiência (relação entre produtos e recursos empregados), eficácia (atingir os objetivos estabelecidos) e efetividade (resolver os problemas identificados). Nesse sentido, a gestão de custos tem um papel fundamental para subsidiar o gestor na condução do funcionamento dos serviços para a otimização dos recursos existentes (Tanaka, 2012).

Além disso, trata-se de uma obrigação legal que desde 1964 com a Lei nº 4320/1964 já havia a preocupação com a contabilidade de custos na administração pública assim como outros dispositivos legais como a Lei Complementar nº 101/2000 – Lei de Responsabilidade Fiscal, Decreto-Lei nº 200/1967, Decreto nº 93.872/1986, Portaria nº 406/2011) que ao longo do tempo vem ressaltando a necessidade dos gestores introduzirem em suas instituições a cultura da evidenciação dos custos visando a otimização dos gastos públicos.

O Ministério da Saúde, por meio do Departamento de Economia da Saúde, Investimentos e Desenvolvimento (DESID), firmou em 2011, convênio com a Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco com o objetivo de incentivar o uso de ferramentas de Economia da Saúde na gestão, para qualificar os processos de planejamento, orçamento e avaliação de políticas, bem como implantar o Programa Nacional de Gestão de Custos (PNGC) e, ainda, implementar o Projeto de Qualificação das Redes de Atenção à Saúde (QualiSUS – Rede).

O Governo de Pernambuco, por meio da Secretaria Estadual de Saúde- SES/PE, entendendo a importância dessa iniciativa como estratégia para implementação do SUS de Pernambuco, vem fomentando a implementação da Política Estadual de Economia da Saúde tendo como eixo prioritário a Implantação da Gestão de Custos nas Unidades Hospitalares como meta de governo.



Para a efetiva consolidação do Sistema Único de Saúde – SUS, torna-se fundamental investir na implantação de ações que propiciem mensuração dos custos dos serviços de saúde, potencializando o desempenho dos mesmos, o controle e a qualificação dos gastos públicos.

Nesse sentido, a Secretaria de Saúde de Pernambuco – SES/PE vem trabalhando na implantação da política estadual de Economia da Saúde - ECOS. O arranjo adotado pela gestão visa à construção de uma política que envolva gestores, trabalhadores da saúde e as Instituições de Ensino. Para tanto, instituiu-se através de portaria, os Núcleos de Economia da Saúde Estadual (NES-PE) e Hospitalares (NES-HOSP) e o Comitê Estadual de Economia da Saúde. São formados por representantes da SES/PE, trabalhadores dos hospitais e professores. A missão dessas instâncias de referência é a consolidação da ECOS no Sistema de Saúde Estadual, tendo-se como estratégia a educação permanente em saúde através da qualificação dos trabalhadores da saúde na perspectiva do trabalho como campo de formação no nosso cotidiano.

As ações desenvolvidas pelo **Núcleo de Economia da Saúde (NES-PE)** visam promover a disseminação das ações de Economia da Saúde no Estado e em municípios de grande porte, com vistas a subsidiar os gestores locais no processo de tomada de decisão pela aplicação do conhecimento e das ferramentas de Economia da Saúde. Atuando nos seguintes eixos: Elaboração de estudos econômicos em saúde, implementação da gestão de custos nos hospitais estaduais sob administração direta, apoio ao Estado e municípios na declaração dos dados no Sistema de Informação sobre Orçamentos Públicos em Saúde (SIOPS), apoio à alimentação do Banco de Preços em Saúde (BPS) para promover economicidade em compras de insumos e equipamentos para a saúde, apoio à gestão na elaboração e execução do orçamento da saúde. O NES-PE está institucionalmente ligado a Diretoria Geral de Informações Estratégicas (DGIE) desde 2015.

**Os Núcleos de Economia da Saúde (NES-HOSP)** tem como principal atividade a gestão de custos, além de fomentar a prática de melhoria dos processos de trabalho nos hospitais apontando para a equipe gestora aspectos que podem qualificar as práticas desenvolvidas no hospital visando a melhoria da atenção à saúde prestada pelos usuários.

**O Comitê Estadual de Economia da Saúde (CEES-PE)** é formado por grupo de experts de instituições de ensino e representantes da SES que tem como objetivo fomentar e contribuir para o fortalecimento da Política Estadual de Economia da Saúde por meio da difusão do uso de conceitos, métodos e técnicas, vinculados à temática da economia da saúde bem como, estudos e pesquisas na área de economia da saúde; acompanhamento das ações da área de economia nas unidades de saúde, proposição de conteúdos programáticos para qualificação dos profissionais da rede SUS-PE, contribuir no desenvolvimento e implementação de programas vinculados à saúde, cujo funcionamento demonstre a aplicabilidade da economia.

O NES-PE e o NES-HOSP elaboraram Planos de Ação contendo objetivos estratégicos, as ações, indicadores, metas e os responsáveis, que são acompanhados mensalmente durante as reuniões e ou encontros realizados. As pautas desses encontros são elaboradas pelos integrantes dos núcleos trazendo sempre aspectos de ordem prática, como também temas de estudo apontados pelo grupo. Essa experiência vem permitindo além da efetiva aproximação do NES-HOSP, a troca de



experiências, apresentação dialogada de saberes, pactuações, novos acordos e monitoramento das ações.

Ficou estabelecido que as unidades hospitalares que deveriam participar da implantação de NES-HOSP seriam os que estão sob administração direta. Tendo como meta a implantação de 02 (dois) Hospitais por semestre. Espera-se concluir a implantação de 06 (seis) unidades HBL, HAM, HRJFS, HJN, HRDM, HCP no ano de 2016, 06 (seis) unidades HREC, HRBC, HPAM, HOF, HR, HRIS no ano de 2017 e HRA e HGV no ano de 2018, concluindo assim a implantação de 14 (quatorze) NES-HOSP no estado de Pernambuco.

O presente trabalho tem como objetivo descrever a experiência de Pernambuco quanto a implantação da Gestão de Custos nas unidades hospitalares sob a gestão estadual.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

Trata-se de um estudo descritivo acerca de um relato de experiência no qual buscamos pontuar o caminho adotado pelo NES-PE para a implantação de Núcleos de Economia da Saúde Hospitalares (NES-HOSP).

A primeira ação da DGIE para a implantação da Política de Gestão de custos nos hospitais foi incluir como meta de Governo a instituição dos NES-HOSP, visando fortalecer o desenvolvimento da ação na SES-PE e nos hospitais. Essa ação é acompanhada pelo Governador do estado e Secretarias de Estado. Em seguida foram realizados diálogos junto as unidades hospitalares sobre a importância da implantação da gestão de custos nos hospitais e definição dos membros que iriam compor o NES-HOSP, sendo estes indicados pela direção do hospital. Os NES-HOSP foram instituídos através da portaria nº Portaria Estadual nº 464 de 10 de dezembro de 2015. Cada um dos núcleos elaborou um plano de ação que consiste em estabelecer as ações e subações previstas para o acompanhamento de suas metas. O NES-PE estabeleceu um ranqueamento de acordo com o grau de dificuldade de execução de cada ação, a fim de realizar o monitoramento as ações para a implantação da gestão de custos nas unidades hospitalares definidas (Tabela 1).

Além dessa estratégia foram realizadas visitas técnicas, reuniões sistemáticas para troca de experiências, atualizações com vistas a capilarização do conhecimento em economia da saúde. O Estado através de convênio realizado pelo Ministério da Saúde está ofertando o curso de Economia da Saúde para servidores do nível central, das unidades hospitalares e dos municípios, o qual vem sendo ministrado pela Universidade Federal de Pernambuco.

Foi pactuado com os membros dos NES-HOSP um cronograma anual de encontros mensais, que ocorrem em a cada mês em unidades hospitalares para discussões coletivas, sobre o andamento das ações de cada unidade hospitalar, troca de experiências, além de apresentação de um dos núcleos sobre as suas experiências no processo de implantação da gestão de custos.

Nesse percurso, os NES-HOSP estão, no momento, concluindo o levantamento das informações de produção e despesa relativas a cada Centro de Custo com o objetivo de gerar

relatórios e indicadores de qualidade para empoderar o núcleo gestor na tomada de decisão.

O NES-PE a partir das dificuldades apresentadas pelos núcleos hospitalares vem discutindo junto a Secretaria Estadual de Saúde ações para melhorar a alimentação dos sistemas de informação já disponíveis nos hospitais aproximando-os ao máximo de uma estruturação por Centros de Custos hospitalares, a fim de facilitar a coleta da informação e análise pelo núcleo. Outra ação do NES-PE foi de em todas as reuniões e visitas realizadas as unidades hospitalares está sempre acompanhada por representantes da Secretaria Executiva de Atenção à Saúde a qual estão ligados as unidades. Além de solicitar a SES-PE a designação de Apoiadores Institucionais com vistas a potencializar o desenvolvimento de competências, destravar processos, e ser o articulador dentro das instituições na medida em que cria alternativas para a elaboração, implementação e execução das atividades essenciais da Gestão de Custos bem como no enfrentamento das dificuldades vivenciadas pelos integrantes dos NES-HOSP.

Tabela 01 – Distribuição percentual (Ranking) das ações para implantação de um NES-HOSP.

ETAP <sup>a</sup>	%	AÇÕES	% DE IMPLANTAÇÃO
<b>Sensibilização do nível estratégico, tático e operacional</b>			
1 <sup>a</sup>	5%	Sensibilização dos gestores para implantação do NES-HOSP	2%
		Definir os membros dos NES-Hospitalares	1%
		Definir os centros de custos	2%
<b>Estruturação dos centros de custos e coleta de dados</b>			
<b>Diagnóstico Situacional e Capacitação</b>			<b>% DE IMPLANTAÇÃO</b>
2 <sup>a</sup>	3%	Elaborar relatório Situacional	1%
		Capacitação em Gestão de Custo	2%
<b>Planilha Mãe</b>			<b>% DE IMPLANTAÇÃO</b>
3 <sup>a</sup>	15%	Alimentar a planilha mãe	15%
<b>Mapa de Item de Custo</b>			<b>% DE IMPLANTAÇÃO</b>
4 <sup>a</sup>	35%	Coletar as informações dos itens de custo	15%
		Alocar diretamente os itens de custo diretos	15%
		Utilizar os critérios de rateio coletados na planilha mãe e fazer o rateio dos custos indiretos	5%
<b>Sensibilização do nível estratégico, tático e operacional</b>			
1 <sup>a</sup>	5%	Sensibilização dos gestores para implantação do NES-HOSP	2%



	Definir os membros dos NES-Hospitales	1%
	Definir os centros de custos	2%
<b>Estruturação dos centros de custos e coleta de dados</b>		
<b>Diagnóstico Situacional e Capacitação</b>		<b>% DE IMPLANTAÇÃO</b>
2ª	3% Elaborar relatório Situacional	Continuação
	Capacitação em Gestão de Custo	Continuação
<b>Estruturação dos centros de custos e coleta de dados</b>		
<b>Planilha Mãe</b>		<b>% DE IMPLANTAÇÃO</b>
3ª	15% Alimentar a planilha mãe	15%
<b>Mapa de Item de Custo</b>		<b>% DE IMPLANTAÇÃO</b>
	Coletar as informações dos itens de custo	15%
4ª	35% Alocar diretamente os itens de custo diretos	15%
	Utilizar os critérios de rateio coletados na planilha mãe e fazer o rateio dos custos indiretos	5%

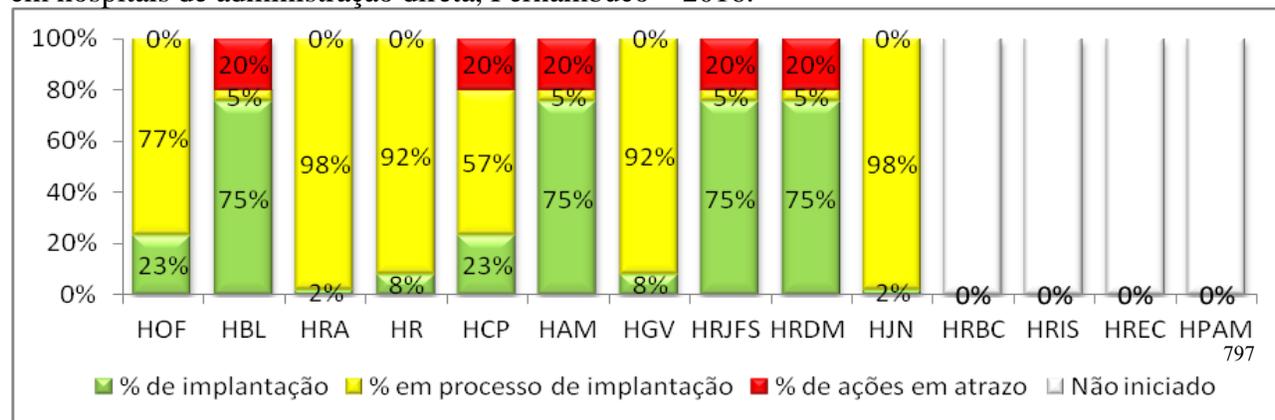
Por fim, e não menos importante foi estabelecido o monitoramento contínuo que constitui no instrumento que fornece informações para a avaliação de qualquer programa ou política de saúde a ser instituída e/ou implementada.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 – Implantação da Gestão de Custos nas Unidades Hospitalares:

O Gráfico abaixo demonstra o andamento das ações por hospital para a implantação dos custos, conforme observado, do total de hospitais estabelecidos para implantação dos NES-HOSP, 4 unidades apresentam percentual de implantação de 75%, restando apenas o treinando no APURASUS e a geração de relatórios, 6 estão com mais de 50% de suas ações em andamento e 5 ainda não iniciaram a implantação.

Gráfico 01 – Acompanhamento das ações de implantação dos Núcleos de Economia da Saúde em hospitais de administração direta, Pernambuco – 2016.





Fonte: NES-PE/DGIE/SECG

A apuração dos custos nos hospitais é um trabalho complexo, devido a própria diversidade das atividades realizadas, além de mexer com processos instituídos a longas datas. A medida que as ações são desenvolvidas, são mapeados os processos de trabalho e discutidos com os trabalhadores as suas melhorias, observa-se que há uma motivação nestes a fim de mostrar um melhor desempenho das suas atividades e reorganização de etapas do trabalho. Conforme afirma Martins (1998 p.377): “Qualquer que seja o Sistema a ser adotado, qualquer que seja o número de detalhes a sua alimentação e qualquer que seja a finalidade de sua implantação, sempre existirão problemas com a resistência do pessoal da Produção”. Sendo fundamental o apoio do gestor da unidade para o empoderamento dos membros dos NES-HOSP.

### 3.2 – Ações de Fortalecimento para a Implantação da Política Estadual de Saúde em Pernambuco:

<b>AÇÕES</b>	<b>RESULTADOS 2015 a 2016</b>
<b>Captação recursos através do Convênio com o Ministério da Saúde</b>	Valor Total R\$245.000,00 (2013)
<b>Reuniões com os NES-HOSP</b>	16 reuniões
<b>Visitas Técnicas</b>	114 visitas
<b>Oficinas de Gestão de Custos</b>	80 capacitados
<b>Apresentação de Trabalho em Congresso Internacional de ECOS</b>	02 trabalhos
<b>Apresentação de Trabalho em Congresso Nacional de ECOS</b>	01 trabalho
<b>Realização de Oficina sobre as Potencialidades da Economia da Saúde na Tomada de Decisões dos Gestores do SUS em parceria com a Abres</b>	30 participantes
<b>Especialização em Economia da Saúde</b>	18 alunos

Dentre as oficinas realizadas, a em parceria com a Abres, deixou como produto as questões apontadas, abaixo, pelos Núcleos de Economia Hospitalares as quais foram encaminhadas aos gestores da Secretaria Estadual de Saúde.

Como obstáculos referidos no âmbito da esfera política, foi feito destaque para o pouco envolvimento das direções dos hospitais no processo da implantação da gestão de custos. No âmbito da estrutura, três questões foram colocadas como relevantes: ausência de setor de custo, ou de contabilidade, no desenho organizacional dos hospitais; escassez de profissionais de contabilidade, mesmo nos hospitais onde há centros de custo; morosidade na implantação do sistema de informação nos grandes hospitais e ausência destes sistemas nos demais hospitais da rede. Em relação ao processo de trabalho, as discussões trataram aspectos relacionados a cultura organizacional dos hospitais com baixa propensão a trabalhar com custos; dificuldade de implantação de novas rotinas de trabalho; dificuldade de obter e processar informações pertinentes nos setores de ponta dos hospitais e o conhecimento incipiente em gestão de custos dos profissionais envolvidos.



As equipes NES diante do cenário acima, apresentaram sugestões para enfrentamento dos obstáculos, a saber: divulgação das informações sobre custos dos centros de custos, mesmo que preliminares - Gestão à Vista; identificação nos hospitais de um espaço físico para a instalação dos NES-Hospitalares; capacitações; realização de rodas de diálogos entre unidades sobre temas práticos da gestão de custos; fixação de pelo menos um profissional exclusivo nos NES-Hospitalares para operacionalizar o levantamento e inserção dos dados.

#### 4. CONCLUSÃO

A guisa de conclusão reitera-se que a implantação da Política de Economia da Saúde com foco, inicialmente, na Gestão de Custos, vem trazendo contribuições para o aprimoramento dos processos de trabalhos dos Centros de Custos, convidando os profissionais de saúde a reverem seus processos de trabalho e pactuarem novos processos, melhorando o controle da gestão nas unidades hospitalares, aproximando os trabalhadores aos sistemas de informação instituídos na perspectiva de qualificar o dado inserido, além de aproximar a direção do hospital da discussão de custos e da necessidade de evitar desperdícios de recursos e qualificar os gastos. Como desafios o NES-PE encontra, ainda, resistência, ou falta de entendimento e priorização de alguns diretores de hospitais, a não exclusividade dos membros do NES-HOSP, que os obriga a dividir horários/turnos com as suas outras atribuições. O conhecimento adquirido nesta experiência impulsiona o NES-PE a prosseguir neste caminho e a enfrentar novos desafios, em prol da implantação da Economia da Saúde no Estado.

#### 5. REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Saúde. Introdução à Gestão de Custos em Saúde / Ministério da Saúde, Organização Pan-Americana da Saúde. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2013. 148 p. : il. – (Série Gestão e Economia da Saúde ; v. 2).
- Lei Complementar n. 101, de 4 de maio de 2000. Estabelece normas de finanças públicas voltadas para a responsabilidade na gestão e dá outras providências. Brasília, 4 de maio de 2000; 179º da Independência e 112º da República.
- Decreto-Lei n. 200, de 25 de fevereiro de 1967. Dispõe sobre a organização de Administração Federal, estabelece diretrizes para a Reforma Administrativa e dá outras providências. Brasília, 25 de fevereiro de 1967; 146º da Independência e 79º da República
- Decreto n. 93.872, de 23 de dezembro de 1986. Dispõe sobre a unificação dos recursos de caixa do Tesouro Nacional, atualiza e consolida a legislação pertinente e dá outras providências. Brasília, 23 de dezembro de 1986; 165º da Independência e 98º da República.
- Lei n. 4320, de 17 de março de 1964. Estatui normas gerais de direito financeiro para elaboração e controle dos orçamentos e balanços da União, dos Estados, dos Municípios e do Distrito Federal. Brasília, 4 de maio de 1964; 1432 da Independência e 76º da República.
- Secretaria do Tesouro Nacional. Aprova as partes I – procedimentos contábeis patrimoniais, II – procedimentos contábeis. Portaria n. 406, de 20 de junho de 2011.
- DALLORA, M. E. L. V.; FORSTER, A. C. A importância da gestão de custos em hospitais de ensino - considerações teóricas. *Medicina*, Ribeirão Preto, v. 41, n. 2, p. 135-142, abr./jun. 2008.
- TANAKA, O.Y; TAMAKIE.M. O papel da avaliação para a tomada de decisão na gestão de serviços de saúde. *Ciênc. saúde coletiva* 17.4 (2012): 821-828.



ÁREA DE SUBMISSÃO: POLÍTICAS PÚBLICAS EM SAÚDE – PP 3

## O PROGRAMA SAÚDE DA FAMÍLIA COMO INOVAÇÃO PARA REDUÇÃO DA MORTALIDADE INFANTIL

A. L. P. MEIRA<sup>1</sup>, A. E. C. V. FERNANDES<sup>2</sup>, S. B. XAVIER<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva. Mestre em Gestão e Economia da Saúde

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica. Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Gestão e Economia da Saúde

<sup>3</sup> Universidade Federal do Vale do São Francisco, Hospital Universitário. Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Gestão e Economia da Saúde

E-mail para contato: analigiapassos@hotmail.com

*RESUMO – Evidências literárias apontam que as melhorias na expectativa de vida ao nascer ou a baixa mortalidade estão correlacionadas com o padrão econômico do país. Várias outras pesquisas identificaram, no final do século XX, que apesar de haver um aumento da desigualdade de renda entre os países, a longevidade dos indivíduos aumentou. Essa constatação pode induzir que existe outro componente que influencia a melhoria da expectativa de vida que não corresponde à renda, mas a efetividade de programas voltados para a comunidade e a família dentro de uma mudança social. O objetivo do presente estudo foi apresentar a Estratégia Saúde da Família como inovação e investimento em saúde para a redução da mortalidade infantil. Foi realizada uma pesquisa bibliográfica dos principais sites e revistas científicas que apresentam dados a respeito do objetivo da pesquisa. O principal resultado obtido foi que o impacto da política sobre a redução da mortalidade infantil é significativo, ou seja, quanto maior o percentual de cobertura do ESF, menor o número de óbitos infantis, logo a inovação em saúde com a implantação do ESF no Brasil foi válida e contributiva, no sentido de termos diminuído a mortalidade infantil apresentada em nosso país.*

*Palavras chave: Mortalidade Infantil; Programa Saúde da Família; Inovação em Saúde*

*ABSTRACT – Literary evidence suggests that improvements in life expectancy at birth or low mortality are correlated with the economic standard of the country. Several other research has identified, in the late twentieth century, although there is an increase in income inequality between countries, increased longevity of individuals. This finding*



*may induce that there is another component that influences the improvement in life expectancy that does not correspond to income, but the effectiveness of programs for the community and the family in social change. The aim of this study was to present the Family Health Strategy as innovation and investment in health to reduce infant mortality. a literature search of the main sites and scientific journals that present data regarding the purpose of the survey was conducted. The main result was that the impact of policy on the reduction of child mortality is significant, that is, the higher the ESF coverage percentage, the lower the number of infant deaths, so the health innovation with the implementation of the ESF in Brazil was valid and contribution in the sense of reduced terms infant mortality presented in our country.*

*Keywords: infant mortality; Family Health Program; Innovation in Health*

## 1. INTRODUÇÃO

A construção de alternativas ao modelo hegemônico de atenção à saúde no Brasil tem sido conduzida desde os primeiros movimentos ideológicos de reforma em saúde, nos idos de 1975, quando existe a percepção da intensa crise da Previdência Social, do agravamento das necessidades sociais da população, dentre elas a de saúde, e o retorno à democratização do estado e da saúde com a proposta de criação do Sistema Único de Saúde (SUS) (Teixeira e Solla, 2006).

Com o SUS, o Brasil universaliza o acesso à saúde e define a Atenção Básica à Saúde (ABS) como porta de entrada e principal estratégia para alcançar a meta “Saúde para todos no Ano 2000”, prevista na Alma Ata (1978) (Brasil, 1990). Entretanto, a constituição da ABS no Brasil foi marcada por problemas de estrutura física dos serviços de saúde (Brasil, 1990; Brasil, 2001; Brasil, 2001; Conill, 2002; Tomasi *et al*, 2003). Como alternativa, em 1994 foi implantado o Programa Saúde da Família (PSF), primeiramente em pequenos municípios do Nordeste e alcança, após uma década, os grandes centros urbanos de todo o país. O PSF tem como principal característica a substituição do modelo convencional de assistência à saúde.

O PSF pretende ampliar o acesso aos serviços de saúde, contribuindo para a universalidade da atenção, num contexto de limitação de recursos. Os grupos sociais alvo desta estratégia foram, inicialmente, os de maior vulnerabilidade socioeconômica a fim de contribuir para a diminuição das iniquidades em saúde (Brasil, 1994). O contexto social determina a cada indivíduo sua posição e esta, por sua vez, determina as oportunidades de saúde segundo exposições a condições nocivas ou saudáveis e segundo situações de vulnerabilidade.

O padrão desigual de distribuição de renda no Brasil se reflete em seus principais determinantes – renda, escolaridade, condições de habitação, saneamento e serviços de saúde (World Bank, 2001). Os indicadores de saúde também apresentam amplas desigualdades por regiões e classes sociais. A saúde infantil, por sua maior vulnerabilidade aos riscos e também aos fatores protetores da saúde, exemplifica claramente esta situação de iniquidade presente no Brasil.

De 1980 até os dias atuais, houve crescente redução da taxa de mortalidade infantil nos países



em desenvolvimento (Bourguignon e Morrisson, 2002). No Brasil, de acordo com dados do Ministério da Saúde (2008), a taxa de mortalidade infantil passou de 21,14% para 15,71%, representando uma diminuição de 5,43 pontos percentuais entre os períodos de 2000 a 2007. Em algumas regiões do país, como o Nordeste, a redução da taxa de mortalidade de crianças com até um ano de idade foi ainda mais acentuada, a taxa de mortalidade infantil passou de 26% em 2000 para aproximadamente 19% em 2007 (Brasil, 2008).

O objetivo do presente estudo é apresentar o Programa de Saúde da Família como inovação e contribuição em saúde para a redução da mortalidade infantil.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

A fim de estabelecer o objetivo proposto, elaborou-se um estudo exploratório, feito através de levantamento bibliográfico. É válido realçar que o levantamento bibliográfico foi realizado nos bancos de dados BDENF (Banco de Dados em Enfermagem), Lilacs (Sistema Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde), Scielo (Scientific Electronic Library Online) e Medline (Medical Literature Analysis and Retrieval System Online), no mês de agosto de 2016.

Essa revisão literária visou buscar os estudos realizados contemporaneamente que versavam sobre a redução da mortalidade infantil, levando em consideração a inovação de saúde no Brasil com a implantação do Programa Saúde da Família. Para a localização dos estudos, foram utilizados os seguintes descritores: mortalidade infantil, programa saúde da família, inovação em saúde no Brasil. Os critérios para inclusão das referências bibliográficas seguiram este parâmetro, por conter estas palavras chaves. Foram excluídos os artigos que não abordassem essas palavras. Além disso, aspectos teóricos foram resgatados em bibliografias impressas.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Evidências mostram melhorias na expectativa de vida ao nascer nos países em desenvolvimento entre 1960 e 2000, apesar de serem correlacionadas de alguma forma com renda e nutrição, têm um forte componente não relacionado com estes dois fatores. Apesar da desigualdade de renda entre os países não ter diminuído neste período, a desigualdade na saúde diminuiu bastante (Bourguignon e Morrisson, 2002; Younger, 2001; Becker, Tomas e Rodrigo, 2005). A literatura demográfica vem investigando constantemente os determinantes das reduções de mortalidade nestes países e, cada vez mais vem chamando atenção para a efetividade dos programas a nível comunitário e familiar.

Riley (2001) estudou a redução da mortalidade na Jamaica e atribuiu a esse fator os investimentos públicos em educação e na saúde das famílias. A maior parte dos trabalhos citados atribui importância aos programas de saúde pública em nível familiar ou comunitário, mas existe pouca evidência econométrica a esse respeito. No Brasil, os estudos sobre o impacto dos programas de atenção básica à saúde sobre a mortalidade iniciaram-se após a implantação do PSF em 1994.



Macinko *et al* (2006) avaliaram o impacto do PSF sobre o nível de redução da mortalidade infantil. Para isto, utilizaram o método de diferença em diferença, onde a variável independente do modelo foi a cobertura do PSF e a dependente a taxa de mortalidade para os Estados do Brasil. As evidências geradas sugerem que o impacto da política é significativo e positivo sobre o aumento da expectativa de vida ao nascer.

Soares (2007) também calcula o impacto do PSF sobre a redução e mortalidade por faixa etária e por região, controlando pelo efeito fixo do município. A variável dependente é a mortalidade por faixa etária e a independente é o tempo que o município ingressou no Programa de atenção básica à saúde (PSF). O resultado do trabalho aponta para uma redução na taxa de mortalidade de crianças, adultos e idosos.

Andrade *et al* (2006) defendem que as condições de vida, a dificuldade de acesso a bens e serviços pode ampliar risco de morte no primeiro ano de vida, confirmando que a taxa de mortalidade infantil tem sido considerada um indicador sensível às condições sociais e de qualidade de vida da população. No entanto, no mundo há enormes distâncias entre os indicadores de mortalidade infantil, o que se reflete também no continente americano, onde, na América do Norte, o indicador apresentou uma redução importante, pois na metade do século XX era de 90,34 óbitos em menores de um ano por mil nascidos vivos, chegando nos anos de 1990 à média de 31,31 óbitos. Todavia, na América Latina e América do Sul a redução da mortalidade infantil não seguiu para o mesmo patamar da América do Norte, demonstrando que as desigualdades no risco de morte infantil persistiram em todo o período, com vulnerabilidade nos países mais pobres em comparação aos mais ricos, demonstrados nos indicadores mais elevados.

No Brasil, e em outros países em desenvolvimento, observa-se que os recursos escassos ou usados de forma menos eficiente resultam em início tardio do acompanhamento pré-natal, em consultas irregulares, muito rápidas, com longo tempo de espera e excesso de solicitação de exames complementares (Ducan, Giugliane e Schmidt, 2006).

O estudo “An evaluation of impact of the Family Health Program on infant mortality in Brazil, 1990 – 2002” de autoria de James Macinko, Frederico Guanais e Maria de Fátima de Souza, publicado no *Journal of Epidemiology and Community Health* em janeiro de 2006, é importante para a consolidação deste modelo de atenção no Brasil e, também, em nível internacional, por contribuir com evidências científicas sobre a efetividade da Atenção Primária em Saúde (APS), 25 anos depois do encontro internacional de Alma-Ata.

Este estudo, ao utilizar dados secundários extraídos dos sistemas de informação do Datasus e do IBGE, demonstra a utilidade da análise destes dados ao avaliarmos as contribuições do PSF para a saúde dos brasileiros. Os autores do artigo citado estudaram a influência do PSF no declínio da taxa de mortalidade infantil (mortes em menores de 1 ano) no Brasil entre 1990 (49,7 mortes por mil crianças nascidas vivas) e 2002 (28,7 mortes por mil crianças nascidas vivas). Os estados brasileiros foram classificados de acordo com a cobertura populacional oferecida pelo PSF, relacionando esta cobertura com as taxas de mortalidade infantil, controlando-as para outras variáveis que têm relação direta com a mortalidade infantil (saneamento, renda, escolaridade materna, número de médicos,



enfermeiros e leitos hospitalares). Desta maneira, por meio da abordagem ecológica longitudinal, os autores revelaram a importante contribuição do PSF no descenso da mortalidade infantil em nosso País, estimando que um aumento de 10% na cobertura do PSF poderia levar a um decréscimo de 4,5% na mortalidade infantil. Eles mostraram a importância de realizar estudos com dados secundários e enfatizaram que um modelo assistencial de atenção, baseada na promoção e proteção, no diagnóstico precoce, na recuperação da saúde dos indivíduos e da família, de forma integral e contínua, é fundamental para melhorar os indicadores de saúde. Esse estudo também contribuiu para identificar estratégias de monitoramento da efetividade de um programa nacional como o PSF.

Do ponto de vista das políticas públicas, o estudo de Macinko, Guanais e Souza (2006) traz evidências importantes para gestores, profissionais e população sobre uma ação em Saúde – o PSF – que vem ocupando lugar de destaque no campo das políticas públicas no Brasil. O desenvolvimento de estratégias criativas de avaliação de políticas públicas nacionais em Saúde é importante para a defesa da utilização de recursos públicos em prol da melhoria das condições de saúde da população e da busca da equidade, principalmente em cenários de grande desigualdade como no Brasil.

O estudo sobre o Impacto do PSF na mortalidade infantil nos municípios brasileiros (1993/2012), dos autores Gomes, Bastos e Morais (2013), analisou os impactos do PSF na mortalidade infantil por diferentes causas nos municípios brasileiros no período de 1995 e 2008, de forma a encontrar indícios de que os esforços de implementação do programa são capazes de trazer resultados positivos à saúde.

Esse estudo inovou ao utilizar estimações por dados em painel dinâmico considerando defasagens temporais para até dois anos anteriores. Deve-se fazer uma ressalva de que não teve a preocupação em mostrar uma relação causal entre o PSF e a diminuição da mortalidade infantil, uma vez que para essa associação seria necessário usar outras ferramentas. Como principal resultado, assim como o encontrado na literatura, tem-se que ao longo do período analisado, um maior número de famílias cadastradas no PSF está associado a uma maior queda na taxa de mortalidade infantil. As dummies de ano também mostram influência do PSF na redução da taxa de mortalidade infantil. Isso ocorre principalmente para os casos de cobertura mais antiga, ou seja, municípios que aderiram ao PSF há mais tempo. Com isso, quanto maior o número de famílias atendidas e o tempo do município no PSF mais capaz esse é de reduzir a mortalidade infantil (Gomes, Bastos e Morais; 2013).

Atualmente, A Política Nacional da Atenção Básica de 2011 traz, o que era tratado como um programa, a Estratégia de Saúde da Família como a ordenadora do acesso aos serviços de saúde no Sistema Único de Saúde (SUS). Esta experiência permitiu a transformação de um programa em uma estratégia de inovação dos modelos de atenção à saúde no Brasil. Estratégia essa fortalecida também pela regulamentação da Lei Orgânica de Saúde por meio do Decreto 7.508/2011 reforçando os impactos positivos de suas ações ao longo desses anos.



## 4. CONCLUSÃO

Ao longo dos anos 2000, o Brasil experimentou uma forte redução da taxa de mortalidade infantil, esse decréscimo foi proporcionalmente maior no nordeste do país. A literatura demográfica, que se dedica a estudar essas questões, aponta como determinantes do aumento da expectativa ao nascer, além das variáveis socioeconômicas da família, fatores relacionados às condições de saneamento do domicílio, identificam também a importância do efeito dos programas de saúde com foco nas famílias e comunidades, sobre a saúde das crianças.

Na direção inversa ao decréscimo da taxa de mortalidade infantil, tem-se a expansão da cobertura da Estratégia de Saúde da Família no Brasil. Estratégia essa que tem como um de seus objetivos reduzir a taxa de mortalidade infantil e melhorar os indicadores de saúde da criança, através do acompanhamento de gestantes por profissionais de saúde, que instrui e acompanha a família para a prevenção de doenças.

Diante do conjunto de evidências geradas no presente estudo, percebe-se a importância da continuidade de investimento do governo na estratégia saúde da família. Somado a isso, nota-se a importância da melhoria das condições de saneamento e nível educacional da comunidade para o progresso dos indicadores de saúde das crianças.

## 5. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, S. M. *et al.* Condições de vida e mortalidade infantil no Estado do Paraná, Brasil, 1997/2001. *Cad. de S. Pública*, Rio de Janeiro, 22, n.1: 181-189. Jan, 2006
- BOURGUIGNON, F. e MORRISSON, C. Inequality among World Citizens: 1820-1992. *American Economic Review. Amer. Econ. Association.* vol.92, n.4, 2002. p. 727-744
- BECKER, G. S., TOMAS, J. P. e RODRIGO, R. S. The Quantity and Quality of Life and the Evolution of World Inequality. *Amer. Econ. Review, Amer. Econ. Association*, vol. 95, n.1, 2005. p. 277-291
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. *Saúde dentro de casa*. Brasília, 1994
- Ministério da Saúde. *Saúde da Família: Avaliação da Implementação em Dez Grandes Centros Urbanos: Síntese dos Principais Resultados*. Editora do Ministério da Saúde, 2.ed. atualizada. Brasília: Fundação Oswaldo Cruz, 2008
- Ministério da Saúde. *Lei no 8.080, de 19 de setembro de 1990: dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes, e dá outras providências*. Brasília: Congresso Nacional. 1990
- Ministério da Saúde. *Regionalização da Assistência à Saúde: Aprofundando a Descentralização com Equidade no Acesso*. Norma Operacional da Assistência à Saúde. NOAS. SUS 01/01. Portaria MS/GM no 95, de 26 de Janeiro de 2001. Brasília: MS; 2001.
- Ministério da Saúde. *Guia Prático do Programa Saúde da Família*. Brasília: MS; 2001



- CONILL, E. M. Políticas de atenção primária e reformas sanitárias: discutindo a avaliação a partir da análise do Programa Saúde da Família em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, 1994-2000. *Cad. S. Pública*: 2002; 18 (Supl): 191-202
- DUCAN, B. B.; GIUGLIANI, E. R. J; SCHIMIDT, M. I. *Medicina Ambulatorial*. 3ed. São Paulo: Artmed, 2006
- GOMES, B. S. M.; BASTOS, S. Q. A.; MORAIS, A. M. P. *Impacto da Mortalidade Infantil nos municípios brasileiros (1993/2012)*. Área 12 – Economia social e Demografia Econômica. 2013
- MACINKO, J.; GUANAIS, F.C.; SOUZA, M. F. M. Evaluation of the Impact of the Family Health Program on Infant Mortality in Brazil, 1990-2002. *J. of Epidem. and Comm. Health*, 60, 2006. p. 13-19
- RILEY, J.C. *Poverty and life Expectancy*. Cambridge: Cambridge University Press, 2001
- SOARES, R. R. On the Determinants of Mortality Reductions in the Development World. *Popul. and Develop. Review*, 33 (2). 2007. p. 247-287.
- TEIXEIRA, C. F.; SOLLA, J. P. *Modelo de atenção à saúde no SUS: trajetória do debate conceitual, situação atual, desafios e perspectivas*. In: Teixeira, C. F.; Solla, J. P. (org.) *Modelo de atenção à saúde: promoção, vigilância e saúde da família*. EDUFBA. Salvador, 2006, p. 129-165
- TOMASI, E.; FACCHINI, L. A.; OSORIO, A.; FASSA, A. G. Aplicativo para sistematizar informações no planejamento de ações de saúde pública. *Rev. S. Pública*: 2003; 37, n.6: 800-6
- YOUNGER, S.D. Cross-Country Determinants of Declines in Infant Mortality: A Growth Regression Approach. *Cornell Univ., Cornell Food and Nutrition Policy Program: Working paper*, n.130; 2001
- WORLD BANK. *World Development Report, 2000/2001: attacking poverty*. Washington: Oxford University Press, 2001

## 6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Ministério da Saúde o financiamento do Programa de Pós-Graduação em Gestão e Economia da Saúde realizado pela Universidade Federal de Pernambuco.



ÁREA DE SUBMISSÃO: POLÍTICAS PÚBLICAS EM SAÚDE – PP 4

## APURAÇÃO DE CUSTOS NA FARMÁCIA AMBULATORIAL DE UM HOSPITAL ESPECIALIZADO EM DOENÇAS INFECTOCONTAGIOSAS A PARTIR DO NÚCLEO DE ECONOMIA DA SAÚDE - NES.

T. M. CALABRIA<sup>1</sup>, L. H. SOUZA NETO<sup>1</sup>, D. K. FEITOSA<sup>1</sup>, P. R. L. G. PORTELLA<sup>3</sup>, I. E. R. da COSTA<sup>3</sup>, E. R. DUARTE<sup>2</sup>, E. M. M. LEAL<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Graduandos do Curso de Saúde Coletiva da Universidade Federal de Pernambuco.

<sup>2</sup> Docentes do curso de graduação em Saúde Coletiva da Universidade Federal de Pernambuco.

<sup>3</sup> Núcleo Estadual de Economia da Saúde, Secretaria Estadual de Pernambuco.

E-mail para contato: thadeu.calabria@gmail.com

**RESUMO** – *Relato de Experiência que teve como objetivo descrever mensurar e qualificar o processo de controle de custo da farmácia ambulatorial especializada em tratamento de HIV/AIDS, do Hospital Especializado da rede SUS PE através da experiência de intervenção do Núcleo de Economia da Saúde (NES) de Pernambuco. O acompanhamento da implementação do Núcleo de Economia de Saúde na instituição hospitalar foi realizado durante 13 semanas entre o mês de Agosto e Novembro, na perspectiva de contribuir efetivamente no processo de apuração dos custos do hospital, especificamente no Centro de Custo Farmácia Ambulatorial. A coleta dos dados foi através do Sistema de Controle Logístico de Medicamentos (SICLON) do Ministério da Saúde, com emissão de atestos delimitados no período de janeiro a setembro do ano vigente considerando medicamentos antirretrovirais (80%) dispensados e custo total mensal. Verificou que o total de medicamentos dispensados e custos gerados pela farmácia ambulatorial evidenciou média de 553.150,27 dispensações. Apresentando um custo integral de 24.338.226,43, com uma média de 2.704.251,83 milhões. A experiência realizada no NES-PE no hospital estadual especializado, na apuração de custos na farmácia ambulatorial, mostrou o quantitativo expressivo de fármacos dispensados, principalmente retrovirais, sendo ele a maioria nas liberações mensais, como também o custo maior total de remédios, causando um grande impacto financeiro.*

*Palavras-chave:* Custos Hospitalares; Controle de Custos; Economia da Saúde.

**ABSTRACT** – *Experience Report that aimed to describe measure and qualify the cost control process of outpatient pharmacy specializes in treating HIV / AIDS, the Specialized Hospital SUS PE network by intervening experience of the Health*



*Economics Center (NES) of Pernambuco. The monitoring of the implementation of the Health Economics Unit at the hospital was carried out for 13 weeks between August and November, with a view to effectively contribute to the hospital's costs of investigation process, specifically the cost Outpatient Pharmacy Center. Data collection was via the Logistics Management System Drugs (SICLON) of the Ministry of Health, with delimited topping emission in the period from January to September of the current year considering antiretroviral drugs (80%) dispensed and total monthly cost. It found that the total number of dispensed drugs and costs generated by outpatient pharmacy showed average of 553,150.27 dispensations. Offering a full charge of 24,338,226.43, with an average of 2,704,251,830,000. The experiment carried out on the NES-PE in the specialized state hospital, in the calculation of costs in the outpatient pharmacy, showed the significant quantity of dispensed drugs, particularly retroviral, it most in the monthly releases being, as well as the higher cost total of medicines, causing a large financial impact.*

*Keywords.;* Hospital costs; Cost Control; Health Economics.

## 1. INTRODUÇÃO

A Economia da saúde é um conhecimento que surge na perspectiva de trabalhar os conceitos e bases da economia no campo da saúde, atrelando as teorias econômicas na área da saúde, de forma que possa melhor investir e aperfeiçoar os recursos financeiros na saúde. (Brasil, 2012).

Um dos grandes desafios do setor Saúde é a gestão hospitalar que é caracterizada por sua complexidade, sendo também a maior fonte de gastos dentro do sistema de saúde brasileiro, aproximadamente 60% desse gasto é financiado pelos recursos públicos. O conhecimento dos custos dos hospitais públicos e sua gestão tornam-se fundamentais para uma alocação eficiente de recursos e melhoria na qualidade dos serviços prestados. (Gonçalves, Ferreira, Alemão, 2014).

O Núcleo de Economia da Saúde de Pernambuco (NES-PE) objetiva promover a disseminação das ações de Economia da Saúde no Estado e em municípios de grande porte, com vistas a subsidiar os gestores locais no processo de tomada de decisão pela aplicação do conhecimento e das ferramentas de Economia da Saúde. Por meio da elaboração de estudos econômicos em saúde, prática da gestão de custos nos hospitais estaduais sob administração direta, apoio ao Estado e municípios na declaração dos dados no Sistema de Informação sobre Orçamentos Públicos em Saúde (SIOPS), apoio à alimentação do Banco de Preços em Saúde (BPS) para promover economicidade em compras de insumos e equipamentos para a saúde, apoio à gestão na elaboração e execução do orçamento da saúde. O NES-PE está institucionalmente ligado a Diretoria Geral de Informações Estratégicas (DGIE) desde 2015.

O Núcleo de Economia da Saúde do Hospital Especializado faz parte do processo de implementação da gestão de custos nos hospitais estaduais. A instituição é referência estadual



para o tratamento de doenças infectocontagiosas, especificamente AIDS.

Segundo Portela (2006) no Brasil os gastos do SUS com a assistência hospitalar à AIDS, incluindo internações propriamente ditas e tratamento em hospital-dia, apresenta uma variação entre pouco menos de 20 milhões de reais, em 1998, a cerca de 27,3 milhões de reais, em 2004. Tendo um custo médio da internação por AIDS entre aproximadamente R\$550,00 em 1998, e R\$700,00 em 2004.

O Brasil foi o primeiro país em desenvolvimento a garantir tratamento gratuito para AIDS a cada cidadão por meio de um programa altamente eficaz. O alto valor dos novos medicamentos fez com que os gastos do país com medicamentos para AIDS subissem 75% nos últimos dois anos, os antirretrovirais custam até US\$ 17 mil por paciente por ano (The Boston Globe, 2007).

Diante do alto custo dos medicamentos alinhando uma necessidade de controle nacional com os gastos em saúde, surge a necessidade de descrever e qualificar o processo de controle de custo da farmácia ambulatorial especializada em tratamento de HIV/AIDS, do Hospital Especializado através da experiência de intervenção do Núcleo de Economia da Saúde (NES) de Pernambuco.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

Este estudo descreve a experiência que teve viabilidade devido ao estágio curricular articulado pela Universidade Federal de Pernambuco do Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão com a Secretária Estadual de Saúde, na Secretária Executiva de Coordenação geral, especificamente na Diretoria Geral de Informações Estratégicas, no Núcleo Estadual de Economia de Saúde (NES-PE). O campo de estudo foi realizado no Hospital Especializado da rede SUS PE, no período de Agosto á Novembro do ano vigente 2016.

A entidade hospitalar é de caráter de gestão estadual e possui especialidade principalmente em doenças infecciosas de HIV, meningite pediátrica, acidentes com materiais biológicos, casos de exposição sexual acidental.

O processo de acompanhamento de implementação do Núcleo de Economia de Saúde na instituição hospitalar foi realizado durante 13 semanas entre o mês de Agosto e Novembro, durante 6 horas semanais, no horário matutino e vespertino, na perspectiva de contribuir efetivamente no processo de apuração dos custos do hospital, especificamente no Centro de Custo Farmácia Ambulatorial.

Para coleta dos dados foi utilizado o Sistema de Controle Logístico de Medicamentos (SICLON) do Ministério da Saúde, com emissão de atestos delimitados no período de janeiro a setembro do ano vigente considerando medicamentos antirretrovirais dispensados e custo total mensal – estes medicamentos representam 80% do volume de dispensação da Farmácia Ambulatorial. Para os demais medicamentos terapêuticos (Medicamentos de Saúde Mental;



Medicamentos de Infecções Oportunistas; Medicamentos dos Programas Estratégicos) que a dispensação não é controlada por nenhum sistema de controle, foi utilizada análise através de informações empíricas das farmacêuticas, sendo assim uma estimativa passível de vieses.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A dinâmica de conhecer o fluxo de processo da farmácia ambulatorial e seus respectivos custos iniciou-se após de um período de vivência do Núcleo de Economia da Saúde do Hospital Especializado, onde após um diagnóstico situacional, observou-se a importância de conhecer e identificar o seu processo de trabalho e os custos operacionais gerados, já que é hospital especializado HIV/AIDS com alta demanda e dispensação de medicamentos antirretrovirais para pacientes aidéticos, na perspectiva de estimar o quanto a farmácia satélite produz, em relação às quantidades dispensadas e os custos mensais do serviço prestado e seu impacto econômico no hospital.

Primeiramente foi realizada uma conversação informal, com uma breve apresentação dos objetivos do NES Estadual e do NES do respectivo hospital especializado. Para os profissionais farmacêuticos e funcionários técnicos operacionais que compõem a equipe de trabalho, em seguida a profissional exemplificou como funciona do fluxo processual da farmácia, desde a entrada até a dispensação do medicamento.

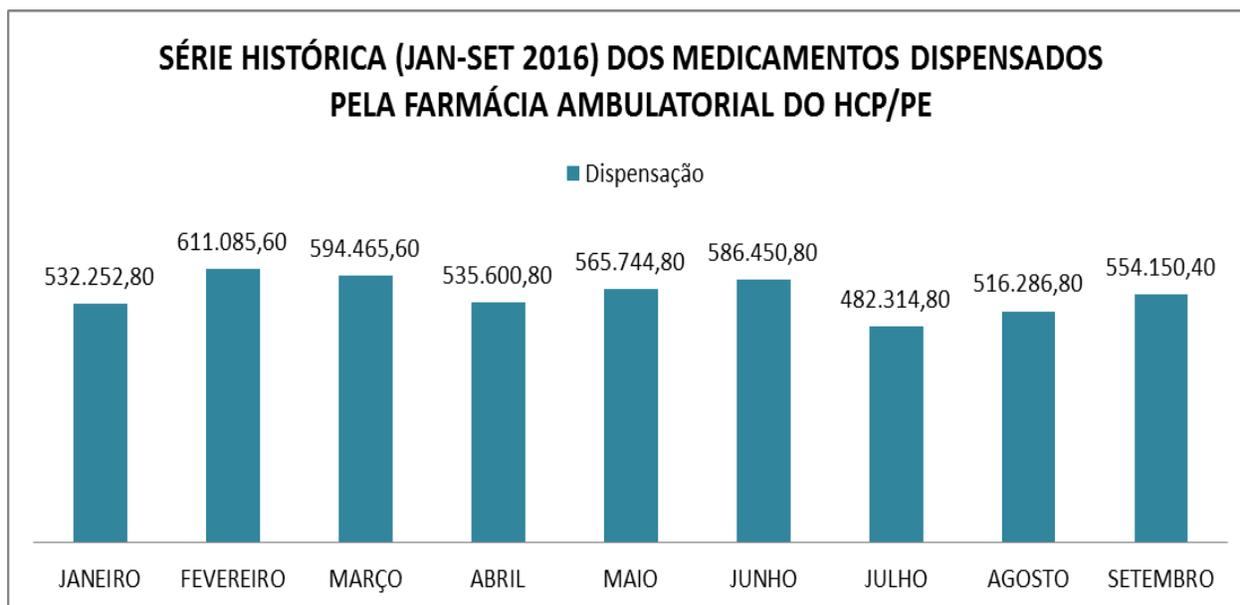
De acordo com diálogo realizado e com percepção da vivência, realizou-se um fluxograma do processo, desde a chegada dos fármacos até de dispensação, em seguida validado com o NES-Hosp e NES-PE, juntamente as profissionais. Constatou-se ao final do processo de mapeamento, que o fluxo de recebimento da farmácia satélite é realizado pela CEASA/SAÚDE LOG, onde abastece o Centro de Abastecimento Farmacêutico Hospitalar (CAF) e de acordo com o planejamento e fluxo de rotina diariamente são realizados uma estocagem semanal.

Os antirretrovirais (ARV) são a maioria de medicamentos que o ministério envia para a instituição, onde os medicamentos são registrados e controlados desde a entrada até a dispensação, pelo sistema SICLON que objetiva o gerenciamento logístico dos medicamentos antirretrovirais. O sistema permite que o Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais se mantenha atualizado em relação ao fornecimento de medicamentos aos pacientes em terapia antirretroviral (TARV), nas várias regiões do país. As informações são utilizadas para controle dos estoques e da distribuição dos medicamentos ARV, assim como para obtenção de informações clínico-laboratorial dos pacientes de AIDS o uso de diferentes esquemas terapêuticos.

Na mensuração do quantitativo de medicamentos dispensados e custos gerados, para os medicamentos não provenientes do ministério, utilizou-se os documentos de notas fiscais de compras, já que esses medicamentos não possui registro de controle, mas segundo informações empíricas dos profissionais esses fármacos são considerados 20% dos medicamentos que

abastecem, dispensam na farmácia satélite e os demais 80% do Ministério da Saúde (SICLON). Em relação aos antirretrovirais analisou os atestos emitidos pelo sistema ministerial SICLON, com a quantidade que foi dispensada de cada mês, no ano 2016.

Na consolidação dos dados do SICLON constatou-se 44 medicamentos, correspondendo 80% dos medicamentos utilizados na farmácia ambulatorial. No que tange aos valores unitários observou diferentes valores, sendo maioria com custo baixo. Contudo, examinou-se que o medicamento Enfurvirtida representa a maioria do custo total, com o valor unitário de 3.674 mil, com 300 a 400 dispensações mensais, custando uma média 1.256.508,00000 milhões, representando medicamento de alto custo nos todos os meses analisados, considerando seu valor e não dispensação. Outro medicamento que eleva os custos é Lopinavir + Ritonavir, devido à quantidade de dispensação, sendo uma estimativa de 100 mil a 200 mil ao mês, com um valor de unitário de 1,40 centavos com o custo médio total mês de 159.425,99 reais, considerando os



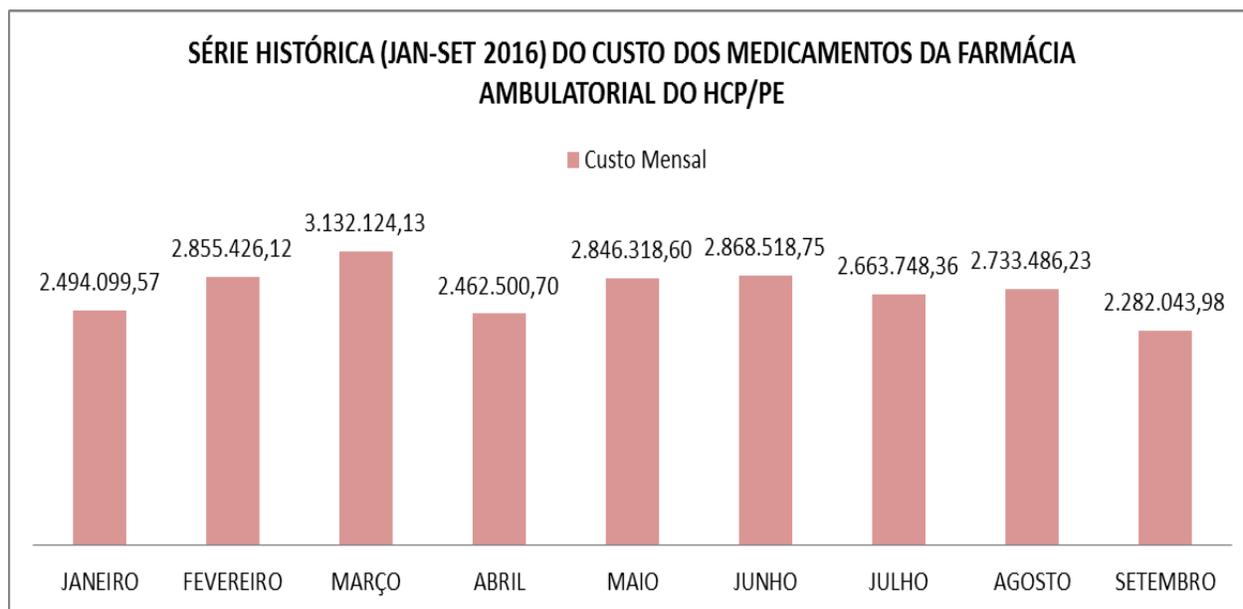
noves meses. No que diz a respeito um menor valor unitário, foi o medicamento Zidovudina com um valor de 0,26 centavos. Portanto nos demais medicamentos, observou-se o que vai influenciar significativo no custo total é a o quantitativo de remédio dispensado.

Gráfico 01- Série Histórica de Janeiro a Setembro de 2016 do Custo dos Medicamentos da Farmácia Ambulatorial

Fonte: NES-PE/DGIE/SECG

Segundo o gráfico elaborado referente a serie histórica de janeiro a setembro de 2016, sobre a dispensação de medicamentos, observou-se que no mês de janeiro teve um quantitativo total de 532.252,80 dispensados, que em relação a fevereiro, apresentou um aumento com o

montante 611.085,60, liberados. No entanto, em Março considerou uma diminuição de dispensação com somatório de 594.465,60 dispensados.



No tocante ao mês de abril, expressou uma diminuição com um total de 535.600,80 liberações, entretanto no mês de maio 565.744,80, com acréscimo de dispensação. Nota-se que em Julho a uma diminuição comparando o mês anterior com o quantitativo de 482,31480, e nos demais meses um aumento, com agosto de 516.286,80 e setembro 554.150,40 dispensações. Em relação a comparabilidade, o maior mês com dispensações foi o mês de fevereiro com 611.085,60 sobre o menor o mês de dispensações, julho expressou o menor somatório, com 482, 314,80 liberações de medicamentos.

Gráfico 02- Série Histórica de Janeiro a Setembro de 2016 do Custo dos Medicamentos da Farmácia Ambulatorial

Fonte: NES-PE/DGIE/SECG

Conforme o gráfico no que diz a respeito a serie histórica de janeiro a setembro de 2016 sobre os custos hospitalares, observou-se que no mês de Janeiro a farmácia satélite apresentou um custo de 2.49.099,57 milhões, tendo um aumento no mês de Fevereiro com o valor de 2.855.426,12 e Março com 3.132.124,13. Contudo no mês de Abril, verificou uma redução com o valor total 2.462.500,70. Todavia, verificou no mês de Maio um acréscimo nos custos, chegando ao valor de 2.846.318,60 ,em Junho continuou aumentando, tendo um custo integral de 2.868.518,75.

No entanto, em Julho houve uma diminuição de 2,663. 748,36, voltando aumentar em agosto com o valor de 2.733.486,23 e apresentando uma diminuição significativa no mês de



Setembro com o valor integral de 2.282.043,98 milhões. Em comparação entre os meses de estudo, observou-se que o mês de Março teve maior custo, com o valor 3.132.124,13. Quanto ao mês com menor custo, Setembro apresentou um quantitativo total de 2.282.043,98 milhões.

Portanto verificou-se que o total de medicamentos dispensados e custos gerados pela farmácia ambulatorial no período de Janeiro a Setembro, evidenciou uma quantidade de 4.978.352,40 liberações, com uma média de 553.150,27 dispensações. Apresentando um custo integral de 24.338.226,43, com uma média mensal de 2.704.251,83 milhões.

Desta forma, confirmou-se o tamanho do impacto econômico que a farmácia ambulatorial ao hospital especializado estudado e nessa perspectiva de propor melhorias, foi proposta a equipe, uma ferramenta de monitoramento e controle, elaborada numa planilha de Excel, com valores unitários e fórmulas para iniciar o registro dos 20% de medicamentos não contabilizados, saindo de informações estimadas e podendo constatar a quantidade e custos reais desses medicamentos.

Além de colaborar no registro e no controle de dispensações, a vivência no centro de custo de farmácia ambulatorial contribuiu para o levantamento de informações que eram desconhecidas pelas farmácias e pela direção do hospital, ajudando no planejamento estratégico e contribuindo para possíveis planos de intervenção e acompanhamento custo-efetivo dos medicamentos. Segundo (Costa, *et al* 2015), afirma a necessidade de investir na implantação de ações que propiciem mensuração dos custos das ações e serviços de saúde, potencializando assim, a aplicação dos recursos financeiros que são escassos, contribuindo para a elaboração de um orçamento mais próximo da realidade a serem destinadas, principalmente às unidades hospitalares.

Dessa maneira, a vivência de trabalho na farmácia satélite foi um grande desafio, diante das limitações e dificuldades na estrutura física, planejamento e organização do hospital especializado, como também a sensibilização dos profissionais tanto NES/Hosp e profissionais do setor farmacêutico, no entendimento e compreensão da importância de trabalhar custos no âmbito hospitalar, que influenciaram algumas vezes no retardamento na coleta de dados para realização do estudo.

#### **4. CONCLUSÃO**

Portanto a vivência realizada no Núcleo de Economia da Saúde (NES) no hospital estadual especializado, na apuração de custos na farmácia ambulatorial, mostrou o quantitativo expressivo de fármacos dispensados, principalmente retrovirais, sendo ele a maioria nas liberações mensais, como também o custo maior total de remédios, causando um grande impacto financeiro. Disto isto, é dimensionada a importância da necessidade de um maior monitoramento dos remédios terapêuticos, principalmente na implementação de uma ferramenta de controle de medicamentos, não advindos do ministério, proposta sugerida na vivência. Contudo para que



possa ser incrementada é necessário maior afinco do à gestão e gerência, principalmente do NES do hospital, pois são atores determinantes na governabilidade de planejar e incrementar melhorias no processo de trabalho e sensibilizar a parte operacional, com a criação de cultura de estratégias institucional para melhor utilização dos recursos, visando garantir uma prestação de serviço de qualidade e custo efetiva. No que tange a vivencia, foi de grande valia, pois permitiu aprender e contribuir com a implementação do NES no hospital especializado, como também colaborar no fortalecimento da Economia da Saúde no Estado.

## REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária Executiva. Departamento de Economia da Saúde. Investimentos e Desenvolvimento. *Microeconomia*. Brasília, 2012. Disponível em:<[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cadernos\\_economia\\_saude\\_2\\_microeconomia.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cadernos_economia_saude_2_microeconomia.pdf)>. Acesso em: 01 de Outubro de 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Organização Pan- Americana da Saúde. *Introdução à Gestão de Custos em Saúde*. Secretaria-Executiva Departamento de Economia da Saúde, Investimentos e Desenvolvimento. Brasília: Ministério da Saúde; 2013. 148 p. Disponível em:<[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/introducao\\_gestao\\_custos\\_saude.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/introducao_gestao_custos_saude.pdf)>. Acesso em: 01 de Outubro de 2016.
- COSTA, I. E. R; LEMOS, R; PUÇA, G. E; *et al.* *Implantação do Núcleo de Economia da Saúde nos Hospitais Estaduais – O Caso de Pernambuco, Brasil*, 2015.
- GONÇALVES, M. A; FERREIRA, B. P; ALEMÃO, M. M. Risco operacional no setor saúde: financiamento pelo SUS paralelo aos gastos na fundação hospitalar do Estado de Minas Gerais. *Revista Gestão & Tecnologia*, Pedro Leopoldo, v. 14, n. 1, p. 126-150, jan/abr, 2014. Disponível em:< <https://revistagt.fpl.edu.br/get/article/download/532/505>>. Acesso em: 09 de Outubro de 2016.



**PRODUTOS NATURAIS E  
QUÍMICA MEDICINAL**



ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL – PNQM 1

## SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO DERIVADO TIAZACRIDÍNICO LPSF/AA-57

M. L. ALMEIDA<sup>1</sup>, V. C. M. DA COSTA<sup>2</sup>, M. C. PEREIRA<sup>2</sup>, I. R. PITTA<sup>1</sup>, M. R. GALDINO-PITTA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco.

<sup>2</sup> Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco.

E-mail para contato: marcel\_256@hotmail.com

**RESUMO** - *Os derivados tiazacridínicos têm sido bastante explorados no desenvolvimento de fármacos anticâncer, antibacteriana e antiviral devido, principalmente, a suas capacidades de intercalação ao DNA e inibição da enzima topoisomerase II. Os derivados acridínicos possuem substituintes estruturais diferentes que lhes conferem atividades citotóxicas singulares. Com isso, muitos estudos estão sendo realizados para a descoberta de novos fármacos mais seletivos e menos tóxicos. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo sintetizar de forma eficiente o derivado tiazacridínico da série LPSF/AA-57 a partir de uma reação de Adição de Michael, e de realizar sua caracterização estrutural utilizando as técnicas de CLAE, IV e EM para avaliar seu grau de pureza e desvendar seu perfil de fragmentação. Após esta etapa também foi feito testes biológicos em células cancerígenas, com resultados interessantes em algumas linhagens celulares, como (HL-60, K562, Jurkat).  
Palavras-chave: Síntese Orgânica; Tiazacridinas; Anticâncer; Química Medicinal.*

**ABSTRACT** - *The thiazacridine derivatives have been widely exploited in the development of anticancer drugs, antibacterial and antiviral mainly due to its merge capabilities to DNA and inhibition of the enzyme topoisomerase II. A acridines derivatives have different structural substituent that provides unique cytotoxic activities. Thus, many studies are being conducted to the discovery of new more selective and less toxic drugs. So, this study aims to synthesize efficiently the thiazacridine derivative LPSF/AA-57 from a Michael addition reaction, and to carry out structural characterization using HPLC techniques, IR and MS to evaluate their purity and unravel its fragmentation profile. After this step biological tests in cancer cells was performed, leading to interesting results in some cell lines such as (HL-60, K562, Jurkat).*



*Keywords: Organic Synthesis; Thiazacridines; Anticancer; Medicinal Chemistry.*

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer é um conjunto de mais de 100 tipos diferentes de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células anormais com potencial invasivo. De acordo com o Ministério da Saúde, a incidência de câncer vem aumentando consideravelmente. O INCA estima cerca de 580 mil casos novos da doença para 2014. (INCA, 2016). Atualmente, a principal forma de tratamento desta doença é a quimioterapia, podendo ser auxiliada pela radioterapia e/ou cirurgia. No entanto os quimioterápicos disponíveis no mercado trazem aos pacientes inúmeros efeitos colaterais devido à baixa especificidade, diminuindo bastante sua qualidade de vida (INCA, 2014). Graças às recentes descobertas de novos alvos biológicos do câncer e pela possibilidade de desenvolver novos agentes anticâncer com mais alta eficácia e seletividade, bem como menor citotoxicidade, a procura de novos agentes inovadores é de extrema importância (Raza *et al.*, 2012).

Uma das classes de moléculas que tem sido estudada devido a sua baixa toxicidade e alta eficiência são as Tiazacridinas. Esta classe de compostos apresenta em sua estrutura química um núcleo acridínico formado por três anéis aromáticos fundidos com um nitrogênio no anel central e um núcleo tiazolídínico formado por um anel heterocíclico pentagonal contendo um átomo de enxofre na posição 1, um de nitrogênio na posição 3, e uma carbonila nas posições 2 e 4 (Galdino-Pitta *et al.*, 2013).

Alguns estudos já foram realizados com derivados tiazacridínicos, estes compostos são agentes intercalantes de DNA e tem demonstrado que ter uma vasta gama de atividades biológicas, tais como antidepressiva, anti-inflamatória e, principalmente, como anticâncer (Victoria *et al.*, 2013; Galdino-Pitta *et al.*, 2013; Lang *et al.*, 2013).

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo sintetizar de forma rápida e eficiente o derivado tiazacridínico (LPSF/AA-57) e caracterizá-lo estruturalmente através da técnica de Espectrometria de Massa (MS), Infravermelho (IV) e Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) visando esclarecer o seu perfil de fragmentação e avaliar a pureza do produto. Bem como, também teve como objetivo analisar sua atividade biológica em linhagens cancerígenas, Jukart, RAJI, HL 60, K562, Du 145 e Molt-4.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

A síntese do composto LPSF/AA-57 foi realizada através de uma reação de Adição de Michael onde se reagiu quantidades equimolares do reagente intermediário AA-1A (3-Acridina-9-il-metil-tiazolidina-2,4-diona) solubilizado em etanol, e o outro reagente da série IP (Ésteres de Cope), previamente sintetizado. Por último é adicionado o catalisador morfolina. A solução foi mantida à 65°C por cerca de 4h sob refluxo e agitação magnética. Ao fim da síntese, o produto foi

filtrado. A reação foi monitorada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), (Galdino et al., WO2013053034 A3, 2013).

Para caracterização do LPSF/AA-57 foi utilizada a técnica do Espectrômetro de Massa (ESI-MS<sub>(n)</sub> HCTultra). A análise por MS transcorreu no modo positivo, utilizando-se hélio como gás de arraste e voltagem do capilar de 4500v. A temperatura do gás de secagem foi de 250°C e o scan utilizado foi de 100-500 m/z. O nitrogênio foi utilizado como gás nebulizador a uma pressão de 10 psi. Na técnica de espectrofotometria de Infravermelho (FTIR) as amostras foram preparadas em forma de pastilha de Brometo de Potássio (KBr) na proporção de 1:100. Para a análise da pureza do composto foi utilizada a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), as amostras foram solubilizadas em acetonitrila (ACN) na proporção de 0,2 mg/mL, com os solventes Metanol (MeOH) e ACN servindo de fase móvel.

As culturas celulares utilizadas foram às seguintes: Células de tumor hematopoiéticas Jukart (leucemia de células T aguda) e MOLT-4; RAJI (células de linfoma Burkitt's); HL60 (leucemia promielocítica aguda); K562 (leucemia mielogênica crônica); DU-145 (câncer da próstata) e PBMC (células mononucleares de sangue periférico primário) foram mantidas em meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Corporation) suplementado com 100 U/ml de penicilina, 100 ug/ml de estreptomicina, 0,25 mg /ml Fungizon e 10% de soro fetal de bovino (FBS) (Invitrogen Life Technologies) numa atmosfera humidificada de 5% de CO<sub>2</sub>.

Os testes biológicos foram realizados do seguinte modo: A viabilidade celular foi medida usando o MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, as células (1 x 10<sup>4</sup> /poços) foram semeadas em placas de 96 poços e tratadas com várias concentrações do derivado tiazacridínico ao longo de um tempo de 72 horas. Utilizou-se o quimioterapêutico Amsacrina como controle positivo para a análise de toxicidade. No final da incubação, a absorvância foi lida a 570 nm. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da UFPE.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia de síntese da molécula LPSF/AA-57 é relativamente simples e apresentou rendimento em torno de 61%, podendo ser considerada uma técnica rápida, eficiente e segura. O composto teve seu Ponto de Fusão (PF) e Índice de Retenção (RF) de 195.8 °C e 0,45 (n-Hexano/AcOEt 7:3), respectivamente. Com a utilização da técnica de Espectrometria de Massa foi possível identificar, através do +MS<sub>2</sub> (Fig. 1), o padrão de fragmentação do composto LPSF/AA-57 onde os seguintes picos m/z foram identificados: o (M+H) m/z = 481, relativo a formação do aduto entre o íon molecular 480 e uma molécula de Hidrogênio; o (M+H) m/z = 193, contendo a porção acridínica e um CH<sub>2</sub>; e o (M+H) m/z = 235, relacionado a porção acridínica e parte do anel tiazolidínico. Também foi possível comprovar a pureza da amostra através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Fig. 2), podendo ser considerada satisfatória (≥99%), em que o composto LPSF/AA-57 teve tempo de retenção (Tr) de 9,845 min. As bandas observadas principais

no Infravermelho do composto do LPSF AA-57 foram de C=C, C-H, C-N e C=O, como pode ser visto na figura 3.

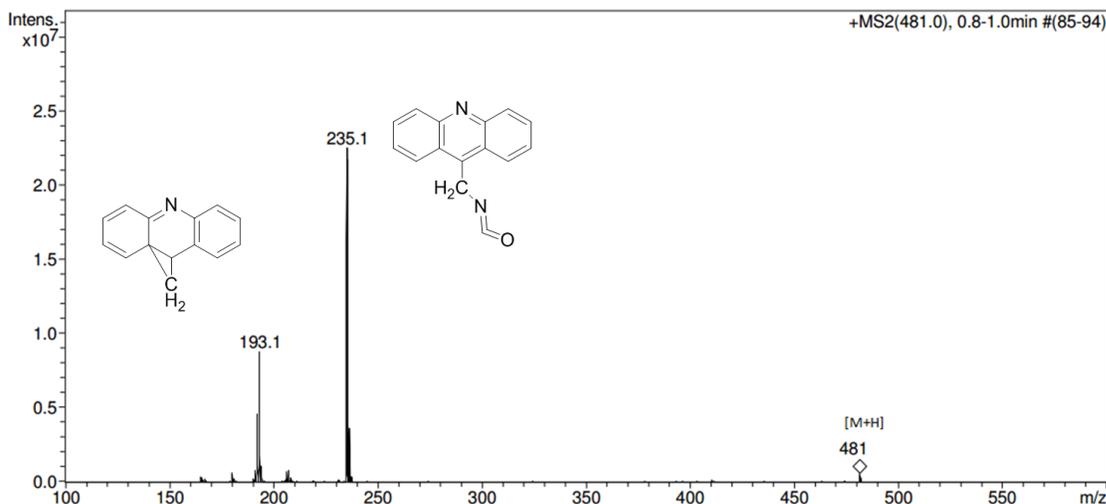
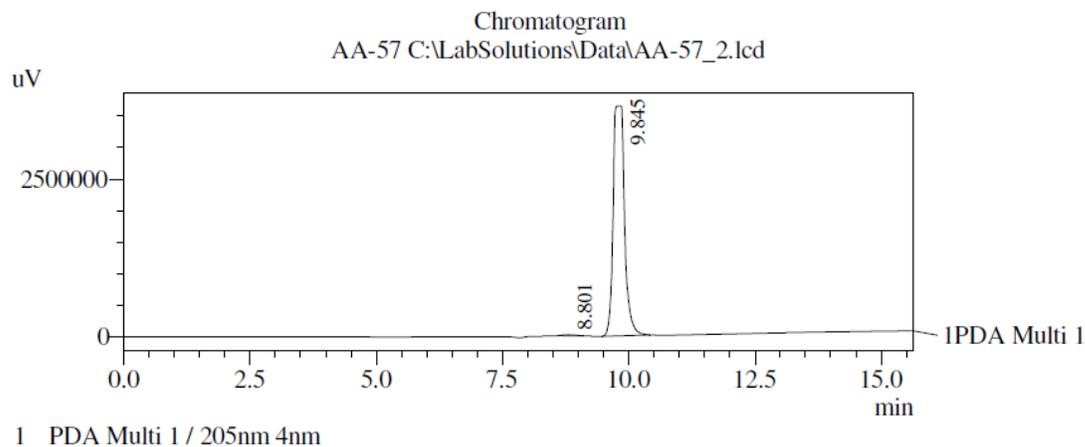


Figura 1- Espectro de Massas (+MS2) por IES do LPSF/AA-57 (M = 308). Identificação dos Fragmentos de m/z 180, 192, 235 e 315.



PeakTable

PDA Ch1 205nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.801	252240	15285	0.440	0.418
2	9.845	57045684	3644339	99.560	99.582
Total		57297924	3659624	100.000	100.000

Figura 2 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e a pureza do composto tiazacridínico AA-57

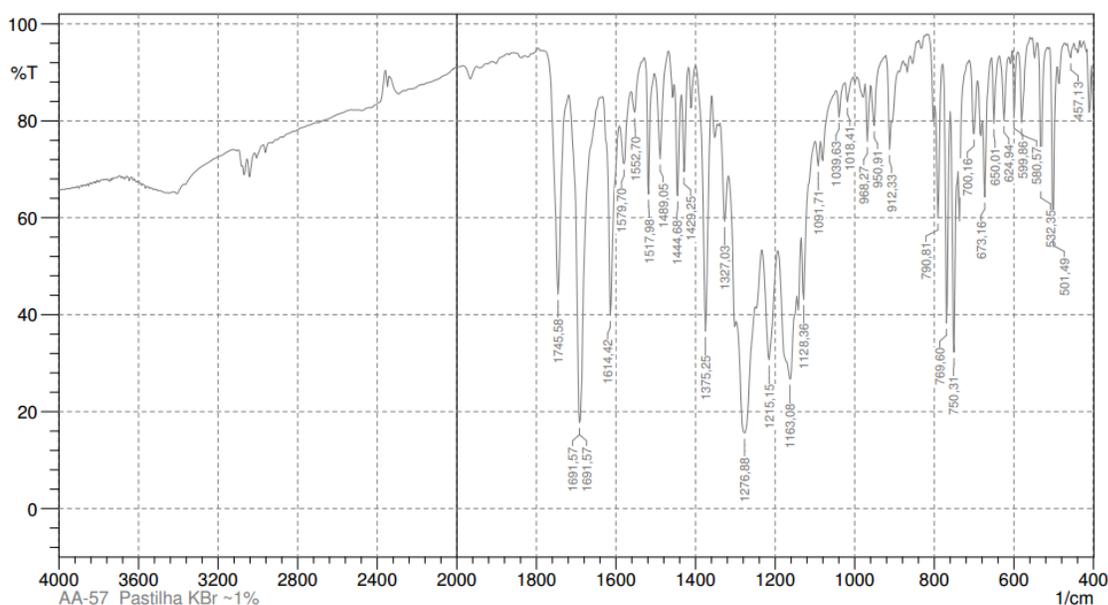


Figura 3- Espectro de IV do LPSF AA- 57. Deformação axial normal de C=O,  $1745\text{ cm}^{-1}$ ,  $1691\text{ cm}^{-1}$ . Deformação axial das ligações C=C do anel,  $1614\text{ cm}^{-1}$ . Deformação axial de C-N,  $1375\text{ cm}^{-1}$ . Deformação angular fora do plano de C-H de aromático,  $750\text{ cm}^{-1}$ . Deformação angular de C=C,  $673\text{ cm}^{-1}$

A citotoxicidade do derivado tiazacridínico foi avaliado contra as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) a partir de indivíduos saudáveis e contra linhagens de células tumorais de diferentes histotipos. O composto foi testado em concentrações de 1, 10 e 100  $\mu\text{M}$  durante 72 horas. As concentrações de droga que inibiu o crescimento celular em 50% em comparação com células não tratadas ( $\text{IC}_{50}$ ) estão resumidos na Tabela 1. Assim ela mostrou atividade anticancer em 3 das linhagens testadas (HL 60, K562, Jurkat), em especial o HL 60.

Tabela 1 – As concentrações do composto AA-57 que inibiram o crescimento celular em 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) em linhagens de células cancerígenas e PBMCs

IC 50 ( $\mu\text{M}$ )							
Linhagens							
Compos	HL 60	K562	Molt-	Du-1	Raji	Jurkat	PBMC
AA-57	$37,77 \pm 18,53$	$51,82 \pm 7,84$	>100	>100	>100	$44,07 \pm 22,55$	>100

## 4. CONCLUSÕES

A metodologia de síntese empregada obteve bom rendimento do composto LPSF/AA-57 que, através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, teve seu grau de pureza considerado satisfatório. Além disso, foi possível comprovar sua estrutura química através do seu padrão de fragmentação no modo +MS2 gerado pela Espectrometria de massa. E os testes



anticâncer mostraram que estes derivados podem ter resultados importantes na busca de compostos mais seletivos e menos tóxicos para o tratamento do câncer. Sendo assim, podemos considerar que a metodologia de síntese aqui descrita é uma excelente forma para se obter derivados tiazacridínicos de forma simples, econômica e segura.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ESTIMATIVA 2014 – INCIDÊNCIA DE CÂNCER NO BRASIL, *Ministério da Saúde* (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva), 2014. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>>. Acesso em: 25 jul. 2014.

GALDINO-PITTA, M. R.; SOUZA, E. S.; BARROS, F. W. A.; MORAES FILHO, M. O.; PESSOA, C. O.; HERNANDES, M. Z.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R. Synthesis and in vitro anticancer activity of novel thiazacridine derivatives. *Medicinal Chemistry Research*.v.28, p.2421-2429, 2013.

GALDINO SL, PITTA IR, LIMA MCA, PITTA MGR, ARAUJO FW, PESSOA, CO, MORAES FILHO MO, PITTA, MGR (2007) Tiazacridinas utilizadas na terapia anticâncer. WO 2013053034 A3.

INCA e Ministério da Saúde apresentam estimativas de câncer para 2016. INCA, 2016.

LANG, X.; LI, L.; CHEN, Y.; SUN, Q.; WUA, Q.; LIU, F.; TAN, C.; LIU, H.; GAO, C.; JIANG, Y. Novel synthetic acridine derivatives as potent DNA-binding and apoptosis-inducing antitumor agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.21, p. 4170–4177, 2013.

RAZA, A.; JACOBSON, B. A.; BENOIT, A.; PATEL, M. R.; DIXON, J. J.; HIASA, H.; FERGUSON, D. M.; KRATZKE, R. A. Novel acridine-based agents with topoisomerase II inhibitor activity suppress mesothelioma cell proliferation and induce apoptosis. *Invest New Drugs*, v.30, p.1443–1448, 2012.

VICTORIA, F.N.; MARTINEZ, D.M.; CASTRO, M.; CASARIL, A.M.; ALVES, D.; LENARDÃO, E.J.; SALLES, H.D.; SCHNEIDER, P.H.; SAVEGNAGO, L. Antioxidant properties of (R)-Se-aryl thiazolidine-4-carboselenoate. *Chemico-Biological Interactions*, p.100-107, 2013.

## 6. AGRADECIMENTOS: NUPIT SG, UFPE, INCT-if, FACEPE, CNPq e CAPES



ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL – PNQM 11

## ***Panax ginseng* NÃO MODIFICA O EFEITO DA FLUOXETINA EM TESTES DE DEPRESSÃO E MEMÓRIA EM RATOS**

H. P. CUNHA<sup>1</sup>, C. de F. C. PEREIRA<sup>1</sup>, L. C. de A. S. LIMA<sup>1</sup>, A. K. B da SILVA<sup>1</sup>, C. L. B. B. BORJA<sup>1</sup>, L. S. de OLIVEIRA<sup>1</sup>, M. B. de S. MAIA<sup>1</sup> e F. S. DUARTE<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Fisiologia e Farmacologia

E-mail para contato: hellencleia.cunha@gmail.com

**RESUMO** – *A polifarmacoterapia tem sido cada vez mais utilizada por pacientes idosos no tratamento de doenças crônicas. Além dos medicamentos prescritos por profissionais de saúde, muitos pacientes buscam a fitoterapia como medicina complementar. Entretanto, o uso concomitante de fitoterápicos com outros medicamentos pode trazer consequências negativas ao paciente do ponto de vista clínico. O presente estudo teve por objetivo analisar a possível interferência do fitoterápico Panax ginseng nos efeitos farmacológicos da fluoxetina em ratos avaliados em testes de depressão e memória. Para isso, ratos Wistar adultos machos foram divididos em três grupos experimentais e tratados por via oral durante 14 dias com veículo (controle), fluoxetina 20 mg/Kg ou P. ginseng 100 mg/Kg + fluoxetina 20 mg/Kg. Posteriormente, os animais foram avaliados nos testes da natação forçada ou campo aberto. Nossos resultados mostraram que a fluoxetina promoveu efeito do tipo antidepressivo no teste da natação forçada, sem interferir nos processos de aprendizado e memória de ratos avaliados no teste do campo aberto. Estes resultados não foram diferentes daqueles vistos para o grupo de animais tratados com P. ginseng + fluoxetina. Podemos concluir que o tratamento por 14 dias com P. ginseng não modifica o efeito da fluoxetina em testes comportamentais de depressão e memória em ratos. Mais estudos são necessários para investigar se P. ginseng é capaz de interferir nos efeitos da fluoxetina.*

**Palavras chave:** Interação medicamentosa; Fluoxetina; Panax ginseng.

**ABSTRACT** – *The polypharmacy has been increasingly used by elderly patients in the treatment of chronic diseases. In addition to medications prescribed by health professionals, many patients seek herbal medicine as complementary medicine. However, concomitant use of herbal medicine with other medicines can bring negative consequences to the patient from a clinical point of view. This study aimed to analyze the possible influence of herbal medicine Panax ginseng in the pharmacological effects*



*of fluoxetine in rats evaluated in depression and memory tests. For this, Wistar adult male rats were divided into three groups and treated orally for 14 days with vehicle (control) fluoxetine 20 mg/kg or P. ginseng 100 mg/kg + fluoxetine 20 mg/kg. Subsequently, the animals were evaluated in forced swimming or open field tests. Our results showed that fluoxetine promoted antidepressant-like effect in the forced swimming test, without interfering in the processes of learning and memory in rats evaluated in the open field test. These results were not different from those observed for the treated group with P. ginseng + fluoxetine. We conclude that the treatment for 14 days with P. ginseng does not alter the effect of fluoxetine in behavioral tests of depression and memory in rats. More studies are needed to investigate whether P. ginseng can interfere with the effects of fluoxetine.*

*Keywords: Drug interactions; Fluoxetine; Panax ginseng.*

## 1. INTRODUÇÃO

Os fitoterápicos são considerados uma modalidade de terapia complementar ou alternativa em saúde e seu uso tem sido crescente na população de diversos países (Marlière *et al.*, 2008). Entretanto, uma das preocupações em relação ao uso de fitoterápicos advém do fato de que muitos usuários têm a falsa ideia de que tais produtos são inócuos e que não apresentam potencial risco de toxicidade por serem "naturais" (Machado *et al.*, 2014). Seus usuários, ou pacientes, na maioria das vezes são idosos que, muito provavelmente, já utilizam outros medicamentos para o tratamento de doenças crônicas e assim, acabam sendo expostos a polifarmacoterapia, que consiste no uso de múltiplos medicamentos pelo mesmo paciente (Hermann; Von Richter, 2012; Alexandre *et al.*, 2008). No entanto, sabe-se que existe a possibilidade de ocorrer algum tipo de interação entre fármacos e componentes químicos presentes nos fitoterápicos, o que pode acarretar alterações nas concentrações plasmáticas de um ou de outro e, assim, mudar o seu respectivo perfil farmacológico (Alexandre *et al.*, 2008; Salvi; Heuser, 2008).

Considerando que um medicamento à base de plantas, tal como o fitoterápico formulado a base de *Panax ginseng*, apresenta diversos componentes químicos em sua fórmula, existe um risco potencial para a ocorrência de interações fármaco-fitoterápico quando estes são utilizados concomitantemente (Qi *et al.*, 2011). O *Panax ginseng* é uma das drogas mais populares do mundo e representa o segundo fitoterápico mais vendido nos Estados Unidos em 2000. Na literatura há vários estudos que descrevem suas diferentes atividades farmacológicas, podendo ser citada as ações anti-inflamatória, antioxidante e anticancerígena, além de melhoria da função psicológica (Auricchio *et al.*, 2007).

A parcela de idosos na população brasileira vem crescendo muito nas últimas décadas. O envelhecimento, sem dúvida, predispõe os idosos a um consumo aumentado de medicamentos prescritos ou não. Fitoterápicos como *P. ginseng* fazem parte do rol de medicamentos utilizados pela população idosa. No entanto, deve-se considerar que boa parte destes pacientes também faz uso crônico de outros medicamentos com ação no sistema nervoso central, como, por exemplo, a

fluoxetina, um dos antidepressivos mais utilizados na clínica (Marin *et al.*, 2008). Dentro desse contexto, o presente trabalho teve por objetivo analisar possíveis interações decorrentes do uso concomitante da fluoxetina e do fitoterápico *P. Ginseng* em modelos animais de laboratório.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais: Ratos Wistar (275 – 450g), mantidos em condições ambientais semelhantes recebendo água “*ad libitum*” e ração. O presente experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, com o protocolo nº CEUA 0010-2015. O número de animais por grupo foi igual a oito, totalizando 24 animais.

2.2. Drogas e soluções: água destilada (veículo), fluoxetina (Daforin®) e o fitoterápico a base de *P. ginseng* (Gerovital®), fabricados pelo mesmo laboratório e comercializados atualmente no mercado farmacêutico, foram comprados em uma farmácia comunitária.

### 2.3. Teste da Natação Forçada

Os animais foram divididos em três grupos experimentais: 1) veículo (grupo controle), 2) fluoxetina 20 mg/Kg (grupo controle positivo) e 3) fluoxetina 20 mg/Kg + *Panax ginseng* 100 mg/Kg (grupo teste). Cada animal passou por duas sessões: sessão treino e sessão teste. Na sessão treino, o animal foi colocado individualmente em um cilindro de PVC contendo água (temperatura de 23±2°C) a uma altura de 25 cm da base, de modo que o animal não conseguisse fugir do cilindro. Passado os 15 minutos de natação forçada, os ratos foram removidos da água, secos com toalhas de papel e em seguida mantidos em uma caixa aquecida com uma lâmpada de 40 W, por 30 minutos, e devolvidos às suas gaiolas de origem. Posteriormente, os ratos foram tratados por via oral com veículo, fluoxetina ou fluoxetina + *Panax ginseng* durante 14 dias, sendo a primeira dose realizada 1 h após o treino e a última dose 1 h antes da sessão teste. Assim, no 14º dia, cada rato foi novamente colocado individualmente em um cilindro de PVC contendo água, nas mesmas condições descritas acima, sendo registrados os seguintes parâmetros comportamentais: latência para o primeiro episódio de imobilidade, período inicial de movimentação após colocar o animal para nadar (fuga desta situação desagradável); tempo total de imobilidade, período em que o animal permanece imóvel realizando apenas movimentos leves necessários para manter-se boiando na água (Slattery e Cryan, 2012).

### 2.4. Avaliação da atividade locomotora no teste do campo aberto (*open-field*)

O campo aberto ou arena foi constituído de madeira coberta com fórmica impermeável branca, com o chão branco de 100 x 100 cm (dividida por linhas pretas em quadrantes) e paredes brancas (40 cm de altura). Os animais foram divididos em três grupos experimentais: veículo, fluoxetina 20 mg/Kg ou fluoxetina 20 mg/Kg + *P. ginseng* 100 mg/Kg e avaliados no teste do campo aberto por três vezes, com a primeira exposição (sessão treino) sendo realizada no 1º dia (antes dos tratamentos) e a segunda e terceira exposições (sessão teste) durante o 7º e 14º dia de tratamento, respectivamente. Na sessão treino, cada rato foi colocado individualmente no centro da arena e a frequência de locomoção foi contabilizada pelo número de quadrantes percorridos, bem como o número de comportamentos de levantar (*rearing*), durante 5 minutos (Kelly, 1993). Na sessão teste, os ratos foram novamente avaliados no teste do campo aberto no 7º e 14º dia de tratamento, durante 5 minutos. A arena foi limpa com solução de etanol 10 % após a avaliação de cada animal.

2.5. Análise estatística: Foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 5.0. Para o protocolo da natação forçada, as comparações estatísticas foram inicialmente realizadas pela análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste *pos-hoc* de Newman-Keuls, com o tratamento sendo a variável independente. Para o protocolo do campo aberto, os dados foram analisados através do teste “*t*” de Student não pareado bicaudal. Todos os dados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de 8 animais por grupo, com níveis de probabilidade inferiores a 5% sendo considerados indicativos de significância ( $P \leq 0,05$ ).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste da natação forçada (figura 1), verificou-se que o tratamento oral por 14 dias com fluoxetina reduziu o tempo total de imobilidade, confirmando seu efeito do tipo antidepressivo em ratos. O tratamento combinado por 14 dias com fluoxetina + *P. ginseng* também reduziu o tempo total de imobilidade neste teste, entretanto, este efeito foi na mesma ordem de magnitude daquele visto para o grupo fluoxetina, não havendo, portanto, diferença estatística entre estes dois grupos.

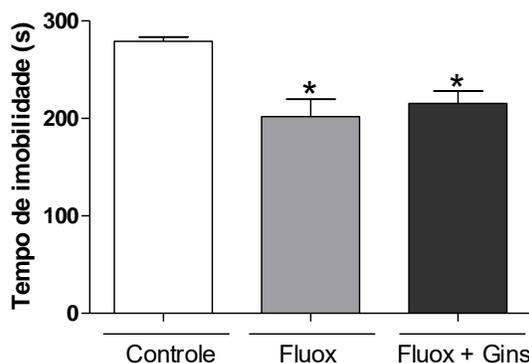


Figura 1. Natação Forçada

O Teste da natação forçada tem sido um dos mais empregados para avaliar a atividade antidepressiva pré-clínica devido a sua fácil utilização, grande reprodutibilidade entre os laboratórios e a habilidade de detectar um grande espectro de agentes antidepressivos (Borsini e Meli, 1988; Cryan et al., 2002). Entretanto, este teste está sujeito a resultados falsos positivos, especialmente para drogas psicoestimulantes ou amnésicas, que também tendem a reduzir o tempo de imobilidade, tal qual faz os antidepressivos, por isso, faz-se necessária à realização de testes complementares para descartar tais interferências. Neste sentido, realizamos o teste complementar do campo aberto. Substâncias estimulantes do sistema nervoso central tendem a aumentar os parâmetros comportamentais registrados neste teste, enquanto que drogas depressoras tendem a diminuí-los (Kelly, 1993).

Nossos resultados no teste do campo aberto (figura 2) mostraram uma diminuição estatisticamente significativa no 7º e 14º dia em relação à primeira exposição ao campo aberto,

indicando que nenhum dos tratamentos foi capaz de interferir nos processos de aprendizado e memória. Além disso, o tratamento com fluoxetina ou a combinação fluoxetina + *P. ginseng* não modificou a movimentação espontânea e o *rearing* quando comparados ao grupo controle. Estes resultados, portanto, confirmam que o efeito antidepressivo da fluoxetina ou da combinação fluoxetina + *P. ginseng* visto anteriormente no teste da natação forçada não é resultante de uma ação amnésica nem psicoestimulante destas drogas. Um estudo feito por Matos (2013), que também realizou um teste de campo aberto em animais tratados com *P. ginseng* nas doses de 100, 200 ou 300 mg/kg, revelou que o comportamento geral dos ratos foi pouco diferente do grupo controle.

No presente estudo percebeu-se que a associação dos fármacos não causou mudanças significativas no comportamento dos animais, sendo então, pouco provável a ocorrência de um sinergismo. Sabe-se ainda que a fluoxetina é uma droga inibidora enzimática envolvida com o citocromo P450 2D6 (Del Porto, 2002), já o *P. ginseng* parece ter pouco efeito no metabolismo de drogas mediadas por CYP (Gurley, 2002), sendo assim, é menos propenso a causar interações farmacocinéticas com a fluoxetina.

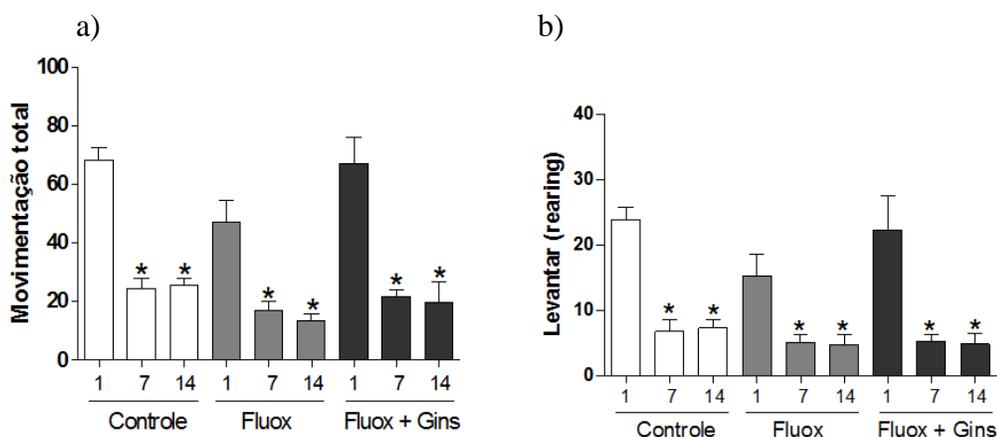


Figura 2. Teste do campo aberto: a) Movimentação total e b) levantamento.

#### 4. CONCLUSÃO

Este estudo sugere que a administração concomitante de *P. ginseng* e fluoxetina em ratos não influencia a ação antidepressiva da fluoxetina em um esquema de tratamento de 14 dias. Entretanto, mais estudos são necessários para afirmar que o *P. ginseng* não interfere nos efeitos da fluoxetina.

#### 5. REFERÊNCIAS

ALEXANDRE, R. F.; BAGATINI, F.; SIMÕES, C. M. O. Interações entre fármacos e medicamentos fitoterápicos à base de ginkgo ou ginseng. *Rev. Bras. de Farmacognosia*, v. 18, n. 1, p. 117-126, 2008.



- AURICCHIO, M. T.; BATISTIC-LONGATTO, M. A.; NICOLETTI, M. A. Avaliação da rotulagem de medicamentos à base de ginseng. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 23, n. 10, p. 2295-2304, 2007.
- BORSINI F, MELI A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology (Berl)*.v.94, n. 2, p.147-60, 1988.
- CRYAN, J.F.; MARKOU, A, LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: Recent developments and future needs. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 23, n. 5, p. 238-245, 2002.
- DEL PORTO, J. A. Como Diagnosticar e Tratar Depressão. *Rev. Bras. Med. Pediat. Mod.*, v. 59, n. 12, p. 97-107, 2002.
- GURLEY, B. J; GARDNER, S. F.; HUBBARD, M. A.; WILLIAMS, D. K; GENTRY, W. B.; CUI, Y.; ANG, C. Y. W. Cytochrome P450 phenotypic ratios for predicting herb-drug interactions in humans. *Clin. Pharmac. & Therap.*, v. 72, n. 3, p. 276-287, 2002.
- HERMANN, R.; VON RICHTER, O. Clinical evidence of herbal drugs as perpetrators of pharmacokinetic drug interactions. *Planta Med*, v. 78, n. 13, p. 1458-77, 2012.
- KELLY, A. E. Locomotor activity and exploration. In: *Behavioural Neuroscience: a Practical Approach*. vol. II. Oxford: Ed. A. Sahgal, 1993. p. 121.
- MACHADO, H. L.; MOURA, V. L.; GOUVEIA, N. M.; COSTA, G. A.; ESPINDOLA, F. S.; BOTELHO, F. V. Pesquisa e atividades de extensão em fitoterapia desenvolvidas pela Rede FitoCerrado: uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos por idosos em Uberlândia-MG. *Rev. bras. plantas med.*, v. 16, n. 3, p. 527-533, 2014.
- MARIN, M. J. S.; CECÍLIO, L. C. O.; PEREZ, A. E. W. U. F.; SANTELLA, F.; SILVA, C. B. A.; GONÇALVES FILHO, J. R.; ROCETI, L. C. Caracterização do uso de medicamentos entre idosos. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 24, n. 7, p. 1545-1555, 2008.
- MARLIÉRE, L. D. P.; RIBEIRO, A. Q.; BRANDÃO, M. G. L.; KLEIN, C. H.; ACURCIO, F. A. Utilização de fitoterápicos por idosos: resultados de um inquérito domiciliar em Belo Horizonte (MG), Brasil. *Rev. Bras. de Farmacognosia*, v. 18 (Supl.), p. 754-760, 2008.
- MATOS, Ana Laura de Souza Almeida. *Avaliação de efeitos toxicológicos e comportamentais de Panax ginseng C.A. Meyer em ratos*. 2013. 60 f. Dissertação (Mestrado em Bioanálises e Medicamentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2013.
- QI, L. W.; WANG, C. Z.; DU, G. J.; ZHANG, Z. Y.; CALWAY, T.; YUAN, C. S. Metabolism of ginseng and its interactions with drugs. *Curr. Drug Metab.*, v. 12, n. 9, p. 818-22, 2011.
- SALVI, R. M.; HEUSER, E. D. *Interações medicamentos x fitoterápicos: em busca de uma prescrição racional*. Porto Alegre: Editora PUCRS, 2008.116 p.
- SLATTERY, D. A.; CRYAN, J. F. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nature Protocols*, v.7, n.6, p. 1009-1014, 2012.

## 6. AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ, ao Laboratório de Neurofarmacologia Experimental - UFPE e ao Laboratório de Farmacologia de Produtos Bioativos – UFPE.



ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL – PNQM 22

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA E ANTIBACTERIANA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE RIZOMAS DE *Limonium brasiliense* (Baicuru)

M. F. CORDEIRO<sup>1</sup>, F. G. BESERRA<sup>1</sup>, G. S. V. de MELLO<sup>2</sup>, I. M. F. CAVALCANTI<sup>3,4</sup>, L. A. A. CAMPOS<sup>3,4</sup>, T. M. ANTONELLI-USHIROBIRA<sup>5</sup>, A. BLAINSKI<sup>5</sup>, J. C. P. de MELLO<sup>5</sup>, I. R. PITTA<sup>1</sup>, M. G. R. PITTA<sup>1</sup>, M. J. B. M. RÊGO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas;

<sup>2</sup> Centro Universitário CESMAC;

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Immunopatologia Keizo Asami;

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pernambuco Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão, Laboratório de Microbiologia e Imunologia (CAV/UFPE);

<sup>5</sup> Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Farmácia, Laboratório PALAFITO.

E-mail para contato: marinafcm@gmail.com

**RESUMO** – *O aumento da comercialização de produtos naturais incita a busca de estudos relacionados às plantas medicinais trazendo em foco a elucidação de suas propriedades biológicas. Neste sentido o presente estudo objetivou avaliar as atividades imunomoduladora e antibacteriana da fração acetato de etila (FAE) de rizomas de Limonium brasiliense. Para a avaliação da atividade imunomoduladora, esplenócitos de camundongos do tipo BLB/c foram obtidos para avaliação da toxicidade da FAE através do ensaio com MTT e para cultura celular com posterior dosagem de citocinas inflamatórias no sobrenadante de cultura: IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-17A e IL-22. A determinação da atividade antibacteriana foi realizada através do método de microdiluição para obtenção da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). A atividade imunomoduladora foi evidenciada em valores significativos na redução da expressão de IL-17A ( $p=0,0078$ ) e IL-22 ( $p=0,031$ ). A FAE apresentou atividade bacteriostática com CIM de 62,5  $\mu\text{g/ml}$  para Staphylococcus aureus e Staphylococcus aureus resistente à meticilina. Os resultados encontrados neste trabalho demonstraram que a fração acetato de etila dos rizomas de L. brasiliense possuem um potencial imunomodulador e bacteriostático possivelmente associado aos taninos caracterizados nesta fração. Contudo, estudos com estas substâncias isoladas desta fração são necessários para o melhor entendimento do mecanismo de ação deste metabólito secundário presente esta fração.*

*Palavras-chave: Citocinas, L. brasiliense, plantas medicinais*

**ABSTRACT** - *Increase natural products commerce encourage the investigation of medicinal plants related studies taking focus its biological properties elucidation. In this sense, this work aims to evaluate immunomodulatory and antibacterial activity of ethyl acetate fraction (EAF) of Limonium brasiliense rhizomes. For the evaluation of immunomodulating activity, splenocytes from BLB / c mice were obtained for assessment of toxicity of FAE by MTT assay and cell culture with subsequent inflammatory cytokine in the culture supernatant: IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-17A and IL-22. The determination of the antibacterial activity was carried out by microdilution method for obtaining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Immunomodulatory activity was found in significant amounts in IL-17A inhibition ( $p = 0.0078$ ) and IL-22 ( $p = 0.031$ ). FAE presented bacteriostatic activity with MIC of 62.5  $\mu\text{g/ml}$  to Staphylococcus aureus and methicillin-resistant Staphylococcus aureus. The results of this study showed that the ethyl acetate fraction of L. brasiliense rhizomes have an immunomodulatory and bacteriostatic potential possibly associated to tannins already identified in this fraction. However, studies with this isolated compound from this fraction are needed to better understand the mechanism of action of this secondary metabolite.*

*Keywords: Cytokines, L. brasiliense, Medicinal plants*

## 1. INTRODUÇÃO

*Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae), é uma erva popularmente conhecida no Brasil como baicuru ou guaicuru. Essa espécie habita pântanos de água salgada nas regiões da costa brasileira e estados da região Sudeste e Sul, incluindo Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Paraná e os países Uruguai e Argentina (Antonelli-Ushirobira *et al.*, 2015). Ela é utilizada na medicina tradicional como antisséptico em infecções do trato geniturinário, como adstringente e depurativo e especialmente usado contra cólicas menstruais e na regulação do período menstrual (Moura *et al.*, 1985). Além destas aplicações, Murray e colaboradores (2004) relataram o uso desta planta no tratamento de hemorragias e de doença reumática, em outras atividades biológicas como as atividades cardio preventiva, antioxidante (Antonelli-Ushirobira *et al.*, 2015), anti-inflamatória (Jahns & Crescente, 1976) e antiviral (Medini *et al.*, 2014).

Dentre os poucos estudos sobre a planta os taninos hidrolizados, leucoantocianinas, flavonoides,  $\beta$ -sitosterol, saponinas e cumarinas são substâncias encontradas em extratos de rizomas *L. brasiliense* (Moura, 1985; Janhs & Crescente, 1974; Murray *et al.*, 2004; Fenner *et al.*, 2006). Outros pesquisadores reportaram a presença de taninos condensados e hidrolizados (epigalocatequina, galocatequina e epigalocatequina-3-*O*-galato), bem como de leucoantocianidinas, ácido



hidroxicinâmico e ácido elágico nos rizomas da planta (Murray *et al.*, 2004).

Entre os anos de 1980 e 1990, preparações farmacêuticas obtidas dos rizomas da planta eram comercializadas no Brasil com o propósito de tratar as infecções do trato geniturinário, porém, a ANVISA cancelou a certificação desses produtos e seu uso foi descontinuado por falta de bases científicas que comprovassem os efeitos biológicos com mais clareza e confiabilidade (Cardoso, 1990; Fenner *et al.*, 2006; Blainski *et al.*, 2013). Desta maneira, há a necessidade de novos estudos que comprovem as atividades biológicas de *L. brasiliense*, sendo por tanto, a elucidação das atividades imunomoduladora e antibacteriana da FAE de rizomas de *L. brasiliense* objeto do presente trabalho.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE *L. brasiliense*

Rizomas de *Limonium brasiliense* foram adquiridos na cidade de Rio Grande, no Estado de Rio Grande do Sul, Brasil no mês de Fevereiro de 2013. Todo o processo de acesso ao material botânico foi autorizado e licenciado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), com número de registro 010252/2015-0. A preparação da fração acetato de etila foi realizada na Universidade Estadual de Maringá no Laboratório PALAFITO particionando-se o extrato bruto (acetona: água (7:3, v/v)) com acetato de etila (Blainski *et al.*, 2013).

### 2.2 ASPECTOS ÉTICOS:

Os procedimentos com animais foram iniciados após aprovação pelo Comitê de Ética Animal – Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (CB-UFPE) sob número de processo 23076.041556/2015-62.

### 2.3 OBTENÇÃO DE ESPLÊNOCITOS

Camundongos do tipo BALB/c, com 45 dias de idade (n=8) foram provenientes do biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> estando de acordo com a Resolução n.1000/2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV). Os camundongos tiveram seus baços retirados e transferidos para placa de Petri contendo Meio RPMI 1640 (Gibco) sendo este levado para cabine de fluxo para desagregação de células. Os esplenócitos em suspensão foram recuperados, filtrados em Cell Strainer 40µm (BD Bioscience) e centrifugados a 300 G por 10 min, com aceleração 6, freio 4. Os esplenócitos foram contados em Câmara de Neubauer e a viabilidade celular determinada pelo método de azul de tripan. Para teste de citotoxicidade da FAE foi realizado o ensaio com MTT nas doses de 10, 50, 100 e 200 µg/mL da FAE realizando-se experimentos em triplicata. Após 48 h em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> e a 37 °C, foi adicionada a solução de MTT (0,5mg/mL), e novamente incubado por 3 h na estufa. Em seguida, foi adicionada a solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) à 20%. A absorbância foi lida em espectrofotômetro de placa a 570nm, após 24 h.

### 2.4 CULTURA DE CÉLULAS



Os esplenócitos foram cultivados em placas de 24 poços ( $2 \times 10^6$  por poço) em Meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com soro bovino fetal 10% (Gibco), HEPES 10mM (Gibco) e penicilina e estreptomicina 200 U/ml (Gibco). As células foram estimuladas com Concanavalina A (ConA) na concentração de 100 ng/ml. Foram utilizados, ainda como controle, um poço apenas com células e outro com Metilprednisolona (MP) na concentração de 100 $\mu$ M. Os poços foram tratados com a FAE de acordo com os resultados do teste de citotoxicidade sendo incubados em doses de 5, 10, 50 e 100  $\mu$ g/mL em estufa a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>.

## 2.5 DOSAGEM DE CITOCINAS

Após as 48 h do início do cultivo, o sobrenadante de cada poço (condição) foi recolhido e colocado em microtubos para a dosagem das citocinas com kits ELISA sanduíche, do *Inglês Immuno Sorbent Enzyme Linked Assay* para camundongo seguindo as informações recomendadas pelos fabricantes. Foram determinados valores para IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , L-17A e IL-22. Os limites inferiores de detecção de kits de ELISA foram de 7,8125 pg/mL para IL-17A (eBiosciences), IL-22 (eBiosciences) e IL-1 $\beta$ , e 4,6875 pg/mL para IFN- $\gamma$  (BD Biosciences).

## 2.6 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A atividade antibacteriana da fração acetato de etila de *L. brasiliense* foi avaliada através do método de microdiluição de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). Inicialmente, placas de 96 poços foram plaqueadas com caldo Mueller-Hinton, e posteriormente a FAE foi diluída em 0,5% DMSO e outras diluições seriadas foram feitas para obtenção de concentrações entre 0,5 a 250  $\mu$ g/mL. Posteriormente as suspensões bacterianas de *Escherichia coli* ATCC 25922, isolado clínico de *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (SARM) ATCC 33591 foram ajustadas para o padrão de turbidimetria de 0,5 da escala de McFarland e diluídas para adquirir uma concentração final de 10<sup>5</sup>CFU/mL em cada poço. As placas foram incubadas a 35  $\pm$  2 °C por 24 h. A atividade antibacteriana foi detectada através da adição de 20  $\mu$ L de uma solução aquosa de TTC (*triphenyl tetrazolium chloride*) a 0,5%. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a concentração mínima da FAE que inibe o crescimento bacteriano através do TTC (Todaro *et al.*, 2013). A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada a partir do plaqueamento em ágar Mueller-Hinton das amostras provenientes da CIM. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

## 2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism® versão 6. A análise de distribuição normal das variáveis foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Após a verificação de uma distribuição não normal das variáveis foi aplicado o teste pareado não paramétrico de Wilcoxon na análise da dosagem das citocinas no sobrenadante de cultura e os gráficos foram representados pelo valor da mediana com seus valores máximo e mínimo.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a dosagem das citocinas pró-inflamatórias foi observado que a FAE possui um potencial imunomodulador nas citocinas analisadas. Em todas as citocinas a FAE apresentou atividade imunomoduladora com perfil dose-resposta e nas citocinas IL-17A (50 µg/ml -  $p=0,0078$ ) e IL-22 (5, 10 e 50 µg/ml  $p=0,031$ ) a FAE apresentou valores significativos de redução da expressão destas citocinas conforme representado na Figura 1.

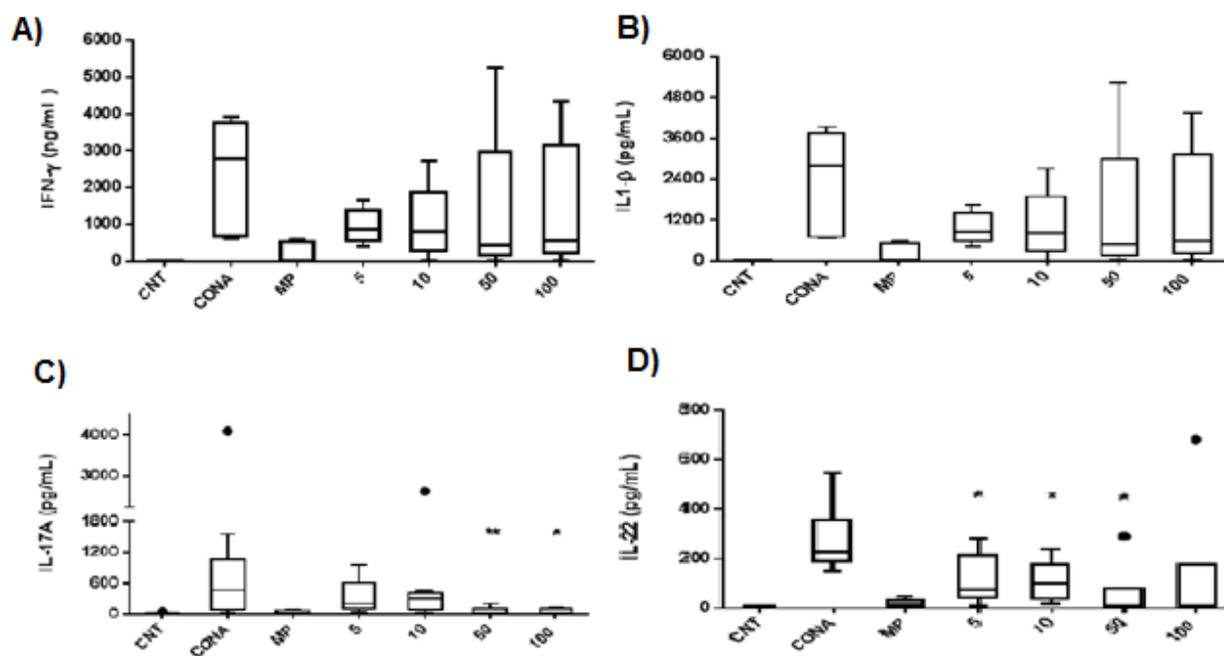


Figura 1 – Gráficos representativos do ensaio ELISA com as citocinas IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-17A e IL-22 após o tratamento com a FAE nas doses de 5, 10, 50 e 100 µg/mL em cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c. A: Expressão de IFN- $\gamma$  após tratamento com FAE. B: Expressão de IL-1 $\beta$  após tratamento com FAE. C: Expressão de IL-17A em esplenócitos na dose de 50 µg/ml -  $p=0,0078$ ) D: Expressão de IL-22 (5, 10 e 50 µg/ml  $p=0,031$ ). Os asterísticos representam o grau de significância (\*  $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ )

Taninos, saponinas, curcuminas, cumarinas e ácido ferúlico são substâncias encontradas em algumas espécies de plantas, e apresentam atividades imunomoduladoras já conhecidas (Rachh *et al.*, 2010). A espécie *Limonium brasiliense* é caracterizada por apresentar em seus rizomas moléculas como taninos, leucoantocianinas ácido hidroxicinâmico e ácido elágico (Blainski, 2010). A atividade anti-inflamatória do baicuru foi demonstrada por Moura (1984) com a inibição do edema de pata provocada pela carragenina em ratos e foi associada principalmente a presença de taninos em seus rizomas. Neste trabalho, a fração acetato de etila proveniente dos rizomas de baicuru contém em sua composição taninos como a galocatequina e epigalocatequina (Blainski *et al.*, 2014) podendo estas substâncias estarem associadas à atividade imunomoduladora identificada principalmente nas

citocinas IL-17A e IL-22.

Quanto à avaliação da atividade antibacteriana a FAE demonstrou efeito bacteriostático frente a todos os isolados testados neste estudo conforme apresentado na Tabela 1. FAE apresentou CIM de 62,5 µg/ml para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SARM) ATCC 33591 e de 250 µg/ml para *Escherichia coli* ATCC 25922 e isolado clínico de *Staphylococcus epidermidis*.

Tabela 1 – Determinação dos valores de CIM e CBM da FAE de rizomas de *L. brasiliense*.

	EAF (µg/ml)	
	CIM	CBM
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	250	>250
Isolado clínico de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	250	>250
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	62,5	>250
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (SARM) ATCC 33591	62,5	>250

Estes resultados estão em consonância os achados de Rosito (1975) em que foi demonstrada a ação bacteriostática do extrato hidroetanólico frente à *E. coli*, *Bacillus mycoides*, *S. aureus*, dentre outros, devido a presença de alguns compostos nos rizomas de *L. brasiliense* como, por exemplo, taninos hidrolisáveis, condensados e saponinas triterpênicas. Em outro estudo a ação antimicrobiana do extrato oxânico de *L. brasiliense* foi demonstrada contra o *B. mycoides*, *E. coli*, *Salmonella typhi* e *Serratia marcescens* (Mota, 1963). Neste contexto, estudos com extratos e frações de plantas medicinais representam a fase inicial de pesquisas para identificação de novas moléculas naturais com potencial antimicrobiano (Radulovic *et al.*, 2013).

#### 4. CONCLUSÃO

A fração acetato de etila de rizomas de *L. brasiliense* apresentou potencial atividade imunomoduladora reduzindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias e efeito bacteriostático principalmente frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.

#### 5. REFERÊNCIAS

ANTONELLI-USHIROBIRA, T.M.; BLAINSKI, A.; FERNANDES, H.G.; MOURA-COSTA, G.F.; COSTA, M.A.; CAMPOS-SHIMADA, L.B.; SALGUEIRO-PAGADIGORRIA, C.L.;



KANESHIMA, E.N.; BECKER, T.C.A.; LEITE-MELLO, E.V.S.; MELLO, J.C.P. Acute toxicity and long-term safety evaluation of the crude extract from rhizomes of *Limonium brasiliense* in mice and rats. *J Ethnopharmacol.*, v.174, p. 293–298, 2015.

BLAINSKI, A. Estudos farmacognósticos, desenvolvimento de metodologia analítica, atividade hormonal, toxicidade aguda e mutagenicidade in vivo de *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. (Plumbaginaceae) – Baicuru. *Tese de doutorado*. Universidade Estadual de Maringá, Paraná, 2010.

BLAINSKI, A.; LOPES, G.C.; DE MELLO, J.C. Application and analysis of the FolinCiocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense*. *Molecules*, v.18, p.6852–6865, 2013.

BLAINSKI, A.; ANTONELLI-USHIROBIRA, T.M.; ISOLANI, R.G.; GABURO, F.; LOPES, G.C.; AGUIAR, B.A.A.; LEITE-MELLO, E.V.S.; MELLO, J.C.P. Determination of gallocatechin and epigallocatechin by high performance liquid chromatography of the roots of *Limonium brasiliense*. *Book Abstract of 14th International Congress of Ethnopharmacology*. International Society of Ethnopharmacology. Graz: Austria, 2014

CARDOSO, M.L.C. *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze, Plumbaginaceae (Baicuru): Desenvolvimento galênico de extratos. *MS Thesis*. Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, 1990.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI M100-S20. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2012.

FENNER, R.; BETTI, A.H.; MENTZ, L.A.; RATES, S.M.K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. *Rev Bras Cienc Farm.*, v.42, p. 369–394, 2006.

JAHNS, R.T.; CRESCENTE, A.S. Ensaios farmacológicos e clínicos com a associação do extrato fluido de *Limonium brasiliense* Boiss, e N-acetil-p-aminofenol em musculatura lisa. *Trib. Pharm.* v.44, p.105-111, 1976.

MEDINI, F.; LEGAULT, J.; PICHETTE, A.; ABDELLY, C.; KSUORI, R. et al. Antiviral efficacy of *Limonium densiflorum* against HSV-1 and influenza viruses. *S. African J. Bot.*, v. 92, p. 65-72, 2014.

MOTA, T.M.B. Substâncias antibióticas em vegetais superiores. Santa Maria. 163p. Tese para concorrer ao título de docente livre da cátedra de Microbiologia - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Santa Maria, 1963.

MOURA, T.F.A.L.; SCHENKEL, E.P.; SCHAPOVAL, E.E.S.; SIMÕES, C.M.O.; SANTOS, R.I. Estudos farmacológicos preliminares das raízes do *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze – Plumbaginaceae (Baicuru). *Cad Farm* v.1, p.45-54, 1985.

MURRAY, A.R.; RODRIGUEZ, S.; RONTERA, M.A.; TOMAS, M.A.; MULET, M.C. Antioxidant metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. *Z. Naturforsch.*, v.59, p.477-480, 2004.

RACHH, P.R.; RACHH, M.R.; GHADIYA, N.R.; MODI, D.C.; MODI, K.P.; PATEL, N.M.; RUPARELIYA, M.T. Antihyperlipidemic activity of *Gymenma sylvestre* R. Br. leaf extract on rats fed with high cholesterol diet. *Int. J. Pharmacol.*, v.6, p.138-141, 2010.



RADULOVIC, N.S.; BLAGOJEVIC, P.D.; STOJANOVIC,-RADIC, Z.Z.; STOJANOVIC,-RADIC, N.M. Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action. *Curr. Med. Chem.*, v. 20, n. 7, p. 932-952, 2013.

ROSITO, J.F. Contribuição à análise das raízes de *Limonium brasiliense* (Boiss.). Em: Moura, TFAL, Schenkel, EP, Schapoval, EES, Simões, CMO, Santos, RI. 1985. Estudos farmacológicos preliminares das raízes do *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze – Plumbaginaceae (Baicuru). *Cad Farm.*, v.1, p.45-54, 1975.

TODARO, A.; ADLY, F.A.; OMAR, O.H. History, Processing and Quality Enhancement of Traditional Egyptian Kareish Cheese: A Review. *Food Sci & Technol.*, v.1:, p.1-6, 2013.

## **6. AGRADECIMENTOS**

Ao CNPq, INCT-if, CAPES e FACEPE.



ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL – PNQM 24

## ANÁLISE *in VITRO* DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DA *Trichilia catigua* A. JUSS.

F. G. BESERRA<sup>1</sup>, M. F. CORDEIRO<sup>1</sup>, G.S.VIEIRA DE MELLO<sup>2</sup>, R. LONGHINI<sup>3</sup>, J. C. P. MELLO<sup>3</sup>, I. R. PITTA<sup>1</sup>, M. G. R. PITTA<sup>1</sup>, M. J. B. M. RÊGO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas

<sup>2</sup> Centro Universitário CESMAC

<sup>3</sup> Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Farmácia, Laboratório PALAFITO  
E-mail para contato: naaanda.gb@gmail.com

**RESUMO** – *O uso de plantas medicinais é uma prática antiga que perdura até os dias atuais devido a algumas propriedades biológicas encontradas em algumas delas. Trichilia catigua A. Juss., popularmente conhecida como catuaba, é usada na medicina tradicional principalmente como estimulante sexual e possui algumas atividades biológicas conhecidas como a atividade antiviral, anticâncer e antioxidante. A atividade imunomoduladora da catuaba ainda é pouco elucidada, desta forma este estudo tem por objetivo avaliar a capacidade de imunomodulação do extrato bruto e das frações aquosa e acetato de etila das cascas da catuaba. Foram utilizados esplenócitos de 12 comundongos Balb/c para a cultura com os derivados da T. catigua e após 48 h, o sobrenadante foi retirado para quantificação das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-17A e IL-22. A análise dos resultados mostrou uma redução significativa na expressão de IFN- $\gamma$  e de IL-17A após tratamento com o extrato bruto ( $p=0,01$ ;  $p= 0,0001$ , respectivamente). Já a fração acetato de etila apresentou uma redução significativa na expressão de IL-22( $p=0,02$ ). Estudos anteriores sugerem que esta capacidade é devida à presença de metabólitos secundários como taninos, tanto no extrato bruto como na fração acetato de etila de catuaba. Neste contexto, T. catigua conseguiu reduzir significativamente a expressão das citocinas apresentando potencial imunomodulador. Palavras-chave: Catuaba; Taninos; Imunomodulação; Citocinas.*

**ABSTRACT** – *The use of medicinal plants is an ancient practice that endures to the present days because of some biological property found in some of them. Trichilia catigua A. Juss, popularly known as catuaba, is used in traditional medicine as sexual*



*stimulant and present some known biological activities, such as antiviral, anticancer and antioxidant. The immunomodulatory activity of catuaba is few elucidated, thus this study*

*aims to evaluate the immunomodulatory capacity of crude extract and aqueous and ethyl-acetate fractions of catuaba barks. Twelve Balb/c mice splenocytes were used for the culture with *T. Catigua* derivative and after 48 hours, the supernatant was removed for cytokine stitration. Results analysis showed a significant reduction in IFN-g and IL-17A expression after crude extract treatment  $p=0,01$ ;  $p= 0,0001$ , respectively). The ethyl acetate fraction presented significant reduction on IL-22 expression ( $p=0,02$ ). Previous studies suggest that this capacity is due to the presence of secondary metabolites like tannins in these crude extract and ethyl acetate fraction. In this context, *T. Catigua* was able to reduce the expression of cytokines, showing an immunomodulatory potential.*

*Keywords: Catuaba; Tannins; Imunnomodulation; Cytokines*

## 1. INTRODUÇÃO

Conhecida como catuama, catuaba ou catiguá, *Trichilia catigua* A. Juss. é uma planta encontrada em alguns países da América do Sul (Chassot *et al.*, 2011) e é empregada empiricamente na medicina tradicional como afrodisíaco, neuroestimulante, no tratamento do estresse, fadiga, impotência e problemas de memória (Kamdem *et al.*, 2012). Vários estudos abordaram a existência de atividades farmacológicas como efeitos antidepressivos, anti-inflamatórios, antioxidante, antimicrobianos. Além disso, a segurança de efeitos não tóxicos dos extratos já foi previamente demonstrada em testes com voluntários sadios (Oliveira *et al.*, 2005).

Estudos sobre a ação antinociceptiva dos extratos de catuaba revelaram bons resultados *in vivo*, porém neste mesmo trabalho foi observado que mediadores pró-inflamatórios como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e prostaglandina E não apresentavam alterações indicando que o extrato de catuaba não possui ação anti-inflamatória (Viana *et al.*, 2011). Já Barbosa *et al.* (2004) analisaram a ação anti-inflamatória de extratos de catuaba sugerindo a utilização da planta para estudos futuros com a finalidade da descoberta de uma nova classe de agentes anti-inflamatórios. Diante disso este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade imunomoduladora do extrato bruto (EB) e das frações aquosa (FAq) e acetato de etila (FAE) das cascas de catuaba.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DO EXTRATO E FRAÇÕES DA *Trichilia catigua* A. Juss

Os extratos foram obtidos em parceria com o Laboratório PALAFITO na Universidade Estadual de Maringá, preparados de acordo com o método de Chassot *et al.* (2011).

### 2.2 CULTURA DE ESPLÊNOCITOS E ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Doze camundongos da espécie Balb/c foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> (após

recebimento do parecer do comitê de ética animal sob número de processo 23076.041556/2015-62) para a retirada dos baços. Estes foram colocados em Placa de Petri contendo meio RPMI 1640 e levados para cabine de fluxo objetivando desagregar os esplenócitos. Após a desagregação, foi realizado processo de purificação destes para o teste de citotoxicidade e cultura celular. No processo de purificação os esplenócitos foram filtrados em Cell Strainer 40 $\mu$ m (BD Bioscience) e centrifugados a 300 G por 10 min, com aceleração 6, freio 4. Os esplenócitos foram contados em Câmara de Neubauer e a viabilidade celular determinada pelo método de azul de tripan. Para teste de citotoxicidade do extrato e frações de catuaba foi realizado o ensaio com MTT nas doses de 10, 50, 100 e 200  $\mu$ g/mL do EB, FAq e FAE realizando-se experimentos em triplicata. Após 48 h em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> e a 37°C, foi adicionada a solução de MTT (0,5mg/mL), e novamente incubado por 3 h na estufa. Em seguida, foi adicionada a solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) à 20%. A absorbância foi lida em espectrofotômetro de placa a 570nm, após 24 h.

### 2.3 CULTURA DE CÉLULAS

Após a análise de citotoxicidade do EB e das frações da catuaba foi realizada a cultura de esplenócitos nas doses que não foram tóxicas a estas células. Os esplenócitos foram cultivados em placa de 24 poços contendo 2x10<sup>6</sup> células/poço em Meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino durante 48 h. As células foram estimuladas com Concanalina A na concentração 100 ng/mL e tratadas com EB, FAq e FAE nas doses 5, 10, 50 e 100  $\mu$ g/mL. Além disso, foi utilizado um poço sem tratamento (controle negativo) e outro poço com metilprednisolona (fármaco padrão) na dose de 100  $\mu$ M.

### 2.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA

Após 48 h de tratamento com o EB, FAq e FAE de *T. catigua* foi retirado o sobrenadante das culturas para avaliar os níveis das citocinas através de ELISA. As citocinas mensuradas foram: INF- $\gamma$ , IL-17A e IL-22. Os níveis de detecção dos Kits usados neste estudo foram os seguintes: 9,3 pg/mL para IFN- $\gamma$  (BD Biosciences), 15,6 pg/mL para IL-17A (eBiosciences) e 15,6 para IL-22 (eBiosciences).

### 2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através do software GraphPad Prism® versão 6. A análise de distribuição normal das variáveis foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Constatada uma distribuição não normal das variáveis foi aplicado o teste não paramétrico de Wilcoxon na análise da dosagem das citocinas no sobrenadante de cultura e os gráficos foram representados pelo valor da mediana com seus valores máximo e mínimo.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das dosagens de citocinas, pode-se observar a redução dos níveis de INF- $\gamma$ , IL-17A e IL-22 após o tratamento com EB, FAq e FEA de *T. catigua* conforme apresentado na Figura 1.

O extrato bruto e as frações de catuaba apresentaram redução na expressão de INF- $\gamma$  com perfil dose-resposta, demonstrando redução significativa nas doses de 50  $\mu$ g/mL e 100  $\mu$ g/mL do EB

( $p=0,03$ ;  $p=0,01$ , respectivamente). Os extratos e frações também reduziram os níveis da citocina IL-17A nas mesmas doses (EB:  $p=0,03$ ;  $p=0,0001$ ; FAq:  $p=0,005$ ;  $p=0,01$ ; FEA:  $p=0,004$ ;  $p=0,003$ , respectivamente) e a expressão de IL-22 foi reduzida apenas na dose de 100  $\mu\text{g/mL}$  do EB e FAq e nas doses de 50  $\mu\text{g/mL}$  e 100  $\mu\text{g/mL}$  da FEA ( $p=0,02$ ;  $p=0,03$ , respectivamente).

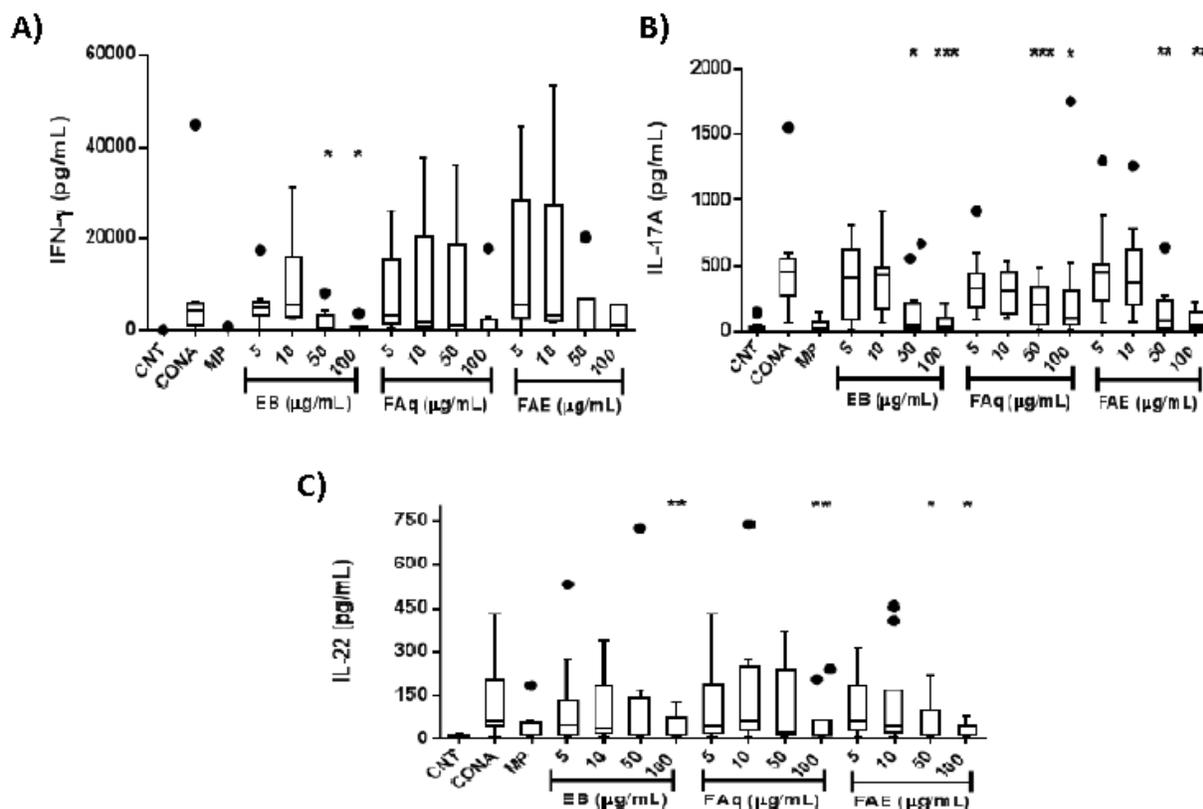


Figura 1: Gráficos representativos das dosagens das citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$ , IL-17A e IL-22 sob exposição às frações da catuaba. A: IFN- $\gamma$  EB 50  $\mu\text{g/mL}$  e 100  $\mu\text{g/mL}$  ( $p=0,03$ ;  $p=0,01$ , respectivamente). B: IL-17A 50  $\mu\text{g/mL}$  e 100  $\mu\text{g/mL}$  (EB:  $p=0,03$ ;  $p=0,0001$ ; FAq:  $p=0,005$ ;  $p=0,01$ ; FEA:  $p=0,004$ ;  $p=0,003$ , respectivamente). C: Expressão de IL-22 dose de 100  $\mu\text{g/mL}$  do EB e FAq e nas doses de 50  $\mu\text{g/mL}$  e 100  $\mu\text{g/mL}$  da FEA ( $p=0,02$ ;  $p=0,03$ , respectivamente). Os níveis de significância estão expressos de acordo com a quantidade de asteriscos (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ ).

Barbosa *et al.* (2004) evidenciaram inicialmente a atividade anti-inflamatória do extrato hidro alcoólico das cascas de catuaba através da inibição da PLA<sub>2</sub> uma fosfolipase envolvida no processo inflamatório. Há, na literatura relatos que alguns metabólitos secundários como os taninos condensados, por exemplo, as procianidinas possuem atividade anti-inflamatória conforme evidenciado por Terra *et al.* (2009). No estudo eles identificaram uma redução nos níveis de expressão de IL-6 através do tratamento com procianidina proveniente de sementes de uva.



Em estudos recentes realizado por Dos Santos *et al.*(2015) e Longhini (2013) foi evidenciada a presença de taninos condensados como a procianidina B2 e a epicatequina em nossas amostras de EB e na FAE das cascas de catuaba. Desta forma, pode-se associar os resultados encontrados neste estudo à presença de taninos no EB e na FAE das cascas de catuaba. Em geral, a fração aquosa contém taninos condensados de maior massa molecular o que torna difícil sua caracterização, podendo, portanto, apresentar também uma atividade imunomoduladora relacionada aos taninos. O EB apresentou redução significativa na expressão de todas as citocinas analisadas apresentando melhor desempenho deste extrato. Em geral, o EB de plantas medicinais contém uma quantidade maior de substâncias em sua composição podendo estas agirem em sinergismo para potencializar seus efeitos biológicos (Machana *et al.*, 2012).

#### 4. CONCLUSÃO

A partir do referido estudo, foi possível concluir que o extrato e as frações da *Trichilia catigua* possuem atividade imunomoduladora, uma vez que conseguiram reduzir os níveis das citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$ , IL-17A e IL-22.

#### 5. REFERÊNCIAS

- ATANASOV, A.G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E.M.; LINDER, T.; WAWROSCHEK, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E.H.; ROLLINGER, J.M.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J.M.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M.D.; KOPP, B.; BAUER, R.; DIRSCH, V.M.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol.Adv.*, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, Vienna: Editora Elsevier, 2015.
- BARBOSA, N.R.; FISCHMANN, L.; TALIB, L.L.; GATTAZ, W.F. Inhibition of platelet phospholipase A2 activity by catuaba extract suggests antiinflammatory properties. *Phytother.Res.*, v. 18, n. 11, p. 942-944, 2004.
- CHASSOT, J.M.; LONGHINI, R.; GAZARINI, L.; MELLO, J.C.P.; DE OLIVEIRA, R.M.W. Preclinical evaluation of *Trichilia catigua* extracts on the central nervous system of mice. *J. Ethnopharmacol.*, v.137, p. 1143-1148, 2011.
- DOS SANTOS, A.H.; RAMOS, A.C.; SILVEIRA, K.M.; KISS, A.C.; LONGHINI, R.; DINIZ, A.; DE MELLO, J.C.; GERARDIN, D.C. The exposure to *Trichilia catigua* (catuaba) crude extract impairs fertility of adult female rats but does not cause reproductive damage to male offspring. *J. Ethnopharmacol.*, v. 166, p. 86-91, 2015.
- DUTRA R. C., CAMPOS, M. M., SANTOS, A. R. S., CALIXTO, J.B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacol.Res.*, v. 112, p. 4-29, 2016.
- KAMDEM, J.P.; STEFANELLO, S.T.; BOLIGON, A.A.; WAGNER, C.; KADE, I.J.; PEREIRA, R.P.; PRESTE, A.D.E.S.; ROOS, D.H.; WACZUK, E.P.; APPEL, A.S.; ATHAYDE, M.L.; SOUZA,



D.O.; ROCHA, J.B. In vitro antioxidant activity of stem bark of *Trichilia catigua* A.Juss. *Acta Pharm.*, v. 62, n. 3, p. 371-382, 2012.

LONGHINI, R. Desenvolvimento de forma farmacêutica sólida comprimido contendo extrato seco por aspersão de *Trichilia catigua*. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2013.

MACHANA, S. Synergistic anticancer effect of the extracts from *Polyalthia evecata* caused apoptosis in human hepatoma (HepG2) cells. *Asian Pac J Trop Biomed.*, v. 2, p. 589-596, 2012.

OLIVEIRA, C.H.; MORAES, M.E.; MORAES, M.O.; BEZERRA, F.A.; ABIB, E.; DE NUCCI, G. Clinical toxicology study of an herbal medicinal extract of *Paullinia cupana*, *Trichilia catigua*, *Ptychopetalumolacoides* and *Zingiber officinale* (Catuama®) in healthy volunteers. *Phytother. Res.*, v. 19, n. 1, p. 54-57, 2005.

TERRA, X.; MONTAGUT, G.; BUSTOS, M.; LLOPIZ, N.; ARDÈVOL, A.; BLADÉ, C.; FERNÁNDEZ-LARREA, J.; PUJADAS, G.; SALVADÓ, J.; AROLA, L.; BLAY, M. Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet. *J. Nutr. Biochem.*, v.20, p. 210–218, 2009.

VIANA, A.F.; MACIEL, I.S.; MOTTA, E.M.; LEAL, P.C.; PIANOWSKI, L.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive activity of *Trichilia catigua* hydroalcoholic extract: new evidence on its dopaminergic effects. *Evid Based Complement Alternat Med.*, v. 2011, 2011.

## 6. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, INCT-if, CAPES e FACEPE.



ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL – PNQM 25

## ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA EM UVB DE DIFERENTES EXTRATOS VEGETAIS

C.M.CAVALCANTI<sup>1</sup>; R.M.XIMENES<sup>2</sup>

Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Antibióticos.

Email para contato: [milamcavalcanti@hotmail.com](mailto:milamcavalcanti@hotmail.com).

*RESUMO- A exposição excessiva ao sol pode comprometer a saúde da pele, sendo os raios ultravioleta (UV) os maiores responsáveis pelas alterações fotocutâneas. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade fotoprotetora dos extratos vegetais de *Caesalpinia ferrea*(Jucá), *Fridericia chica*, *Krameria tomentosa*, *Tilandsia recurvata*, *Tilandsia streptocarp*, *Mimosa tenuiflora* e *Triplaris gargneriana* (Pajeú), por método espectrofotométrico. Através da leitura dos extratos demonstrou que os mesmos apresentaram baixos Fatores de Proteção Solar (FPS) porém a prospecção desse estudo está apenas no início, sendo necessário a verificação da associação dos extratos mais promissores, como *Caesalpinia ferrea*, com substâncias sintéticas promovendo assim maior FPS com maior segurança e estabilidade.*

*Palavras-chave: Ultravioleta, Caesalpinia ferrea, FPS.*

*ABSTRACT- Excessive sun exposure can compromise the health of the skin, and ultraviolet (UV) the most responsible for fotocutâneas changes. This study aimed to evaluate the photoprotective activity of plant extracts of *Caesalpinia ferrea* (Juca), *Fridericia chica*, *Krameria tomentosa*, *recurvata* *Tilandsia*, *Tilandsia streptocarp*, *Mimosa tenuiflora* and *Triplaris gargneriana* (Pajeú) by spectrophotometric method. By reading the extracts showed that they had low sun protection factors (SPF) but the prospect of this study is just beginning, and a considerable verify the association of the most promising extracts, as *Caesalpinia ferrea* with synthetic substances thus promoting higher SPF with greater security and stability.*

*Keywords: Ultraviolet, Caesalpinia ferrea, FPS.*

### 1- INTRODUÇÃO

O sol é visto como fonte de energia e calor, sendo necessário para todo ser vivo. No entanto, a exposição contínua e prolongada pode acarretar vários danos, tanto na superfície corporal como em camadas mais internas da pele, levando assim a sérios problemas como o



envelhecimento precoce, predisposição a riscos como o câncer de pele, e queimadura solar causada principalmente por raios UVB.

A radiação ultravioleta emitida pelo sol subdividem-se em três: Ultravioleta C ou UVC (200-290nm), que não atinge a superfície terrestre; Ultravioleta B ou UVB (290-320nm); Ultravioleta A (320-400nm) que penetra nas camadas mais profundas da pele causando danos à saúde.(BRASIL, 2002).

De acordo com Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 47 de 16 de março de 2006 (BRASIL a, 2006), filtros solares são substâncias que, quando adicionadas aos produtos para proteção solar, tem a finalidade de filtrar certos raios ultravioletas visando proteger a pele de certos efeitos danosos causados por estes raios.

A eficácia de um protetor solar é medida em função de seu fator de proteção solar (FPS), o qual teoricamente é definido como a razão entre Dose Eritematógena Mínima (DEM) da pele protegida e a DEM da pele desprotegida (Milesi; Guterres, 2002). Uma maneira mais fácil de conseguir alto FPS é aumentando a quantidade de filtros na fórmula. Todavia o aumento da quantidade de filtro pode elevar o potencial de sensibilização e irritação da pele, dificultando assim a obtenção de formulações estáveis (Ribeiro, 2006). Com isso, tanto a quantidade de filtros quanto as suas concentrações devem ser as menores possíveis, tornando o produto mais viável e com potencial irritante menor (Milesi; Guterres, 2002).

O teor de flavonóides, antocianinas e os derivados do ácido cinâmico são considerados importantes para proteção das plantas frente aos raios UV (Souza *et al.*, 2005.) Eles atuam dissipando a radiação absorvida de maneira não ofensiva. (Ramos; Santos; Dellamora-Ortiz, 2010).

Com este intuito, vários estudos têm sido realizados para avaliar a atividade fotoprotetora de espécies da flora brasileira (PoloninI, 2011). Desta forma, os extratos de plantas que serão estudados nesta pesquisa por conta do seu potencial fotoprotetor são de *Caesalpinia ferrea* (Jucá), *Fridericia chica*, *Krameria tomentosa*, *Tilandsia recurvata*, *Tilandsia streptocarpa*, *Mimosa tenuiflora* e *Triplaris gargneriana* (Pajeú).

O objetivo da presente pesquisa foi avaliar a atividade fotoprotetora destes extratos vegetais e de verificar o extrato com uma possível maior atividade fotoprotetora em relação aos outros. Foi realizado a análise de espectrofotometria em UV utilizando uma concentração de 2% de cada extrato.

## 2- MATERIAIS E MÉTODOS

Os extratos vegetais utilizados na pesquisa foram de *Caesalpinia ferrea* (Jucá), *Fridericia chica*, *Krameria tomentosa*, *Tilandsia recurvata*, *Tilandsia streptocarpa*, *Mimosa tenuiflora* e *Triplaris gargneriana* (Pajeú) os quais foram coletadas no estado de Pernambuco, e armazenadas a temperatura ambiente até que estivessem completamente secas, sendo posteriormente trituradas. Em seguida, foram realizadas duas extrações de cada planta, uma utilizando-se etanol 95 PA e para a preparação da outra extração foi usado 50% de água e 50% de etanol 95 PA (ALPHATEC) resultando em uma proporção de 1:1, depois ambos os extratos foram filtrados com o auxílio de um funil.

O método para determinação do fator de proteção solar (FPS) destes extratos foi realizado seguindo o método espectrofotométrico *in vitro* desenvolvido por Mansur *et al.* (1986). Cada extrato foi obtido a 2% m/v, posteriormente foi retirado uma alíquota de 0,1 ml de cada extrato e diluído em 10 ml de álcool etílico 95 PA até obtenção da concentração de 0,2 g/mL. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Thermo scientific), nos comprimentos de onda de 280 a 380 nm em intervalos de 2 nm. O FPS foi calculado seguindo a equação  $FPS = FC \times 290 \sum_{320} EE(\lambda) \times i(\lambda) \times Abs(\lambda)$ , onde o FC é o fator de correção igual a 10;  $EE(\lambda)$  é o efeito eritematogênico da radiação solar em cada comprimento de onda  $\lambda$ ;  $i(\lambda)$  é a intensidade da luz solar no comprimento de onda  $\lambda$ ;  $Abs(\lambda)$  é a leitura espectrofotométrica da absorbância da amostra em cada comprimento de onda. O branco utilizado nas análises foi o álcool etílico 95 PA e como controle positivo foi utilizado o ácido gálico e quercetina.

A relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda ( $EE \times i$ ) é constante e está descrita na Tabela 1.

Comprimento de onda (nm):	EE x I(normalizado), valores relativos.
290	0.0150
295	0.0817
300	0.2874
305	0.3278
310	0.1864
315	0.0839
320	0.0180
<b>Total:</b>	<b>1</b>

Tabela 1- Ponderação empregada no cálculo do FPS por espectrofotometria (SAYRE *et al.*, 1979)

### 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados na figura 1 e 2 evidenciam que o extrato de Jucá apresentou atividade fotoprotetora mais promissora que os demais extratos avaliados.

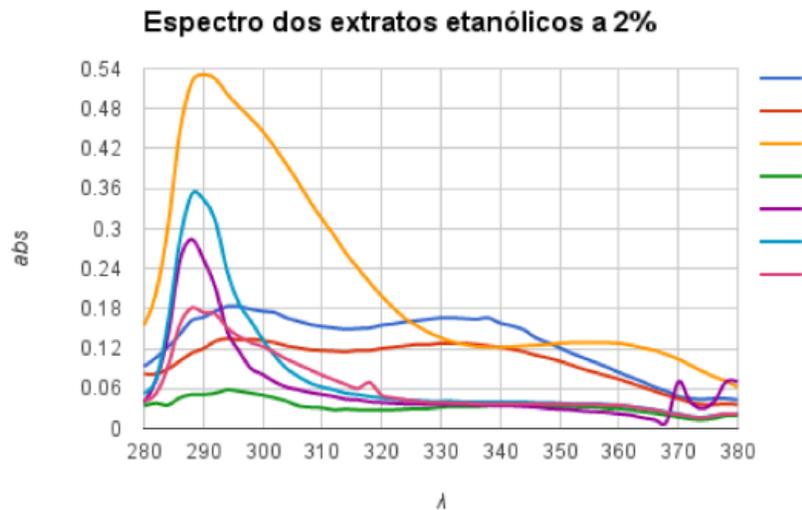


Figura 1: Azul escuro: *Tilandsia strep*; Vermelha: *Tilandsia recurvata*; Amarelo: Jucá; Verde: *Fridericia*; Roxo: *Krameria*; Azul claro: *Mimosa*; Rosa: *Pajeú*.

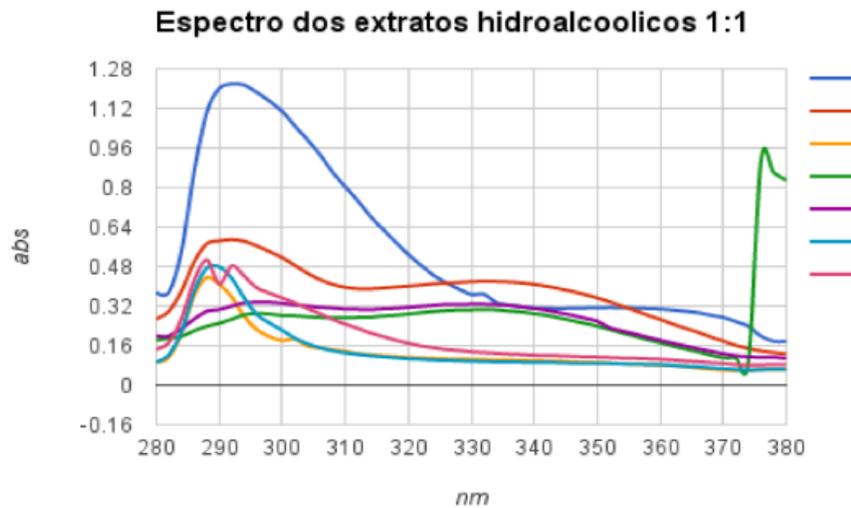


Figura 2: Azul escuro: Jucá; Vermelha: *Fridericia*; Amarelo: *Krameria*; Verde: *Tilandsia strep*; Roxo: *Tilandsia recurvata*; Azul claro: *Mimosa*; Rosa: *Pajeú*.

Tabela 2- Relação entre os maiores valores observados de comprimento de onda e absorvância com o extrato etanólico

Extratos etanólico	C.F	F.C	K.T	T.R	T.S	M.T	T.G	QC	AG
nm	290	294	288	294	296	286	288	378	310
abs	0,531	0,058	0,284	0,135	0,183	0,351	0,181	2,985	2,499

\* C.F(Caesalpinia ferrea); F.C(Fridericia chica); K.T(Krameria tomentosa); T.R(Tilandsia recurvata); T.S(Tilandsia streptocarp); M.T(Mimosa tenuiflora); T.G (Triplaris gargneriana); QC(quercetina) e AG(ácido gálico).

Tabela 3- Relação entre os maiores valores observados de comprimento de onda e absorvância com o extrato hidroetanólico com proporção de 1:1

Extratos (1:1)	C.F	F.C	K.T	T.R	T.S	M.T	T.G	QC	AG
nm	292	292	288	298	298	290	288	378	310
abs	1,219	0,589	0,436	0,288	0,335	0,479	0,508	2,985	2,499

\* C.F(Caesalpinia ferrea); F.C(Fridericia chica); K.T(Krameria tomentosa); T.R(Tilandsia recurvata); T.S(Tilandsia streptocarp); M.T(Mimosa tenuiflora); T.G (Triplaris gargneriana); QC(quercetina) e AG(ácido gálico).

A avaliação da atividade fotoprotetora dos extratos vegetais puros através de análises espectrofotométricas pode ser observada na Tabela 4 e 5, onde mostra que o extrato de *Jucá* foi o que apresentou maior valor de FPS (0,3184). Os resultados obtidos demonstraram que os extratos puros quando analisados pela sua capacidade fotoprotetora, apresentaram baixos FPS.

Tabela 4- Relação das absorvâncias de extratos etanólicos com o efeito eritematígeno e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda (EE x i)

$\lambda$ /nm	EE x I	C.F	F.C	K.T	T.R	T.S	M.T	T.G	QC	AG
290	0,015	0,0079	0,0007	0,0038	0,0018	0,0025	0,0051	0,0026	0,657	1,235
300	0,2874	0,1281	0,0143	0,0232	0,0379	0,05	0,0382	0,0353	0,683	2,303
310	0,1864	0,0585	0,0057	0,0009	0,0211	0,0285	0,0115	0,0149	0,784	2,499
320	0,018	0,0035	0,0005	0,0007	0,0021	0,0027	0,0008	0,0009	0,939	1,153
$\Sigma$ 290-320nm										
FPSxFC (maior)		1,2	0,1	0,2	0,3	0,5	0,3	0,3	9,3	24,9
FPS (ref) =										
5,6 $\pm$ 5,3										

\* *C.F(Caesalpinia ferrea)*; *F.C(Fridericia chica)*; *K.T(Krameria tomentosa)*; *T.R(Tilandsia recurvata)*; *T.S(Tilandsia streptocarpus)*; *M.T(Mimosa tenuiflora)*; *T.G (Triplaris gargneriana)*; *QC(quercetina)* e *AG(ácido gálico)*.

Tabela 5- Relação das absorbâncias extratos hidroetanólicos com o efeito eritematígeno e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda (EE x i)

$\lambda$ /nm	EE x I	C.F	F.C	K.T	T.R	T.S	M.T	T.G	QC	AG
290	0,015	0,018	0,0087	0,006	0,0037	0,0045	0,0071	0,0061	0,657	1,235
300	0,2874	0,3184	0,1482	0,052	0,081	0,0951	0,0638	0,1014	0,683	2,303
310	0,1864	0,1496	0,0738	0,025	0,0508	0,0574	0,0244	0,0460	0,784	2,499
320	0,018	0,0095	0,0072	0,002	0,0051	0,0056	0,0019	0,0030	0,939	1,153
$\Sigma$ 290-320nm										
FPSxFC (maior)		3,1	1,4	0,5	0,8	0,9	0,6	1	9,3	24,9
FPS (ref) = 5,6 $\pm$ 5,3										

\* *C.F(Caesalpinia ferrea)*; *F.C(Fridericia chica)*; *K.T(Krameria tomentosa)*; *T.R(Tilandsia recurvata)*; *T.S(Tilandsia streptocarpus)*; *M.T(Mimosa tenuiflora)*; *T.G (Triplaris gargneriana)*; *QC(quercetina)* e *AG(ácido gálico)*.

De acordo com a legislação brasileira, RDC N° 30 de 1° de junho de 2012 (BRASIL, 2012), um produto para ser utilizado em cosméticos fotoprotetores, deve apresentar FPS de no mínimo 6. Desta forma, não se justificaria a incorporação isolada dos extratos analisados nestas preparações.

Por ser uma mistura de compostos ativos, os extratos vegetais tendem a apresentar diferentes propriedades farmacológicas, com isso há a necessidade de isolar as moléculas mais ativas para diferentes funções que ela possa exercer, essa dificuldade de separação pode ser caracterizada pela baixa concentração de moléculas com capacidade de absorver a radiação UV e a dificuldade da determinação da absorção máxima dos extratos vegetais.

#### 4- CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos, pode-se concluir que o extrato de *Jucá* em comparação com os demais extratos analisados, foi o que apresentou maior atividade fotoprotetora.

E foi possível também verificar que não houve diferença significativa entre o extrato etanólico (95 PA) e o hidroetanólico, visto que ambas as extrações apresentaram absorbância aproximada no comprimento de onda esperado que seria entre 290-320nm região do espectro eletromagnético em UVB.

#### 5- REFERÊNCIAS



IVANA M. P. VIOLANTEI; ILZA M. SOUZAI; CLÁUDIO L. VENTURINII; ALBINA F. S. RAMALHOI; ROGÉRIO A. N. SANTOSII; MÁRCIO FERRARIIII. Avaliação in vitro da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. Received 2 June 2008; Accepted 20 March 2009.

JÉSSICA EVELYN SANTIAGO PINTO<sup>1</sup>, TATIARA BARLATTI MICKOS<sup>1</sup>, KARINE FERNANDA DA SILVA<sup>2</sup>, CLAUDENICE FRANCISCA PROVIDELO SARTOR<sup>3</sup>, DANIELE FERNANDA FELIPE<sup>4</sup>. Estudo da atividade fotoprotetora de diferentes extratos vegetais e desenvolvimento de formulação de filtro solar. VIII EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar, outubro.

LUCIANE MELO ROCA<sup>1</sup>, SHIRLEI CRISTINA MOREIRA<sup>2</sup>, LÍLIA MARIA AZEVEDO MOREIRA<sup>3</sup>. Avaliação laboratorial do fator de proteção solar (FPS) em protetores utilizados por portadores de albinismo na Bahia. R. Ci. med. biol., Salvador, v.10, n.2, p.136-139, mai./ago. 2011.

MARCELO B. DA ROSA<sup>1,2</sup>, TANCREDO G. DE OLIVEIRA<sup>3,4</sup>, CAMILO A. DE CARVALHO<sup>3,4</sup>, FABIANO D. SILVA<sup>3,4</sup>, LEANDRO M. DE CARVALHO<sup>5,6</sup>, PAULO C. NASCIMENTO<sup>5,6</sup>, RODRIGO L. PERES<sup>3</sup>. Estudo espectrofotométrico da atividade fotoprotetora de extratos aquosos *Achillea millefolium*, *Brassica oleracea* var. *capitata*, *Cyperus rotundus*, *Plectranthus barbatus*, *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass e *Sonchus oleraceus*. Vol. V (1), 101-110, 2008.

## 6- AGRADECIMENTOS

CNPQ, Capes, UFPE



ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL– PNQM 29

## ESTUDOS DE CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE RESVERATROL

S. A. de L.SOUZA<sup>1</sup>, J.M. S. OLIVEIRA<sup>2</sup>, R. E. S. ARRUDA<sup>3</sup> e T.G do NASCIMENTO<sup>4</sup>

<sup>1,2,3,4</sup> Universidade Federal de Alagoas, Escola de Enfermagem e Farmácia, Laboratório de Análises Farmacêuticas e Alimentícias-LAFA.

E-mail para contato: sabri\_ambrosio@hotmail.com

**RESUMO** – *O resveratrol (3,4,5-tri-hidroxiestilbeno) é um composto fenólico que faz parte da dieta humana e está presente em uma grande variedade de vegetais, incluindo uva, amora e amendoim. É um potente antioxidante, anticancerígeno, anti-inflamatório e quimiopreventivo. Contudo, possui baixa solubilidade aquosa, baixa absorção oral e instabilidade, pois com a presença da luz transforma-se no seu isômero cis-resveratrol que é menos ativo. O objetivo deste trabalho foi analisar os resultados das análises físico-químicas e determinar o grau de encapsulação do resveratrol em matrizes poliméricas. As técnicas analíticas utilizadas para caracterizar as amostras de 20%(m/m), A1(resveratrol encapsulado) e B1(branco), após liofilização foram a espectrofotometria UV-VIS (280 e 305 nm) e espectrofotometria UV-VIS com varredura(200-600nm), com o intuito de determinar o grau de encapsulação. Realizaram-se também análise infravermelho e Estereomicroscopia de campo com a parte sólida das amostras. As suspensões de nanopartículas de resveratrol foram caracterizadas usando o potencial zeta e determinação do tamanho de partícula (TP). Análise HPLC-UV demonstrou a fotodegradação trans-resveratrol e fotoconversão em cis-resveratrol. O grau de encapsulação foi de 68% em 280nm e 62% em 305nm na leitura de espectrofotometria UV-VIS. Através do infravermelho, pode-se fazer uma análise qualitativa da amostra comprovando o encapsulamento do resvetratrol observado pela ausência de estiramento de na região entre 1600 a 1450cm<sup>-1</sup>. O valor do potencial zeta demonstrou certa estabilidade da nanopartículas entre -16mV e -24mV e o obteve-se tamanho médio de partículas de 300nm. Estudos prévios de fotodegradação/fotoconversão do resveratrol demonstram a importância de se obter o resveratrol na sua forma nanorevestida. Os resultados de caracterização das nanopartículas de resveratrol foram satisfatórios para preparação de resveratrol na sua forma nanorevestida para futuras preparações farmacêuticas mais estáveis e com maior eficácia terapêutica.*

*Palavras chave: Trans-resveratrol, Cis-resveratrol, Grau de Encapsulação, Nanopartículas de Resveratrol*



*ABSTRACT- The resveratrol (3,4,5-trihydroxystilbene) is a phenolic compound that is part of the human diet and is present in a wide variety of plants including grapes, cranberries and peanuts. It is a potent antioxidant, anticancer, anti-inflammatory and chemopreventive. However, the low aqueous solubility and low oral absorption and instability because the presence of light becomes in its cis-resveratrol isomer which is less active. The aim of this study was to analyze the results of physico-chemical analysis and determine the degree of encapsulation of resveratrol in polymer matrices. The analytical techniques used to characterize samples of 20% (w / w), A1 (encapsulated resveratrol) and B1 (white), after lyophilization were UV-VIS spectrophotometry (280 and 305 nm) and UV-VIS spectrophotometry scan ( 200-600nm), in order to determine the degree of encapsulation. There were also infrared analysis and field stereomicroscopy with the solid sample. The suspensions of resveratrol nanoparticles were characterized using zeta potential and particle size determination (PD). HPLC-UV analysis demonstrated that trans-resveratrol and photoconversion photodegradation cis-resveratrol. The degree of encapsulation was 68% at 280nm and 62% at 305nm reading UV-VIS spectrophotometry. Through the infrared, we can make a qualitative analysis of the sample demonstrating the encapsulation resvetratrol observed by the absence of stretching in the region between 1600 and 1450cm<sup>-1</sup>. The value of the zeta potential of the nanoparticles show some stability and between -16mV -24mV and gave average particle size of 300nm. Previous studies photodegradation / photoconversion of resveratrol demonstrate the importance of obtaining resveratrol in its nanorevestida shape. The results of characterization of resveratrol nanoparticles were satisfactory for the preparation of resveratrol in its nanorevestida medium for future more stable pharmaceutical preparations with greater therapeutic efficacy.*

*Keywords: Trans-resveratrol, Cis-resveratrol, Degree of encapsulation, Resveratrol nanocapsules.*

## 1. INTRODUÇÃO

O resveratrol (3,4,5-tri-hidroxiestilbeno) é um polifenol que desempenha diversas funções biológicas no organismo humano com sua ação antioxidante, anti-inflamatória, antifúngica, retardamento de envelhecimento, como também, ação anticarcinogênica em diversos estágios da evolução da doença. Esse composto polifenólico que pode ser encontrado em mais de 70 espécies de plantas, e apresenta-se em alimentos da dieta humana, principalmente, uvas e vinhos oferece essas características tão admiradas devido ação do seu isômero mais ativo, trans-resveratrol que através da luz UV, converte-se em seu enantiômero menos ativos, cis-resveratrol. (Baur; Sinclair, 2006; Lu *et al*, 2009; Mendes, 2011). Para manter o isômero na forma trans-resveratrol, viu-se a necessidade de realizar ensaios para o nanoencapsulamento do resveratrol, sabendo que, se obtivesse sucesso a substância conservaria a sua forma mais ativa. A eficiência de encapsulamento foi comprovada através de diversos estudos físico-químicos comparativos.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

O resveratrol (5 µg/mL) foi submetido a estudos de fotoestabilidade para avaliar o grau de fotoconversão de seu isômero trans-resveratrol em cis-resveratrol e monitorado por HPLC-DAD, utilizando coluna C18 e sistema gradiente de solventes água:acetonitrila. O detector foi ajustado para os comprimentos de onda de 280 e 305 nm.

O método de obtenção das nanopartículas de resveratrol foi adaptado do método de Fessi *et al.* (1989), conhecido como Deslocação do Solvente. Para o preparo da amostra pesou-se 72 mg de resveratrol, 231 mg PCL (Polycaprolactona) e 39mg Pluronic F 108 (Poly(ethylene glycol) , todos à 20% em triplicata e solubilizados em acetona em duas fases: orgânica e aquosa. Todas as amostras foram centrifugadas à 5000 rpm por 15 minutos. Finalizada a centrifugação, retira-se 1ml de sobrenadante e separa-se três recipientes identificando-os como S1 50µL, S1 75µL e S1 100µL. Já os precipitados são identificadas como A1 50µL, A1 75µL e A1 100µL. É feita uma recentrifugação agora identificadas com A1.2 50µL, A1.2 75µL e A1.2 100µL, e os sobrenadantes são adicionados aos seus respectivos volumes da primeira centrifugação. Os precipitados são liofilizados por um período de 48 horas. Também foram preparados os brancos das amostras identificados como: B1 50µL, B1 75µL e B1 100µL. As análises com UV foram realizadas para determinação do grau de encapsulamento do resveratrol, experimento dividido em duas etapas de análise: A) A<sub>1</sub> 100 µL e B<sub>1</sub> 100 µL; B) Matéria-prima (resveratrol). Foi realizada leitura em aparelho UV-vis em modo varredura com o alcance 200-600nm e em modo espectrometria de  $\lambda=280-305\text{nm}$ . Para espectrofotometria FT-IR do tipo ATR analisou-se as amostras de resveratrol, A1 100µL, A1.2 100µL, B1 100 µL e B1.2 100 µL, com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  , no alcance de 500 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ . As imagens foram obtidas com câmera fotográfica acoplada ao esteriomicroscópio de campo escuro e ocular EW 10x/20mm com aumento de 50x.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Fotoestabilidade do resveratrol

Através da obtenção dos perfis de conversão do trans-resveratrol em cis-resveratrol na forma de percentagem de área absoluta em função do tempo, utilizando a solução padrão de 5,0 µg/mL (m/v) conclui-se que o trans-resveratrol é extremamente sensível à luz UV em 365 nm, figura 1, visto que se converte em 50% em seu isômero cis a partir de 4 minutos de exposição. Quando exposto à luz branca , o trans-resveratrol atingiu cerca de 89% de conversão em 11 dias (Figura 2). Para comprovar os resultados obtidos, uma amostra foi protegida da exposição tanto da luz branca quanto da luz UV durante o período dos 11 dias de análise, não havendo, portanto, detecção de deformação para o isômero cis- resveratrol, evidenciando a fotossensibilidade do trans-resveratrol(Figura 3). Resultados de fotoconversão/fotoestabilidade foram confirmados através da análise CLAE-UV à 365nm.

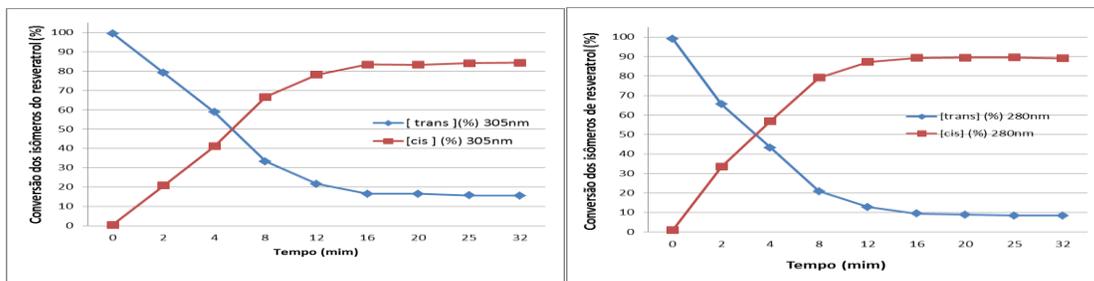


Figura 1 - Perfil de conversão de trans-resveratrol em cis-resveratrol sob exposição à luz UV 365nm em função do tempo.

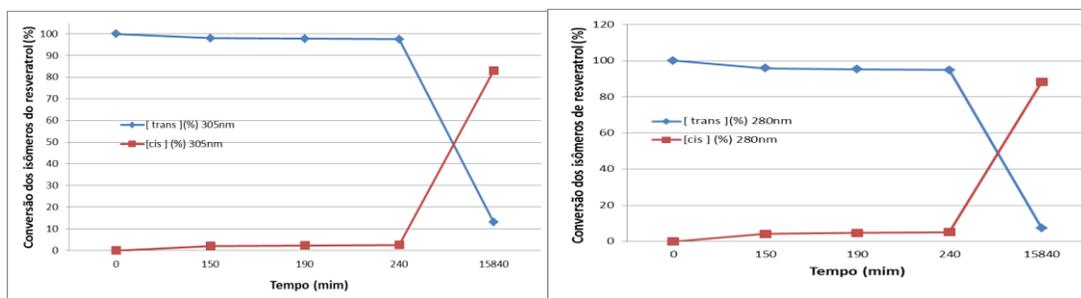


Figura 2 - Perfil de conversão de trans-resveratrol em cis-resveratrol sob exposição à luz branca em função do tempo.

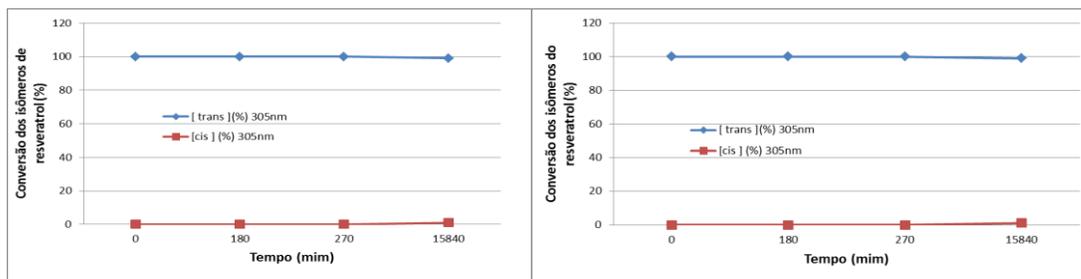


Figura 3 - Perfil de não-conversão de trans-resveratrol em cis-resveratrol sob proteção da luz em função do tempo.

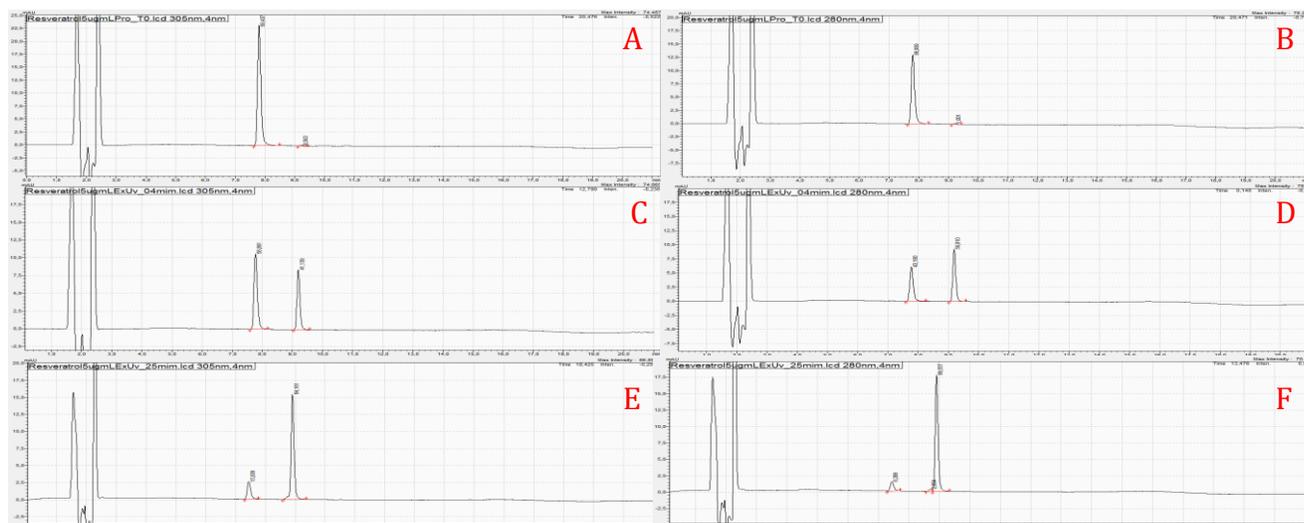


Figura 4 -Fotoconversão de trans-resveratrol em cis-resveratrol sob exposição à luz UV 365nm usando CLAE-UV nos tempos 0 min (A e B), 4 min (C e D) e 25min (E e F).

### 3.2 Tamanho de partícula e potencial zeta

Tabela 1- Valores obtidos de potencial zeta e tamanho de partícula dos sobrenadantes das amostras encapsuladas.

AMOSTRA (SOBRENADANTE)	POTENCIAL ZETA (mV)	PDI	TAMANHO DE PARTÍCULA (d.nm)
S1 50µL	-18,93 ± 3	0,100 ± 0,030	210,93 ± 8,47
S1 75 µL	-16,87 ± 4,44	0,090 ± 0,040	222,02 ± 22,50
S1 100µL	-24,37 ± 10,25	0,269 ± 0,880	466,06 ± 56,27
SB1 100 µL	2 ± 4,63	0,067 ± 0,042	259,3 ± 2,61

O potencial zeta, o tamanho de partícula e o PDI estão demonstrados na Tabela 1. Os resultados indicam que o diâmetro da partícula está com valores bem aproximados, com exceção do S1 100µL que apresenta um tamanho bastante superior aos outros(466 nm). O potencial zeta de S1 100µL apresentou um valor mais satisfatório (-24mV). As amostras S1 50 µL e 70 µL apresentaram tamanhos de partícula mais satisfatório que S1 100 µL( 210,9 e 222nm, respectivamente). O S1 100µL também apresentou um valor de PDI acima de 0,1, caracterizando-o como uma solução polidispersa, diferente das outras amostras que apresentam menor tensão superficial, homogeneidade maior e partícula monodispersa.

### 3.3 UV-vis de varredura e espectrofotometria

Através dos valores da Tabela 1, calculou-se o percentual do grau de encapsulação ( $\% \text{ grau encapsulado} = (\text{Abs A1 ou B1} / \text{Abs RSV}) \times 100$ ) nos comprimentos de onda 210nm, 280 e 305 nm, em matriz polimérica, PCL. O grau de encapsulação para A1 foi 61,51% em 210nm, 68,60% em 280nm e 62,37% em 305nm na leitura de espectrofotometria UV-VIS. Também foi realizada análise em espectrometria em modo varredura 200 a 600nm, demonstrando de forma comparativa, o comportamento da amostra A1 100 $\mu$ L e B1 100 $\mu$ L em relação ao resveratrol, evidenciando uma estabilidade por parte da amostra encapsulada A1 em relação ao RSV.

Tabela 2- Espectrometria do RSV, amostra encapsulada A1 e B1 em concentração 10 $\mu$ g/mL.

AMOSTRAS	210nm	280 nm	305 nm
BRANCO (METANOL)	0,492 Abs	0,143 Abs	-0,123 Abs
A1 (100 $\mu$ L)	0,513 Abs (61,51%)	0,402 Abs (68,60%)	0,731 Abs (62,37%)
B1 (100 $\mu$ L)	0,335 Abs (40,16%)	0,180 Abs (30,72%)	0,242 Abs (20,65%)
RSV	0,834 Abs	0,586 Abs	1,172 Abs

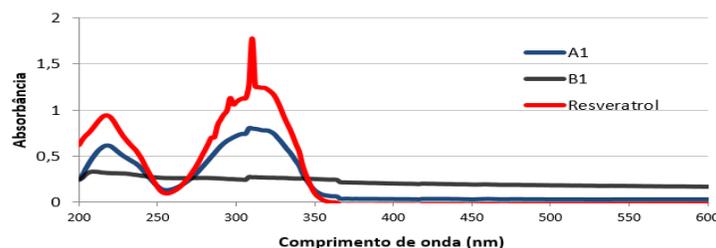


Figura 5- Espectrofotometria UV-VIS para amostras A1 e B1, ambos de 100 $\mu$ L, e Resveratrol.

### 3.4 Infravermelho

O espectro de resveratrol mostrou bandas características dos estiramentos das ligações C=C do anel aromático localizados em 1600, 1580 e 1500  $\text{cm}^{-1}$ , uma banda característica dos estiramentos da ligação O-H de hidroxilas em 3250  $\text{cm}^{-1}$  e referente ao alceno entre 1000 e 800  $\text{cm}^{-1}$ . Fica evidente o efeito protetor do PCL nos espectros das formulações, visto que quando comparado ao espectro do resveratrol, há supressão dos estiramentos referentes aos grupamentos orgânicos do resveratrol, sendo evidenciadas somente as bandas relativas aos grupamentos orgânicos do PCL utilizado na formulação (principalmente bandas referentes às carbonilas em 1714  $\text{cm}^{-1}$ ) (SILVERSTEIN;WEBSTER,2009). Ainda é possível fazer uma análise comparativa entre os espectros de A1 e B1 em relação ao A1.2 e B1.2, evidenciando que os quatro possuem bandas muito fortes em comum, percebe-se que há comportamentos semelhante que demonstram que há diferenças significativas que ocorrem no momento do preparo das amostras, entre a primeira e a segunda centrifugação.

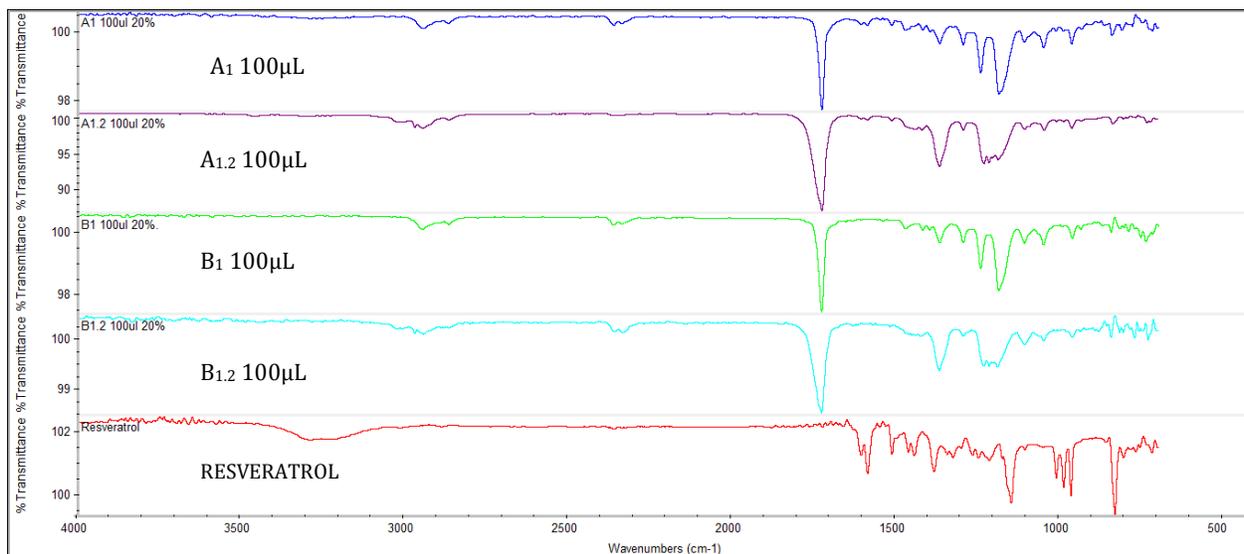


Figura 6 - Espectro Infravermelho do RSV(vermelho) e das amostras de 100 $\mu$ L: A1(Azul escuro), A1.2(Roxo), B1(verde) e B1.2(Azul claro).

### 3.5 Estereomicroscópio de campo

As imagens demonstram as diferenças na morfologia das amostras. No primeiro, percebe-se o aspecto de cristais do resveratrol (A) na Figura 7. Apesar de não ser visível a formação do encapsulado, notou-se uma mudança para um pó com ausência de cristais, mais fino e mais agregado, de aspecto amorfo, evidenciando a presença do biopolímero PCL, e consequentemente, das nanopartículas agregadas.

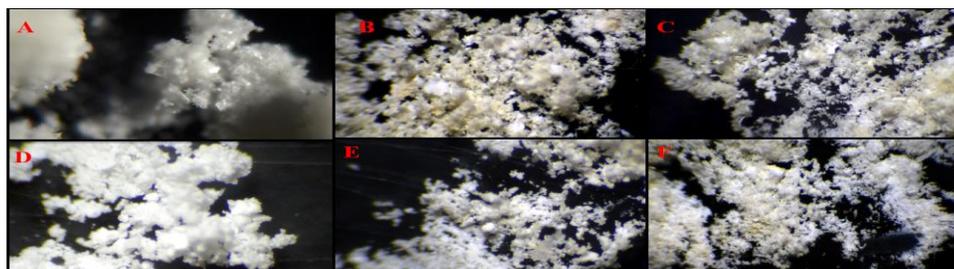


Figura 7 - Imagens microscópicas das amostras analisadas. A. RSV; B. A1 50  $\mu$ L; C. A1 75  $\mu$ L; D. A1 100 $\mu$ L; E. A1.2 100 $\mu$ L; e F. B1 100 $\mu$ L

## 4. CONCLUSÃO



O grau de encapsulação para a formulação A1 foi de 61,51% em 210nm, 68,60% em 280nm e 62,37% em 305nm. O espectro FT-IR demonstrou o efeito de proteção do resveratrol na formulação contendo PCL, sugerindo sua encapsulação. Foram observadas diferenças no aspecto das amostras em função do método de preparo e também a fotossensibilidade do *trans*-resveratrol livre, sugerindo que as formulações produzidas nesse trabalho podem servir para preparações cosméticas que utilizem o *trans*-resveratrol como ativo.

## 5. REFERÊNCIAS

- BARROS, Y.N.; Santos, M.J.L.; Peixoto, T.A.; Campelo, M.S.A.; Moraes, S.A.; Souza, S.A.L.; Brandão, M. P.; Arruda, R.E.S.; Imai, H.; Almeida, C.P.; Nascimento, N.M.; Azevedo, L.F.; Silva, P.F.; Oliveira, J.M.; Nascimento, T.G. Estudo de fotoestabilidade do resveratrol. Universidade Federal de Alagoas. Resumo SBQNordeste 2015. Ago. 2015.
- BAUR, J.A.; SINCLAIR, D.A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *N. Rev. Drug Disco.* v,5, 493-506. Jun. 2006.
- FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.Ph.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *J. Pharm.* v 55, R1-R4. Out. 1989.
- LU, Z; CHEING, B.; HUB, Y.; ZHANG, Y.; Zou, G. Complexation of resveratrol with cyclodextrins; Solubility and antioxidant activity. *F. Chem.* v.113, p. 17-20. Mar. 2009.
- MENDES, J.B.E. Desenvolvimento e avaliação de micropartículas poliméricas contendo resveratrol. 2011. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F.X. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 6ª Ed. John Wiley & Sons Inc. 2000.

## 6. AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Alagoas, ao CNPQ e ao Laboratório de Análises Farmacêuticas e Alimentícia da UFAL (LAFAL-UFAL)



ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL– PNQM 35

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTITUMORAL DE NOVOS DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DA BETULINA E DO ÁCIDO BETULÍNICO

S.M.C. GONÇALVES<sup>1</sup>, G.N.SILVA<sup>2</sup>, I.R.PITTA<sup>1</sup>, M.J.B.M.RÊGO<sup>1</sup>, M.G.R.PITTA<sup>1</sup>,  
S.C.B.GNOATTO<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas, Núcleo de Pesquisa e Inovação Terapêutica Suely Galdino;

<sup>2</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Laboratório de Síntese Orgânica e Fitoquímica.

E-mail para contato: sayonara\_123\_6@hotmail.com

**RESUMO** – *O câncer é uma doença de grande impacto social que mata milhões de pessoas todos os anos. Hoje, está bem estabelecido a íntima relação entre inflamação/tumorigênese. Os produtos naturais estão sendo cada vez mais estudados por causa da sua abundância na natureza, gama de atividades e baixo custo. O ácido betulínico (AB) e a betulina (BE) são obtidos através de fontes naturais e entre suas atividades biológicas estão atividade anti-inflamatória e antitumoral. Sedo assim, 5 novos derivados da BE e 6 derivados do AB foram semissintetizados utilizando substituintes ésteres e halogênios como cloro e flúor. Dos 5 novos derivados da BE, 2 foram capazes de reduzir significativamente os níveis de INF- $\gamma$  e da COX-2. Em seguida, avaliamos a citotoxicidade celular através do método MTT, dos novos derivados da BE (LAFIS 2a, 2b, 2c, 2d e 2e) e do AB (LAFIS 1a, 1b, 1c, 1d, 1e e 1f) frente a 4 linhagens de células tumorais e em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). Os derivados da BE não apresentaram ação antineoplásica promissora ( $IC_{50} > 70 \mu M$ ), entretanto não foram citotóxicos para as PBMCs ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ). Já os derivados do AB se mostraram citotóxicos para as PBMCs e não foram seletivos para as células tumorais.*

**Palavras-chave:** *Triterpenos, Citocinas, Citotoxicidade.*

**ABSTRACT** – *Cancer is a disease of great social impact that kills millions of people every year. Today, it is well established the close relationship between inflammation/tumorigenesis. Natural products are increasingly being studied because of its abundance in nature, range of activities and low cost. The betulinic acid (BA) and betulin (BE) are obtained from natural sources and from their biological activities are antiinflammatory and antitumor activity. Therefore five news derivatives of BE and six derivatives of BA performed substitutions at C3 and C28 esters using groups and halogens such as chlorine and fluorine. The five new derivatives of BE, two inhibited*



significantly  $INF-\gamma$  and  $COX-2$ . Next, we evaluated in cell cytotoxicity by the method MTT, of five new derivatives of betulin (LAFIS 2a, 2b, 2c, 2d and 2e) and AB (LAFIS 1a, 1b, 1c, 1d, 1e and 1f) derivatives, against the four tumor cell lines and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). BE derivatives showed no promising antiproliferative activity ( $IC_{50} > 70\mu M$ ), but were not toxic to PBMCs ( $IC_{50} > 100\mu M$ ). However, AB derivatives proved toxic to PBMC and not selective for tumor cell lines.

*Keywords: triterpenes, cytokines, cytotoxicity*

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente muitos compostos de origem natural vêm sendo inseridos na prática clínica para o tratamento de diversas doenças crônicas. A Betulina (BE) (lup-20(29)-ene-3 $\beta$ ,28-diol) e o ácido betulínico (AB) (3 $\beta$ -hidroxi-lup-20 (29)-en-28-óico) são compostos naturais pertencente à classe dos triterpenos (Yogeeswari; Sriram, 2005). A literatura tem demonstrado uma gama de atividades biológicas para esses dois compostos (BE e AB) assim como, para seus derivados, entre elas atividade antitumoral e anti-inflamatória (Potze *et al.*, 2014; Emmerich *et al.*, 2014).

Em 2000, já haviam indícios de que a resposta inflamatória estava associada ao tumor. Na década subsequente, a pesquisa sobre as interseções entre a inflamação e patogênese do câncer evoluiu, produzindo demonstrações convincentes de que as células do sistema imunológico inato e adaptativo auxiliam a progressão tumoral (Hannah e Weiberg 2000; Denardo *et al.*, 2010).

A carcinogênese leva à transformação de células alteradas que se tornam autossuficientes em relação aos sinais de crescimento, capazes de burlar o sistema de morte, crescendo e expandindo-se ininterruptamente. O crescimento tumoral é beneficiado pela angiogênese, no qual “alimenta” o tumor e assim permite que ele invada tecidos e órgãos próximos, como também ocorra a metástase para tecidos mais distantes (Greenman C *et al.*, 2007; Yadav *et al.*, 2010). Hoje, o câncer é uma das principais causas de morte e morbidade em todo o mundo. Estimativas sugerem que para o ano de 2030 ocorra o aparecimento de 27 milhões de novos casos, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivendo com a doença (“WHO | Cancer”, 2015). Nas duas últimas décadas grandes avanços quanto ao entendimento molecular do câncer permitiu o desenvolvimento de novas terapias e ferramentas auxiliares para o seu diagnóstico (Kumar; Sharma; Kumar Tiwari, 2012). No entanto, as particularidades biológicas inerentes a cada tipo de tumor, juntamente com a resistência das células tumorais aos quimioterápicos, impulsionam a busca de novas substâncias potencialmente ativas para combater essa doença (Rosas *et al.*, 2013).

Nesse contexto, foram sintetizados 6 derivados do ácido betulínico e 5 novos derivados da betulina com o objetivo de avaliar a sua atividade anti-inflamatória e antineoplásica.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Derivados semissintéticos do ácido betulínico e da betulina

Tendo em vista o potencial biológico destes triterpenos, o AB foi obtido a partir das cascas de *Platanus acerifolia* (Silva *et al.*, 2013) e a BE adquirida comercialmente (Sigma Aldrich).



## 2.2 Seleção do grupo controle e Coleta de Sangue

O trabalho foi submetido e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa em seres humanos – Centro de ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (PROTOCOLO/CEP/CCS/UFPE N°1.351.357). A amostra foi composta por 12 voluntários saudáveis acima de 18 anos. Após aplicação e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), foram coletadas amostras de sangue periférico por profissional competente através de punção venosa.

## 2.3 Cultura Celular das Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMCs)

As PBMCs isoladas a partir do sangue periférico dos voluntários sadios foram cultivadas ( $1 \times 10^6$  células/1000  $\mu$ L) em meio RPMI 1640 suplementado. Estas células foram estimuladas ou não com PMA (2 $\mu$ L) e Isonomicina (5 $\mu$ L) e sob condições específicas como a utilização dos novos derivados da betulina nas doses de 1, 10 e 100 $\mu$ M. Foi utilizado ainda como controle não tratado e controle negativo, um poço apenas com células e outro com Metilprednisolona (MP) na concentração de 100 $\mu$ M. As PBMCs foram cultivadas em estufa de CO<sub>2</sub> 5% a 37°C. Após 48 horas, os sobrenadantes foram coletados e armazenados em freezer -20°C graus para posterior dosagem das citocinas pelo método ELISA.

## 2.4 Western Blotting

A linhagem de monócitos (U937) foi plaqueada e posteriormente estimulados com lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* LPS 0111:B4 (10 $\mu$ g/mL). Para o controle negativo foram utilizados o inibidor não-seletivo de COX-1, o ácido acetil-salicílico (AAS) (10 $\mu$ g/MI) assim como o inibidor de COX-2, a dexametasona (10 $\mu$ M). Para o grupo teste, foram adicionados os novos derivados 2a, 2c e 2e, assim como a BE. Para a análise da expressão proteica foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10%. Em seguida as proteínas contidas no gel foram transferidas para membrana de PVDF. As bandas colorimétricas reveladas foram fotografadas em aparelho fotodocumentador e suas densitometrias determinadas pelo software ImageJ. A quantificação final foi dada através da razão entre as expressões da proteína de interesse e a  $\beta$ -actina, utilizada como normalizador.

## 2.5 Ensaio de citotoxicidade das PBMCs do grupo controle e das Células Neoplásicas

O teste de citotoxicidade dos novos derivados foi realizado *in vitro* nas PBMCs dos voluntários saudáveis pertencentes ao grupo controle e nas linhagens de células neoplásicas Hep-G2 (Hepatocarcinoma bem diferenciado), RAJI (Linfoma de Burkitt), DU 145 (Câncer de próstata) e MCF-7 (Câncer de mama). Os testes foram realizados em triplicata de amostras e triplicata das doses dos compostos.

O método MTT é uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços e posteriormente foram adicionados os derivados nas concentrações de 1, 10 e 100 $\mu$ M. Foram utilizados 3 tipos de controle, (1) controle não tratado apenas com células. (2) controle com o solvente dos compostos, Dimetilsulfóxido (DMSO) e (3) controle com a droga já



utilizada na prática clínica, a Doxorrubicina. Após 48 horas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, foi adicionado 20µL da solução de MTT (0,5mg/mL), e incubado por mais 3 horas na estufa. Em seguida, foi adicionado 130µl da solução de Dodecil sulfato de sódio – SDS à 20% para dissolução do precipitado. A absorbância foi lida em espectrofotômetro de placa a 570nm, após 24 horas.

## 2.6 Análises Estatísticas

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism® versão 6. O teste estatístico utilizado na análise da dosagem das citocinas no sobrenadante de cultura foi o Wilcoxon. Os dados estão apresentados como mediana máxima e mínima. O IC<sub>50</sub> referente à toxicidade frente às linhagens neoplásicas foi calculado pelo software Origin versão 8.0. Os resultados foram considerados significantes quando o  $p < 0,05$ . O índice de seletividade (IS), foi calculado através da divisão ( $IS = IC_{50} \text{ PBMC} / IC_{50} \text{ células neoplásicas}$ ). Os compostos foram considerados seletivos quando o  $IS \geq 3$ .

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Teste de Citotoxicidade dos Novos Derivados da Betulina em PBMC's

Inicialmente os novos derivados semissintéticos da BE 2a, 2b, 2c, 2d e 2e foram avaliados quanto a sua citotoxicidade em PBMCs, através do método MTT. Os novos derivados, assim como o seu precursor (BE) apresentaram  $IC_{50} > 100\mu M$ . Como não se mostraram citotóxicos, os novos derivados da BE foram avaliados quanto a sua capacidade de inibir a produção de algumas citocinas chave no processo inflamatório: INF- $\gamma$ , IL-6 e IL-17A.

### 3.2 Avaliação dos níveis da citocina INF- $\gamma$ no sobrenadante de cultura dos voluntários saudáveis.

Os resultados da dosagem da citocina INF- $\gamma$  no sobrenadante de cultura de 8 voluntários sadios são apresentados em média e mediana (figura 1). O derivado 2a apresentou significância estatística na redução da produção da citocina INF- $\gamma$  ( $p = 0,0391$ ), apenas na dose de 100µM. O derivado 2c apresentou redução estatisticamente significativa da citocina INF- $\gamma$  ( $p = 0,0156$ ), ( $p^{**} = 0,0078$ ) quando comparado ao controle positivo PMA+IONO. Os demais derivados (2b, 2d e 2e) e a BE não mostraram nenhuma ação moduladora da citocina em questão, não apresentando significância estatística ( $p < 0,05$ ).

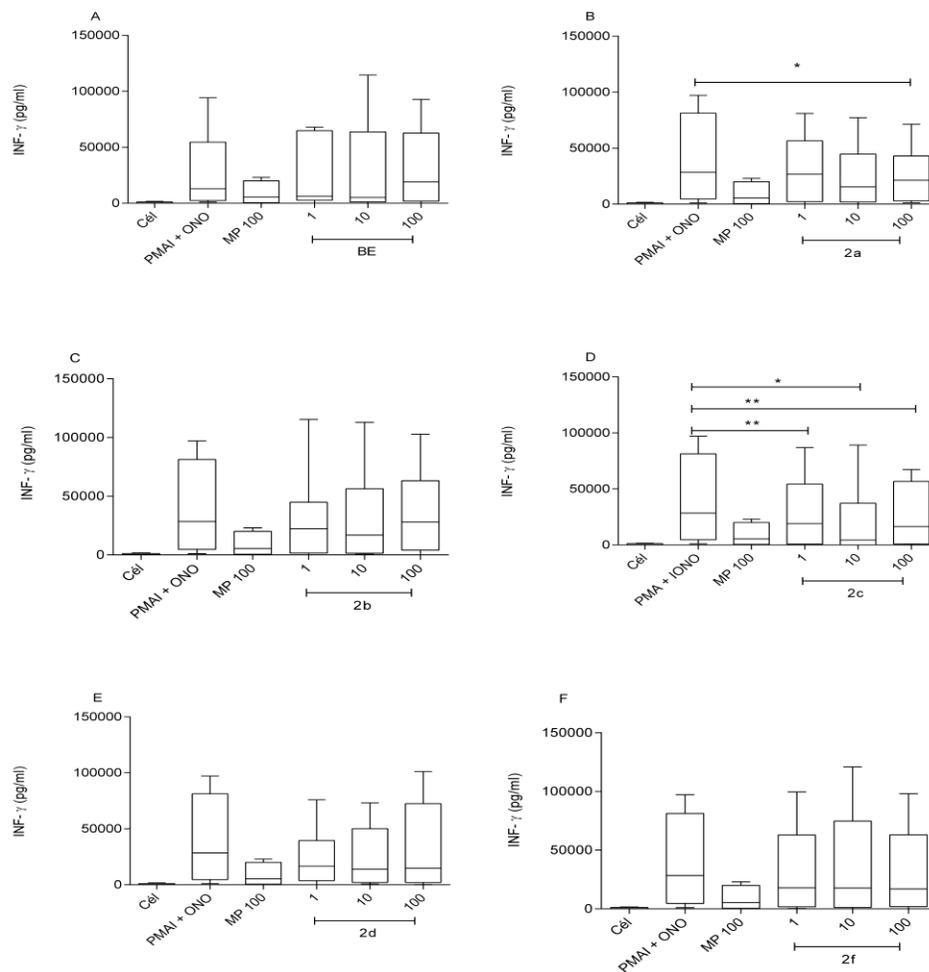


Figura 1 – Dosagem de INF- $\gamma$  (pg/ml) no sobrenadante de cultura de voluntários sadios na presença de PMA+Ionomicina, Metilprednisolona e dos derivados semissintéticos da BE, nas doses de 1, 10 e 100 $\mu$ M.

De acordo com nossos resultados, observamos que as modificações realizadas para se obter os derivados 2a e 2c os tornaram mais eficazes quanto a sua atividade anti-inflamatória do que o seu precursor, a BE. Nenhum estudo anterior sintetizou derivados a partir da BE utilizando os mesmos substituintes para os nossos derivados, tornando a síntese e atividade de nossos derivados inéditas.

A BE e seus derivados não foram capazes de modular significativamente as citocinas IL-6 e IL-17A. No entanto, a utilização dos substituintes *O*-acetil (2a) e do halogenio cloro (2c) nas posições C-3 e C-28 simultaneamente, deram potenciais características imunomoduladoras de INF- $\gamma$  e anti-inflamatórias através da inibição de COX-2 a esses dois novos derivados.

Laavola e colaboradores (2016) realizou modificações estratégicas na estrutura da BE, adicionando grupamentos formil e pirazol gerando dessa forma derivados capazes de reduzir a expressão da citocina pró-inflamatória IL-6 e da enzima COX-2 de maneira significativa. Sendo

assim, após observar a modulação significativa de INF- $\gamma$ , decidimos investigar a ação dos novos derivados em outra molécula central do processo inflamatório, a COX-2.

### 3.3 Avaliação da modulação proteica de COX-2

Os derivados 2<sup>a</sup> e 2c, juntamente com a BE foram avaliados quanto à modulação proteica de COX-2 e comparados ao agente utilizado na prática clínica, Dexametasona (DEXA) como mostrado na figura 2. Nossos dados mostram que a BE inibiu a expressão de COX-2 de maneira dose dependente. 2<sup>a</sup> (100 $\mu$ M) apresentou redução relativa igual à DEXA. O derivado 2c (100 $\mu$ M) chama atenção pela maior inibição de COX-2 quando comparado à droga muito utilizada na prática clínica, a dexametasona.

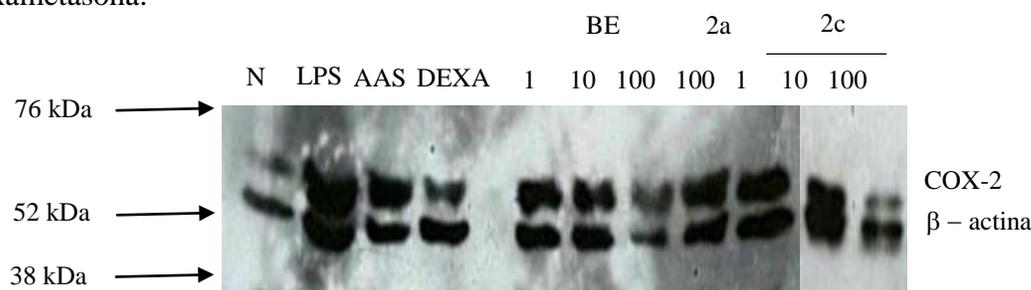


Figura 2 – Efeito da BE e dos seus derivados 2<sup>a</sup> e 2c na expressão de COX-2 em linhagem de monócitos (U937) analisado por Western blotting.  $\square\square\square$  actina foi utilizada como normalizador. N – controle de células, LPS – estímulo, AAS – inibidor não seletivo de COX, DEXA – Inibidor seletivo de COX-2.

### 3.4 Teste de citotoxicidade dos novos derivados da Betulina e do Ácido Betulínico

Após avaliar a ação anti-inflamatória dos novos derivados da BE, decidimos investigar a ação citotóxica desses derivados frente às linhagens de células tumorais, como mostra a tabela 1.

Tabela 1 - Efeito citotóxico dos novos derivados da betulina (IC<sub>50</sub>)\* e (IS) frente às células normais e células neoplásicas.



Compostos	RAJI (Linfoma de Burkitt's)		MCF-7 (Câncer de mama)		Hep-G2 (Hepatocarcinoma bem diferenciado)		DU145 (Câncer de próstata)		PBMC (Células mononucleares do sangue periférico)
	IC <sub>50</sub>	IS	IC <sub>50</sub>	IS	IC <sub>50</sub>	IS	IC <sub>50</sub>	IS	IC <sub>50</sub>
BE	45,78 ± 0,71	2,18	45,21 ± 13,40	2,21	72,23 ± 3,42	1,38	49,36 ± 13,43	2,02	>100
2a	85,10 ± 4,78	1,17	>100	-	88,71 ± 0,00	1,12	>100	-	>100
2b	92,00 ± 3,07	1,08	>100	-	85,86 ± 0,00	1,16	>100	-	>100
2c	89,45 ± 7,60	1,11	>100	-	89,27 ± 0,00	1,12	>100	-	>100
2d	95,53 ± 6,75	1,04	>100	-	60,47 ± 0,00	1,65	>100	-	>100
2e	96,75 ± 3,28	1,03	>100	-	86,09 ± 0,00	1,16	>100	-	>100
Doxorrubicina	11,91 ± 9,15	8,39	2,71 ± 0,87	36,90	39,22 ± 14,48	2,54	6,88 ± 1,06	14,53	>100

\*IC<sub>50</sub>: Dose que inibe 50% do crescimento celular (microgramas /mL), Média. ± Desvio Padrão

\*\*IS: Índice de Seletividade

Nossos resultados do ensaio de citotoxicidade para os novos derivados da BE (2a – 2e), mostrou que esses novos derivados não foram tóxicos para as linhagens de células tumorais selecionadas, como também não tiveram ação citotóxica para as células normais. A doxorrubicina, droga utilizada na prática clínica, se mostrou mais citotóxica para a linhagem de câncer de mama (MCF-7) e mais seletiva (IS >3) para as linhagens RAJI, MCF-7 e DU145 quando comparada à BE. Dessa maneira, podemos observar que a estratégia de utilizar substituintes ésteres e halogênios como o cloro e o flúor nas posições C-3 e C-28 simultaneamente, tornaram os novos derivados da BE sem atividade antineoplásica promissora.

No teste de citotoxicidade dos derivados do AB, observamos que as modificações realizadas geraram derivados tóxicos para as células normais, além de não serem seletivos para as linhagens de células tumorais selecionadas no estudo.

Tabela 2 – Efeito citotóxico dos novos derivados do ácido betulínico (IC<sub>50</sub>)\* e (IS)\*\* frente às células normais e células neoplásicas.

Compostos	RAJI (Linfoma de Burkitt's)		MCF-7 (Câncer de mama)		Hep-G2 (Hepatocarcinoma bem diferenciado)		DU 145 (Câncer de próstata)		PBMC (Células mononucleares do sangue periférico)
	IC <sub>50</sub>	IS	IC <sub>50</sub>	IS	IC <sub>50</sub>	IS	IC <sub>50</sub>	IS	IC <sub>50</sub>
AB	1,95 ± 5,40	3,26	31,82 ± 0,00	0,19	0,09 ± 0,28	67,65	66,57 ± 4,15	0,09	6,36 ± 2,84
1a	6,55 ± 6,09	1,02	21,62 ± 0,01	0,30	5,10 ± 1,10	1,30	68,49 ± 8,01	0,09	6,68 ± 2,30
1b	7,54 ± 7,71	0,74	53,92 ± 1,77	0,10	4,99 ± 0,48	1,12	70,22 ± 5,06	0,07	5,60 ± 1,12
1c	6,52 ± 7,68	0,85	12,72 ± 0,84	0,43	5,07 ± 0,84	1,08	71,67 ± 7,86	0,07	5,52 ± 1,63
1d	18,49 ± 9,43	0,33	90,18 ± 3,77	0,06	5,58 ± 1,13	1,10	91,05 ± 3,94	0,06	6,16 ± 3,01
1e	9,41 ± 8,23	0,67	20,19 ± 0,00	0,31	4,92 ± 0,84	1,29	62,42 ± 7,98	0,10	6,37 ± 0,99
1f	7,69 ± 7,96	1,13	50,35 ± 2,14	0,17	5,50 ± 0,31	1,59	>100 ± 0,78	0,08	8,75 ± 1,89
Doxorrubicina	11,91 ± 9,15	8,39	2,71 ± 0,87	36,90	39,22 ± 14,48	2,54	6,88 ± 1,06	14,53	>100

\*IC<sub>50</sub>: Dose que inibe 50% do crescimento celular (microgramas /mL), Média. ± Desvio Padrão

\*\*IS: Índice de Seletividade



Em 2010, Kommera e colaboradores sintetizaram 5 derivados do AB e 5 derivados da BE e testaram em 15 linhagens tumorais, além de usarem fibroblastos como suas células normais. Eles observaram que 4 destes compostos não foram ativos contra as células em estudo, mesmo nas maiores concentrações (100 $\mu$ M). Eles chegaram à conclusão que a adição de grupamentos pesados gera derivados com baixa atividade e menos citotóxicos. Comparando com o estudo de Kommera, o mesmo pode ter acontecido com algum dos nossos derivados da BE. Resultando na falta de atividade citotóxica desses derivados e falta de atividade moduladora contra as citocinas IL-6.

#### 4. CONCLUSÃO

Dos cinco derivados semissintetizados, dois mostraram efeito modulador da citocina pró-inflamatórias INF- $\gamma$ . Além disso, a BE e os 2 novos derivados foram capazes de modular a expressão proteica de um dos componentes chave do processo inflamatório, a ciclo-oxigenase 2. Quanto à avaliação tumoral dos novos derivados da BE, nenhum se mostrou com atividade citotóxica promissora frente às linhagens de células tumorais avaliadas. Já as modificações realizadas na semissíntese dos derivados do AB fizeram com que esses compostos se tornassem citotóxicos para as células normais (PBMCs) e não fossem seletivos para as células tumorais.

#### 5. REFERÊNCIAS

- DA SILVA, G. N. S. *et al.* Two series of new semisynthetic triterpene derivatives: differences in anti-malarial activity, cytotoxicity and mechanism of action. *Malaria journal*, v. 12, p. 89, 2013.
- DENARDO, D. G.; ANDREU, P.; COUSSENS, L. M. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer metastasis reviews*, v. 29, n. 2, p. 309–16, 2010.
- EMMERICH, D. *et al.* European Journal of Medicinal Chemistry Synthesis and studies of anticancer properties of lupane-type triterpenoid derivatives containing a cisplatin fragment. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 75, p. 460–466, 2014.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.
- POTZE, L. *et al.* Betulinic acid-induced mitochondria-dependent cell death is counterbalanced by an autophagic salvage response. *Cell death & disease*, v. 5, n. 4, p. e1169, 2014.
- YOGESHWARI, P.; SRIRAM, D. Betulinic acid and its derivatives: a review on their biological properties. *Current medicinal chemistry*, v. 12, n. 6, p. 657–666, 2005.



ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL– PNQM 41

## SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DO DERIVADO TIAZOLIDÍNICO LPSF/JB-8

J. F. BRANCO-JÚNIOR<sup>1</sup>, E.D.L. SILVA<sup>2</sup>, M.C. PEREIRA<sup>2</sup>, I.R. PITTA<sup>1</sup> e M.R.GALDINO-PITTA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas

E-mail para contato: branco.junior94@gmail.com

**RESUMO** – Nos últimos anos os derivados tiazolidínicos vêm chamando atenção do meio científico devido a sua ampla gama de efeitos biológicos, dentre eles sua atividade antineoplásica. O presente estudo buscou sintetizar, através 4 etapas reacionais, um novo derivado tiazolidínico (LPSF/JB-8) que exibisse boa atividade antineoplásica sem apresentar toxicidade contra células humanas saudáveis (PBMCs). Após 6h de reação o LPSF/JB-8 foi obtido com 23% de rendimento e alto grau de pureza (100%) de acordo com a técnica de CLAE. Sua massa foi confirmada pelo método de CG-EM (362m/z). A citotoxicidade em células neoplásicas foi observada através da técnica colorimétrica de MTT, sendo o LPSF/JB-8 eficaz contra a linhagem K562 (Leucemia Mielóide Crônica), diminuindo sua viabilidade sob às concentrações de 10 $\mu$ M (60,5  $\pm$  4,46) e 50 $\mu$ M (75,5  $\pm$  10,5). A molécula não apresentou citotoxicidade contra a linhagem T47D (Câncer de Mama) ou PBMCs. Para melhor avaliar o potencial antineoplásico do derivado tiazolidínico LPSF/JB-8, novas linhagens celulares serão testadas, bem como outras concentrações para encontrar o IC<sub>50</sub>.

**Palavras-chave:** Tiazolidina; Anticâncer; PPAR- $\gamma$ ; Química Medicinal

**ABSTRACT** – In recent years thiazolidine derivatives have been calling attention of the scientific community due to its wide range of biological effects, as its antineoplastic effects. This study aimed to synthesize, through 4 steps reaction, a new thiazolidine derivative (LPSF/JB-8) which exhibit good antineoplastic activity without showing toxicity to healthy human cells (PBMCs). After 6h of reaction, the LPSF/JB-8 was obtained in 23% yield and high purity (100%) according to HPLC technique. Its mass confirmed by GC-MS method (362m/z). The cytotoxicity in neoplastic cells was observed by MTT colorimetric technique. The LPSF/JB-8 was effective against K562 (chronic myeloid leukemia), reducing their viability in the concentrations of 10 $\mu$ M (60.5  $\pm$  4.46) and 50 $\mu$ M (75.5  $\pm$  10.5). The molecule showed no cytotoxicity against T47D line (lung cancer) or



*PBMCs. To further evaluate the antineoplastic potencial of the thiazolidine derivative LPSF/JB-8 new cell lines will be tested, as well as others concentrations to find the IC<sub>50</sub>.*

*Keywords: Thiazolidine; Anticancer; PPAR- $\gamma$ ; Medicinal Chemistry*

## 1. INTRODUÇÃO

Conhecidos por seu desempenho como hipoglicemiantes, os derivados Tiazolidínicos (comercializados como Glitazonas) atuam como agonistas do Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissomos  $\lambda$  (PPAR- $\lambda$ ), o que pode explicar o amplo leque de atividades biológicas que vêm sendo relacionadas à esta classe de moléculas, tais como anti-inflamatória, antitumoral e antimicrobiana. A atividade antitumoral é um dos principais efeitos biológicos dos derivados Tiazolidínicos e vem sendo alvo de vários estudos nos últimos anos (Chadha *et al*, 2015).

De acordo com Asati *et al*. (2014), os agonistas do PPAR- $\lambda$  podem ser uma nova alternativa para o tratamento do câncer, uma vez que sua atuação nos receptores das células neoplásicas estimula a expressão de proteínas antiproliferativas e antiangiogênicas. Apesar do seu mecanismo de ação ainda não ser muito bem compreendido, sabe-se que as tiazolidinas são capazes de induzir a morte por apoptose em células neoplásicas, bem como o arrasto do seu ciclo celular. Por isso, muito tem sido investido no desenvolvimento de novos derivados tiazolidínicos com atividade antineoplásica, principalmente os 5-arilideno-3-benzil-substituídos, que fazem interações com resíduos chave do PPAR- $\lambda$ , sendo considerados moléculas com grande potencial anticâncer (Asati *et al*, 2014; Chadha *et al*, 2015).

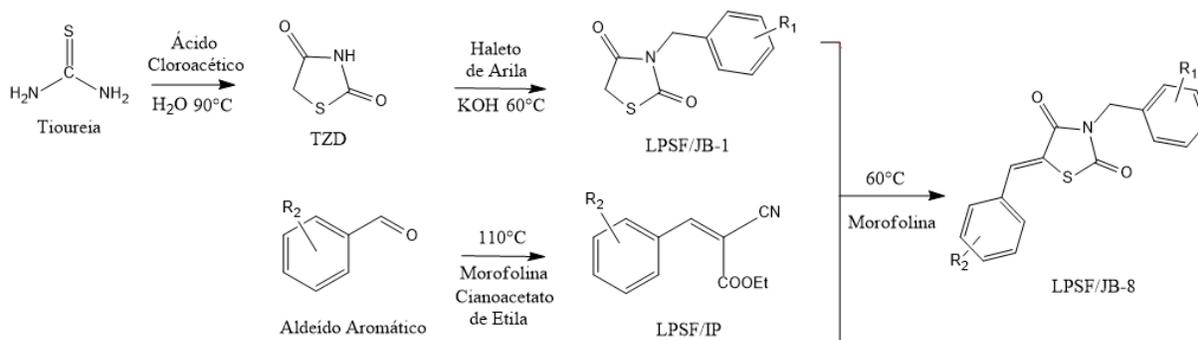
Baseado nisso, Rêgo *et al*. (2014) demonstraram a eficiência do novo derivado tiazolidínico 5-arilideno-3-benzil-substituído, LPSF/SF-13, em linhagens de hepatocarcinoma (HepG2), Glioblastoma (NG97), Leucemia de células T (Jukart) e Linfoma de Burkitt (Raji), o qual apresentou bom IC<sub>50</sub> (58.58 $\mu$ M, 73.73 $\mu$ M, 62.54 $\mu$ M e 58.8 $\mu$ M, respectivamente). Além disso, pesquisas mais recentes realizadas por Palkar *et al* (2016) apresentaram resultados animadores, uma vez que esta classe de moléculas se mostrou bastante efetiva no tratamento de linhagens de adenocarcinoma de pulmão humano (MCF-7), carcinoma cervical (HeLa) e carcinoma do colorretal (A549) com IC<sub>50</sub> muito baixo (0.95 $\mu$ M, 3.2 $\mu$ M e 2.38 $\mu$ M).

Tendo em vista o grande potencial anticâncer desta classe de moléculas relatado pela comunidade científica, o presente trabalho teve como objetivo sintetizar, caracterizar e avaliar a atividade antitumoral de novo derivado tiazolidínico codificado LPSF/JB-8 em células de doadores saudáveis e em linhagens de Carcinoma de Mama Humano (T47D) e de Leucemia Mielóide Crônica (K562).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. SÍNTESE ORGÂNICA

Para obtenção do derivado tiazolidínico 5-arylideno-3-benzil-substituído LPSF/JB-8 foram realizadas 4 etapas reacionais (1-Ciclização; 2-*N*-alquilação; 3-Condensação de Knoevenagel; 4-Adição de Michael), como descrito no Esquema 1. A ciclização foi realizada diluindo quantidades equimolares de ácido cloroacético e tiourea em água, sendo a solução mantida à 90°C por 18h, obtendo-se o núcleo Tiazolidínico (TZD). A *n*-alquilação do LPSF/JB-1 foi realizada através de uma reação ácido-base utilizando TZD e KOH (1.2eq), solubilizados em uma mistura de metanol e acetonitrila (1:3) por 40 minutos à temperatura ambiente (T.A). Em seguida foi adicionado o Haleta de arila em quantidade equimolar e a solução foi mantida à 60°C por 2h. Para obtenção do LPSF/IP foi utilizada a reação de condensação de Knoevenagel, a qual foi executada solubilizando quantidades equimolares de um aldeído aromático e cianoacetato de etila, juntamente com o catalizador morfolina (0,2eq), em Tolueno, sendo a reação mantida à 110°C por 4h. A adição de Michael foi a última etapa para obtenção do LPSF/JB-8, sendo realizada através da diluição de concentrações equimolares de LPSF/IP e LPSF/JB-1 em etanol, além de 0.2eq de morfolina, sendo a solução mantida à 60°C por 4h. O LPSF/JB-8 teve sua pureza verificada pela técnica de HPLC e sua massa comprovada pelo GC-MS.



Esquema 1 – Rota geral de síntese do LPSF/JB-8

## 2.2. SEPARAÇÃO DE PBMCS

Após aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Pernambuco, 4 voluntários saudáveis tiveram 27ml de sangue coletados em tubos de heparina mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. As células mononucleares do sangue periférico (PBMCS) foram separadas através da técnica de centrifugação por Ficoll Paque Plus (GE Helthcare), sendo as células ressuspensas em meio RPMI-1640 completo (suplementado com 10% Soro Fetal Bovino, 1% de HEPES e 1% de penicilina e estreptomicina).

## 2.3. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Para avaliação da citotoxicidade do composto LPSF/JB-8 foi utilizado o método de MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo). As células ressuspensas em meio RPMI-1640



completo foram contadas utilizando a câmara de Neubauer e o corante azul Tripian, sendo em seguida, incubadas em triplicata em placas de 96 poços na concentração de  $10^5$  cel/poço e tratadas com o composto LPSF/JB-8 nas concentrações de 10 e 75  $\mu$ M. Também foram utilizados poços contendo apenas células

(controle) e células tratadas com DMSO 0,1% (controle + veículo). Após 48 horas à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, foram adicionados 20  $\mu$ L de MTT (5mg/mL), sendo as células mantidas por 3h de incubação. Após este período, foi adicionado 30  $\mu$ L SDS 20% para a diluição dos cristais de Formazan. A leitura das placas foi realizada após 24 horas em um leitor de microplacas (Biotek EL808) à 570 nm.

## 2.4. CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS NEOPLÁSICAS

O método de MTT também foi aplicado para avaliar a citotoxicidade do LPSF/JB-8 em linhagens de Carcinoma de Mama Humano (T47D) e Leucemia Mielóide Crônica (K562), as quais foram cultivadas em meio RPMI-1640 e DMEM completos, respectivamente. As células foram incubadas em triplicata, utilizando placas de 96 poços, nas concentrações de  $2 \times 10^4$  cel/poço (T47D) e  $5 \times 10^3$  (K562), sendo tratadas com doses de 10 e 50  $\mu$ M do LPSF/JB-8 por 72h. Também foram utilizados poços “controle” e “controle + veículo”, seguindo o procedimento relatado no tópico anterior após o período de 72h de incubação à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Foram realizados dois experimentos independentes.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. SÍNTESE ORGÂNICA E CARACTERIZAÇÃO

Todas as etapas reacionais apresentaram rendimento satisfatório (Tiazolidina: 84%; LPSF/JB-1: 60%; LPSF/IP: 76%), com exceção da Adição de Michael que apresentou 23% de rendimento. Tal resultado pode ser explicado devido ao seu substituinte que dificulta a reação por este mecanismo, mas pode ser otimizado utilizando a Condensação de Knoevenagel. De acordo com a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), o LPSF/JB-8 apresentou 100% de pureza (Figura 1) e teve sua massa ( $M^+$  = 362m/z) identificada através da Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM) (Figura 2). O CG-EM, também forneceu dados sobre o padrão de fragmentação da molécula, onde o pico base foi de 173m/z (Intensidade = 100%), referente ao íon tropílio substituído, e o outro pico de maior intensidade (48,37%) foi de 119m/z, referente a um fragmento do núcleo tiazolidínico substituído, como mostra a Figura 2.

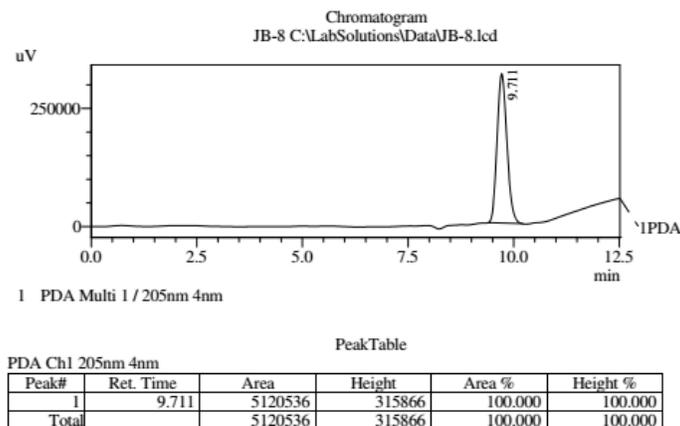


Figura 1 – Cromatograma do LPSF/JB-8 realizado por HPLC, demonstrando 100% de pureza e 9.711 min de tempo de retenção.

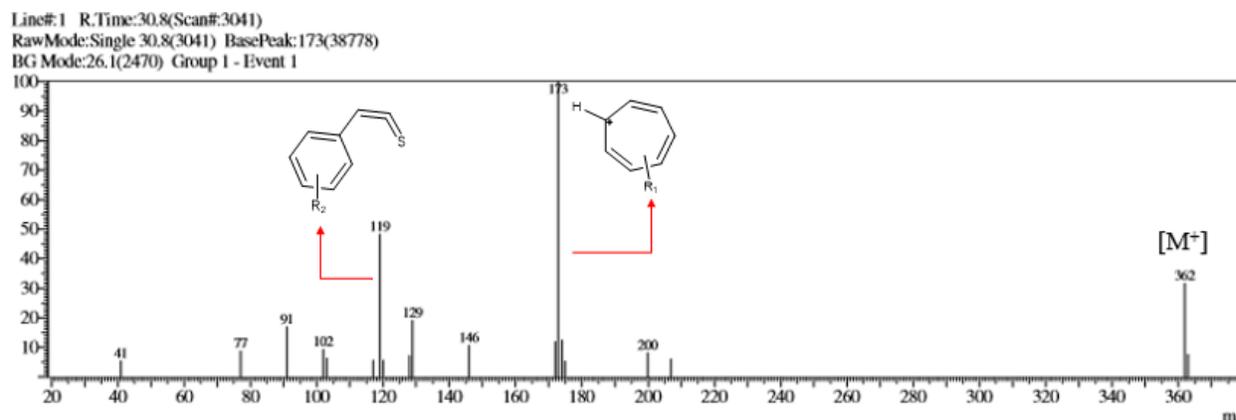


Figura 2 – Espectro de Massas do LPSF/JB-8 obtido por GC-MS, demonstrando seu íon molecular ( $M^+$ ) e seus principais fragmentos: 173 (íon tropílio substituído) e 119 (Fragmento do anel tiazolidínico).

### 3.2. CITOTOXICIDADE DO DERIVADO TIAZOLIDÍNICO

O LPSF/JB-8 não se mostrou tóxico em células de doadores saudáveis, exibindo uma viabilidade de 100% para as duas concentrações testadas. Sua atividade antitumoral foi observada na linhagem de K562, a qual apresentou viabilidade de  $60,5\% \pm 4,46$  à  $10\mu\text{M}$  e  $75,5 \pm 10,5$  à  $50\mu\text{M}$ . Em relação a linhagem T47D o composto não apresentou nenhum efeito citotóxico, com viabilidade acima de 80% como descrito na Tabela 1. O derivado será testado em outras doses para identificação do  $IC_{50}$ , em estudos posteriores.

Tais resultados confirmam os dados obtidos por Rêgo *et al.* (2014), demonstrando que derivados tiazolidínicos 5-arylídeno-3-benzil-substituídos podem ser efetivos no tratamento de leucemias. Entretanto, de acordo com Laxmi *et al.* (2016) geralmente esta classe de moléculas não apresenta grande atividade contra linhagens de câncer de mama, sendo as tiazolidinas 5-arylídeno-

substituídas mais indicadas, sobretudo em relação à linhagem T47D, a qual demonstrou viabilidade de 20,4% à 10 $\mu$ M no referido estudo, mas nenhuma atividade relativa a leucemias.

Tabela 1 – Citotoxicidade do composto LPSF/JB-8 em células saudáveis (PBMC) e em linhagem tumorais (K562 e T47D) nas doses de 10 e 75  $\mu$ M e 10 e 50  $\mu$ M, respectivamente.

PBMC (%)		K562 (%)		T47D (%)	
10 $\mu$ M	75 $\mu$ M	10 $\mu$ M	50 $\mu$ M	10 $\mu$ M	50 $\mu$ M
100	100	60,5 $\pm$ 4,46	75,5 $\pm$ 10,4	88,19 $\pm$ 1,44	88,15 $\pm$ 5,78

#### 4. CONCLUSÃO

Apesar do LPSF/JB-8 ter apresentado baixo rendimento, seus cristais exibiram alto grau de pureza e, através da técnica de CG-EM, foi possível comprovar a sua massa e identificar o seu padrão de fragmentação.

Embora os resultados relativos à sua atividade antitumoral sejam preliminares, podemos afirmar que o LPSF/JB-8 é efetivo contra células de leucemia. Por outro lado, ele não mostrou ser eficaz contra células de câncer de mama, provavelmente devido ao padrão de substituição 3,5 do anel tiazolidínico. Para melhor avaliação do seu potencial antineoplásico é interessante a realização de novos ensaios com diferentes linhagens tumorais, assim como a utilização de outras concentrações do composto para determinação dos respectivos IC<sub>50</sub>.

#### 5. REFERÊNCIAS

- ASATI, V.; MAHAPATRA, D.K.; BHARTI, S.K. Thiazolidine-2,4-diones as multi-targeted scaffold in medicinal chemistry: Potential anticancer agentes. *Eur. J. Med. Chem.*, v. 87, p. 814-833, 2014.
- CHADHA, N.; BAHIA, M.S.; KAUR, M.; SILAKARI, O. Thiazolidine-2,4-dione derivatives: Programmed chemical weapons for key protein targets of various pathological conditions. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 23, p. 2953-2974, 2015.
- LAXMI, S.V.; ANIL, P.; RAJITHA, G.; RAO, A.J.; CROOKS, P.A.; RAJITHA, B. Synthesis of thiazolidine-2,4-dione derivatives: anticancer, antimicrobial and DNA cleavage studies. *J. Chem. Biol.*, v. 9, p. 97-106.
- RÊGO, M.J.B.M.; GALDINO-PITTA, M.R.; PEREIRA, D.T.M.; SILVA, J.C.; RABELLO, M.M.; LIMA, M.C.A.; HERNANDES, M.Z.; PITTA, I.R.; GALDINO, S.L.; PITTA, M.G.R. Synthesis, in vitro anticancer activity and in silico study of new disubstituted thiazolidinedione derivatives. *Med. Chem Res.*, v. 23, p. 3220-3226, 2014.

#### 6. AGRADECIMENTOS

CAPES, UFPE, INCT-IF, PPGIT, NUPIT



**SISTEMA DE INOVAÇÃO  
EM SAÚDE**



ÁREA DE SUBMISSÃO: SISTEMA DE INOVAÇÃO EM SAÚDE – SIS 1

## DETECÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE LESÕES DE MAMA EM MAMOGRAFIAS UTILIZANDO REDES NEURAIS ARTIFICIAIS E ATRIBUTOS MORFOLÓGICOS

T. N. da CRUZ<sup>1</sup>, T. M. da CRUZ<sup>2</sup>, W. P. dos SANTOS<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Departamento de Engenharia Biomédica.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências em Saúde, Departamento de Terapia Ocupacional.

E-mail para contato: wellington.santos@ufpe.br

*RESUMO – O câncer de mama é um problema de saúde pública mundial, com uma alta taxa de incidência e mortalidade, onde o exame mais utilizado atualmente para se realizar diagnóstico de forma precoce é a mamografia. Este trabalho tem como objetivo verificar e analisar a aplicação de métodos de classificação baseados em redes neurais artificiais e descritores morfológicos na detecção da presença de nódulos mamários, visando buscar o método que otimiza a taxa de classificação e, por conseguinte, o diagnóstico de lesões de mama. Foram investigados três arquiteturas de classificadores, a saber: rede neural perceptron multicamadas (MLP), redes de função de base radial (RBF) e máquinas de vetor de suporte (SVM). Foi utilizada a base de imagens IRMA, que contém um conjunto de imagens de regiões de interesse consideradas suspeitas de ocorrência de lesão maligna ou benigna. Essas imagens foram representadas a partir da decomposição morfológica de wavelets, que tem como objetivo representar imagens a partir de componentes que combinam informação de orientação e de forma. A base possui 12 classes, organizadas de acordo com a densidade mamária (4) e classificação BI-RADS (3). O desempenho foi avaliado por meio da taxa de acerto, do índice do Kappa e da área ROC. O perceptron multicamadas com taxa de aprendizado de 0,03 atingiu o maior desempenho, com taxa de acerto de 96,21%, o que revela seu potencial para construção de sistemas de apoio ao diagnóstico por imagem.*

*Palavras chave: Classificação, Nódulos Mamários, Inteligência Artificial.*

*ABSTRACT – Breast cancer is a worldwide public health problem, with a high rate of incidence and mortality, where the test most widely used to perform so early diagnosis is mammography. This research aims to verify and analyze the application of classification methods based on artificial neural networks and morphological*



*descriptors in detecting the presence of breast lumps, aiming to seek the method that optimizes the classification rate and therefore the diagnosis of injury breast. Architecture softwre e classifiers have been investigated, namely, multilayer perceptron neural network (MLP), radial basis function networks (RBF) and support vector machines (SVM). In this research was employed the IRMA database, containing a set of image regions of interest suspected of occurrence of malignant or benign mammary lesions. These images were represented using wavelets morphological decomposition, which aims to represent images from components that combine information and geometric orientation. The database has 12 classes, organized according to breast density (4) and BI-RADS (3). The performance was evaluated by the accuracy rate, Kappa index, and ROC area. The multilayer perceptron with 0.03 learning rate reached the highest performance with accuracy rate of 96.21%, which shows its potential for building support diagnostic imaging.*

*Keywords: Classification, Breast Lumps, Artificial Intelligence.*

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama resulta da proliferação anormal das células da mama, que ocasiona um tumor com potencial de invadir outros tecidos. Sendo considerado um problema de saúde pública o câncer de mama é um grupo heterogêneo de patologias que possuem diferentes comportamentos. Devido a sua heterogeneidade ele se manifesta por diferentes apresentações clínicas e morfológicas e variadas características genéticas (Instituto Nacional do Câncer, 2015).

O câncer de mama corresponde a 22% dos tipos de câncer detectado anualmente, tendo sua maior incidência em mulheres do que em homens, sendo ele o tipo de câncer mais frequente no mundo e o primeiro que leva ao óbito indivíduos do sexo feminino. No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (Inca) relata 57.124 mil novos casos de câncer de mama no ano de 2014, uma média de 57 casos a cada 100.000 mulheres, onde 13.345 óbitos foram contabilizados em 2014. O exame mais utilizado hoje em dia para se realizarem de forma precoce, possíveis anormalidades no tecido mamário é a mamografia (Kinoshita *et al.*, 2008; Pereira, 2009; Pereira *et al.*, 2014; Instituto Nacional do Câncer, 2015).

Para categorização de lesões mamárias das mamografias, é utilizado atualmente no Brasil, o Breast Imaging Reporting and Data System (BI-RADS®), que teve origem no Colégio Americano de Radiologia (EUA) e foi traduzida para o Brasil, pelo Colégio Brasileiro de Radiologia. Esse método de categorização realiza a padronização do laudo de lesões mamárias e ainda sugere quais as condutas precisam ser tomadas em cada caso (Instituto Nacional do Câncer, 2010).

Diversas técnicas computacionais vêm sendo utilizadas desde que a Inteligência Computacional (IC) começou a ser utilizada na área médica, e uma das mais extensas no que se refere à aplicabilidade de bases de dados médicos complexos para reconhecimento de padrões são as Redes Neurais Artificiais (RNA), que visam à investigação da possibilidade de uma simulação de comportamentos inteligentes, baseados no cérebro humano (Bonifácio, 2010).

Nos dias de hoje, os sistemas computacionais englobam um grande volume de dados, e por esse fato os processos manuais e técnicas tradicionais de análise de dados não possibilitam a exploração de toda a informação implícita disponível. Contudo, desde o final dos anos 80, um recurso

automático para a análise de dados já vem sendo utilizado, em um processo conhecido como Descoberta de Conhecimento em Banco de Dados (*Knowledge Discovery in Databases- KDD*), onde dentro das etapas da composição do processo de KDD, a Mineração de Dados (*Data Mining - DM*) é a etapa responsável pela aplicação específica de algoritmos para extrair padrões de dados que fornecem um conhecimento útil. Sendo atribuídas diversas tarefas à Mineração de Dados tais como: Análise de Agrupamentos, Regras de Associação, Predição e Classificação (Bonifácio, 2010).

No que se refere à etapa de classificação, tem-se que existem diversos tipos de processo de classificação, contudo, as mais indicadas vêm sendo: a Perceptron Multicamadas (MLP), Redes de base radial (RBF) e Máquina de vetor suporte (SVM) (Frize, 2001; Bonifácio, 2010; Coneglian *et al.*, 2010).

O aprendizado de máquina pode facilitar a detecção e classificação de lesões mamárias quando não há alterações na textura ou na morfologia (Figura 1), e quando se tem apenas o recurso de investigação visual humano. Seguindo esse pensamento, o objetivo desse estudo, é verificar e analisar a aplicação do método de classificação na detecção da presença de nódulos mamários, visando buscar qual o método de classificação é mais eficiente para resolução do problema em estudo.

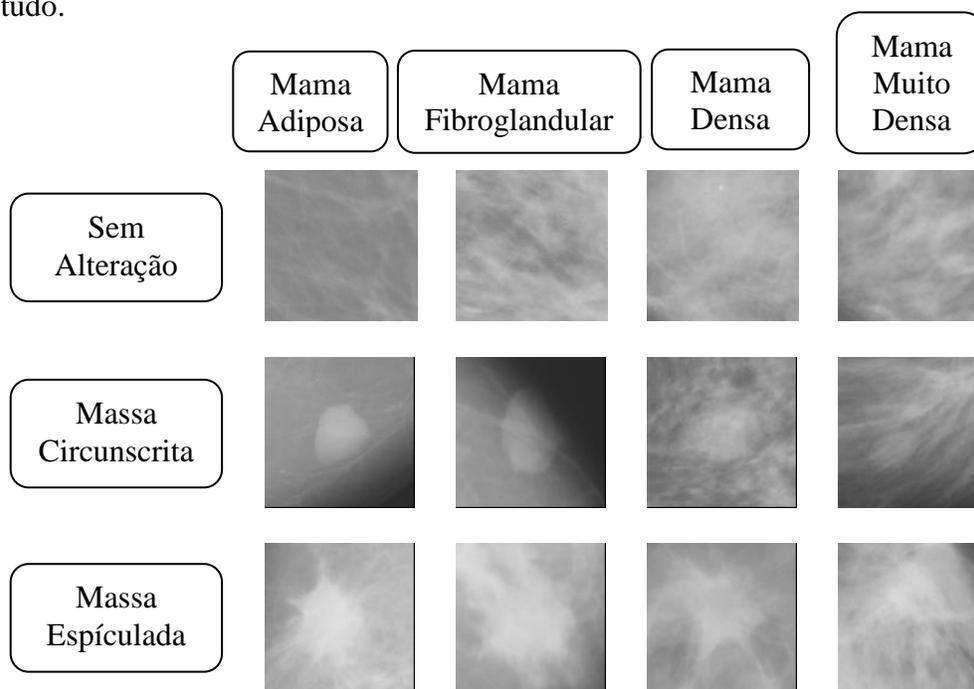


Figura 1: Imagens mamográficas categorizadas.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para alcançar o objetivo proposto pelo estudo presente, a base de dados foi classificada com diferentes métodos de classificação e com diferentes arquiteturas. A seguir serão apresentados os processos usados, para obter às melhores classificações e serem comparadas entre si.



Na literatura já são encontrados diversos estudos utilizando técnicas de inteligência computacional (IC), com o intuito de auxiliar o diagnóstico do câncer de mama (Bilskawolak *et al.*, 2005; Andrioni *et al.*, 2010).

Como ferramenta de apoio ao desenvolvimento da solução de apoio ao diagnóstico de lesões de mama, foi utilizado o, *software* Weka, desenvolvido em Java na Universidade de Waikato, Nova Zelândia, com um amplo acervo de algoritmos de aprendizado de máquina. A ferramenta está disponível em *software* livre. Nesta pesquisa foi utilizada a versão 3.6.13.

Neste trabalho foi utilizada a base de dados *Image Retrieval in Medical Applications* (IRMA), proveniente de um esforço de cooperação entre o Grupo de Pesquisa de Computação Biomédica do Departamento de Engenharia Biomédica da Universidade Federal de Pernambuco e o Departamento de Informática Médica da Universidade Aachen, na Alemanha, que reúne imagens de diversas outras bases de dados, disponíveis para consulta na Internet. A base consiste em regiões de interesse de imagens de mamografias digitais que foram classificadas por radiologistas e redimensionadas para imagens de tamanho 128 x 128 pixels.

Foram utilizadas 2796 imagens, das quais foram extraídos 225 atributos, obtidos por sua vez a partir de estatísticas dos termos da decomposição em wavelets morfológicas. Esse processo decompõe cada imagem em componentes com informação de forma e de orientação. A base está estruturada em 12 classes, organizadas de acordo com a densidade do tecido mamário (I - adiposa, II - fibroglandular, III - densa e IV - extremamente densa), e a classificação BI-RADS (BI-RADS 1 - Inexistente, BI-RADS 2 - Benigna e BI-RADS 5 - Maligna). Embora essas imagens também estejam organizadas de acordo com o tipo de lesão (0 - sem lesão, 4 - massa circunscrita e 5 - massa espículada), essa informação não foi utilizada, visando construir um método de classificação que minimizasse a necessidade de informação clínica adicional.

Posteriormente a essa etapa, escolheu-se os seguintes métodos de classificação para serem verificados e analisados: perceptron multicamadas (*Multi-Layer Perceptron*, MLP), rede de base radial (*Radial Basis Function*, RBF) e máquina de vetor suporte (*Support Vector Machine*, SVM). Os parâmetros dos classificadores foram definidos empiricamente.

A rede MLP foi treinada com taxas de aprendizado de 0,3 e 0,003, momento 0,2 e número de épocas 500. A rede RBF foi treinada com desvio padrão de 0,1. A SVM foi treinada com parâmetro de folga C de 0,1 e *kernel* RBF. Todos os experimentos foram rodados em uma máquina com processador Intel Core i34005U, 1.70GHz, 4GB de RAM, sistema operacional Windows 8 de 64 bits.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 são apresentados os resultados obtidos nos experimentos computacionais descritos na seção anterior, a saber, a taxa de acerto (%), o índice Kappa, e a área da curva ROC, para os classificadores perceptron multicamadas (MLP), para taxa de aprendizado de 0,3 e 0,03; rede de função de base radial (RBF); e máquina de vetor de suporte (SVM).

A partir dos resultados obtidos expostos na Tabela 1, percebe-se uma significativa melhoria do desempenho da rede MLP quando se muda a taxa de aprendizado de 0,3 para 0,03, produzindo-se um aumento da taxa de acerto de 54,76% para 96,21%, o que é praticamente o dobro do obtido com a taxa de aprendizado inicial. Isso indica que o problema de classificação das imagens de regiões de interesse de mamografia sofre com mínimos locais e, por conseguinte, a redução da taxa de



aprendizado permitiu a redução do passo de atualização dos pesos dos neurônios de forma que a área explorada pode se avizinhar da solução ótima. Isso é corroborado pelos resultados da rede RBF e da SVM. Na rede RBF obteve-se uma taxa de acerto praticamente igual à da MLP com taxa de aprendizado 0,3, o que confirma a hipótese de forte influência de mínimos locais. Já a SVM, por ser construída baseando-se no princípio de buscar otimizar a fronteira de decisão tornando-a equidistante das classes e definindo hiperplanos sobre vetores obtidos diretamente do conjunto de treino (os chamados vetores de suporte), obteve resultado muito próximo daquele da rede MLP: 93,53%. Os resultados do índice Kappa e da área da curva ROC são condizentes com esses resultados comentados.

Tabela 1 – Métodos de classificação e seus respectivos resultados

Classificad	Taxa de Acei (%)	Índi Kap	Ár RC
MLP 0,3*	54.76	0.50	0.5
MLP 0,03*	96.21	0.95	0,9
RBF	55.08	0.50	0,5
SVM	93.53	0.92	0,9

Legenda: \*Número total de instâncias: 2796 em 12 classes \*\*Taxa de Aprendizado

Contudo, quando se compara os tempos de aprendizado das redes MLP com taxa de aprendizado 0,03 e SVM, obtém-se para a primeira em média 2 horas, 51 minutos e 59 segundos, enquanto para a segunda apenas 15,52 segundos. Isso mostra que a SVM tem larga vantagem em termos de tempo de treinamento em relação à MLP. Contudo, a diferença de quase 3% da MLP para a SVM ainda aponta para a MLP como melhor método, uma vez que o processo de treinamento não será feito em tempo real, ou seja, o classificador será treinado uma vez e, obtendo-se os melhores parâmetros, será carregado na solução de apoio ao diagnóstico. Além disso, o custo computacional do processo de decisão, ou seja, da execução das redes, é praticamente o mesmo, podendo ser avaliado em milissegundos.

#### 4. CONCLUSÃO

Diariamente surgem na área da saúde novas informações, métodos e técnicas a serem utilizados nos mais variados espectros, e os sistemas de apoio ao diagnóstico, estão sendo cada vez mais inserido nessa realidade.

O sistema de apoio ao diagnóstico para detecção e classificação do câncer de mama, como o mostrado nesse estudo, é uma inovadora técnica, ainda pouco utilizada, contudo, ela vem ganhando seu espaço, pois a sua utilização pode trazer grandes benefícios, tais como: identificar lesões mamárias no seu estágio inicial, otimizar o tempo de classificação de malignidade das lesões mamárias e impedir procedimentos invasivos desnecessário. Esses benefícios, conseqüentemente irão ajudar a elevar a taxa de sobrevivência dos indivíduos, visto que até os dias de hoje, o índice de mortalidade do câncer de mama ainda é altíssimo e também ajudará a diminuir o número de



mastectomia, uma vez que, esse procedimento cirúrgico leva a perda da autoestima das mulheres com câncer de mama.

Isto posto, pode-se concluir, que a inovação na saúde, como o uso de sistemas de apoio ao diagnóstico, precisam ser constantemente estimulados e divulgados, pois seu uso leva uma prestação de serviço cada vez mais qualificada e humanizada.

## 5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo financiamento parcial da pesquisa.

## 6. REFERÊNCIAS

- ANDRIONI, V.; GUNGO, B. C.; PEREIRA, W. C. A.; INFANTOSI, A. F. C. “Rede neural artificial para redução de falso-positivos em mamografia detectados por diferença de gaussiana”. *Anais do XII CBEB*. Tiradentes: v.1, 2010.
- BILSKA-WOLAK, A. O.; FLOYD, C. E.; LO, J. Y.; BAKER, J. A. Computer Aid for Decision to Biopsy Breast Masses on Mammography: Validation on New Cases. *Academic Radiology*, June, v.12, no. 6, pp. 671-680. 2005.
- BONIFÁCIO, F. N. *Comparação entre as Redes Neurais Artificiais MLP, RBF e LVQ na Classificação de Dados*. Monografia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel, 2010. Disponível em: <<http://www.inf.unioeste.br/~tcc/2010/TCC-FernandoNunes.pdf>>, Acesso em: 01 Dez 2015 às 23h22min.
- CONEGLIAN, F. M.; GOMES, I. A.; RIBEIRO, S. R. A. Comparação entre classificações com Rede Neural Artificial em diferentes áreas de estudo no Paraná. *In: III Simpósio Brasileiro de Ciências Geodésicas e Tecnologias da Geoinformação*, Recife - PE, 27-30 de Julho de 2010.
- FRIZE, M. *et al.* Clinical decision support systems for intensive care units: using artificial neural networks. *Medical engineering & physics*. v.23, p.217 – 225, 2001.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Ministério da Saúde. *Sismama*. Coordenação Geral de Ações Estratégicas Divisão de Apoio à Rede de Atenção Oncológica (DARAO). 2010. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/Sismama.pdf>>, Acesso em: 24 Out 2016 às 14h57min.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Ministério da Saúde. *Falando sobre Doenças de Mama*, 2015. Disponível em:< <http://www.inca.gov.br>>, Acesso em 01 NOV 2015 às 22h53min.
- KINOSHITA, S. K.; MARQUES, P. M.; ROBERTO. R.; RADON-DOMAIN. Detection of the Nipple and the Pectoral Muscle in Mammograms. *Journal of Digital Imaging*, n. 21, p. 37-49, 2008.
- PEREIRA, D. C. *Técnica automática de detecção de nódulo mamário usando informações de multivisão*. Tese de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Engenharia de Informação da Universidade Federal do ABC, 2009.
- PEREIRA, D.C.; RAMOS, R.P.; NASCIMENTO, M. Z. Segmentation and detection of breast cancer in mammograms combining wavelet analysis and genetic algorithm. *Computer methods and programs in biomedicine II4*, Volume 114, p. 88-101, 2014.



ÁREA DE SUBMISSÃO: SISTEMA DE INOVAÇÃO EM SAÚDE - SIS 2

## PROPOSTA DE UM TOMÓGRAFO DE IMPEDÂNCIA DE BAIXO CUSTO BASEADO NO PARADIGMA OPEN-HARDWARE

D. E. RIBEIRO<sup>1</sup>, R. R. RIBEIRO<sup>3</sup>, V. A. F. BARBOSA<sup>1</sup>, H. DEBUS<sup>2</sup>, M.P.M LIMA<sup>2</sup>, N. S. SOARES<sup>4</sup>,  
W. P. dos SANTOS<sup>1</sup>, R. E. de SOUZA.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Departamento de Engenharia Biomédica

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Departamento de Engenharia Química

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Pós-Graduação em Ciência de Materiais

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Departamento de Eletrônica e Sistemas

E-mail para contato: david.eribeiro@ufpe.br

*RESUMO – A Tomografia por Impedância Elétrica (TIE) é uma tecnologia não invasiva e livre de radiações ionizantes para aquisição de imagens de uma região através de suas grandezas elétricas. O método se baseia na aplicação de um padrão de corrente elétrica alternada de baixa intensidade através de eletrodos dispostos em torno da superfície da região a qual se quer imagear, em seguida os potenciais elétricos resultantes à excitação são medidos. A proposta da pesquisa é trabalhar a melhoria dos métodos de reconstrução de imagens de TIE na tentativa de obter imagens de melhor resolução em um tempo de reconstrução menor, e também, a construção de um protótipo do sistema de aquisição de dados com o objetivo de obter um tomógrafo completo, de baixo custo e portátil.*

*Palavras Chave: Tomografia por impedância elétrica, reconstrução de imagens, hardware.*

*ABSTRACT - Electrical Impedance Tomography (EIT) is a noninvasive and an ionizing radiation free technology for images acquisition on a region through their electrical parameters. The method is based on the application of an alternating electric current pattern of low intensity through electrodes arranged around the surface region in order to obtain the image, as also to measure the excitation electrical potentials. The aim of this research is to work on the improvement of the EIT image reconstruction methods, in an attempt to acquire better resolution images in a smaller reconstruction time, furthermore the aim is also the construction of a prototype data acquisition system in order to obtain a complete and portable tomography at a low cost.*

*Keywords: Electrical Impedance Tomography, image reconstruction, hardware.*



## 1. INTRODUÇÃO

A Tomografia por Impedância Elétrica (TIE) é uma tecnologia não invasiva e livre de radiações ionizantes para aquisição de imagens tomográficas. Ela se baseia na aplicação de um padrão de corrente elétrica alternada (Tehrani *et al.*, 2010), de baixa amplitude e alta frequência, através de eletrodos dispostos em torno da superfície da seção do corpo, e na medição do potencial resultante nos eletrodos. As imagens de TIE são a reconstrução computacional do mapeamento estimado das condutividades ou permissividades elétricas do interior da seção do corpo, calculadas a partir da relação entre os dados de excitação e os dados de resposta.

A TIE destaca-se em aplicações médicas, foco principal desse projeto, e também em geofísica e na área industrial. Dentre as aplicações médicas, a TIE é aplicada principalmente na detecção de câncer de mama, acidente vascular cerebral, e para monitorar a ventilação pulmonar imposta por ventilação mecânica (Tehrani *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2010).

Outras técnicas para imagens médicas tais como ressonância magnética, ultrassonografia e tomografia computadorizada, possuem maior velocidade de reconstrução e resolução das imagens geradas com qualidade superior. No entanto, a TIE não utiliza radiações ionizantes, sendo inofensiva ao paciente e com custo de implementação baixo associado e as pequenas dimensões do equipamento, evitando a remoção do paciente de seu leito para a realização do exame, fazendo dessa técnica bem promissora para substituir algumas tecnologias existentes.

A técnica de TIE consiste na solução dos problemas direto e inverso (Tehrani *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2010). O problema direto consiste em se determinar os potenciais elétricos no interior da seção do corpo e os potenciais medidos em seu contorno a partir do padrão de excitação de corrente. Essa relação é dada pela Equação de Laplace. A estimativa da distribuição de condutividade e permissividade elétrica do interior da seção do corpo a partir das medições da resposta a excitação é, matematicamente, um problema inverso, não linear e mal posto (Kumar *et al.*, 2010). Não linear visto que a função que representa o potencial obtido no contorno do corpo depende de forma não linear da corrente elétrica aplicada. Mal posto porque a solução para a distribuição de condutividades e permissividades pode não ser única e ser instável além de apresentar grande sensibilidade a erros numéricos e ruídos experimentais. Essas características fazem com que sua solução seja bastante dependente do algoritmo de reconstrução e da regularização (Tehrani *et al.*, 2010) e pode ser obtida através de métodos não iterativos (lineares) e iterativos (não lineares) (Tehrani *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2010). Métodos de reconstrução baseados em Inteligência Computacional também vêm sendo bastante utilizados no estado da arte da técnica (Adler & Lionheart, 2006; Liu & Sun, 2011; Price *et al.*, 2005). A proposta é a construção de um tomógrafo de impedância elétrica de baixo custo, empregando uma estratégia de particionamento de projeto, onde será desenvolvido um sistema para aquisição e condicionamento de dados para pré-processar e transferir para um computador os potenciais elétricos da borda da área imageada, executando reconstrução da imagem com os algoritmos de reconstrução adequados.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

A Tomografia por Impedância Elétrica (TIE) trata-se de uma técnica para mapeamento de condutividade ou permissividade elétrica de uma seção de um corpo ou objeto, buscando obter a imagem por meio da injeção de corrente elétrica alternada através de eletrodos de superfície dispostos em torno do corpo e na medição dos potenciais elétricos nestes eletrodos em resposta às excitações elétricas (Garcia *et al.*, 2013; Tehrani *et al.*, 2010), como esquematizado na Figura 1.

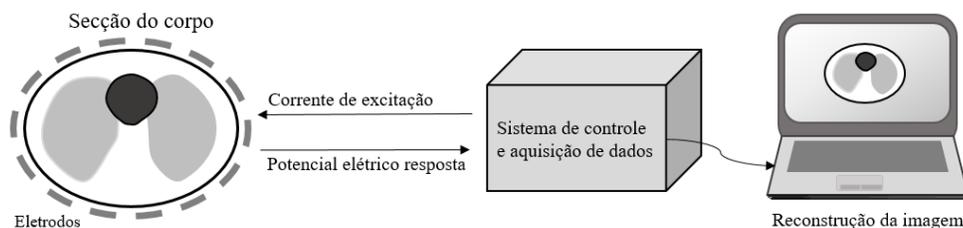


Figura 1- Esquematização da TIE.

As formas possíveis de excitação do corpo por injeção de corrente elétrica, podem ser: adjacente e diametral. No padrão de excitação adjacente toma-se o eletrodo mais próximo como ponto de referência (Menin, 2009; Borcea, 2002), enquanto o padrão diametral considera o eletrodo diametralmente oposto como ponto de referência (Menin, 2009; Borcea, 2002). Por meio da alternância do par de eletrodos (injeção e referência) em torno da seção do corpo pode-se obter um conjunto de dados linearmente independentes, sendo o resultado da resolução deste conjunto de dados o mapa de condutividade ou permissividade elétrica.

A imagem de TIE é obtida através do *hardware*, utilizado para injetar a corrente elétrica e medir as respostas a esta excitação, e o *software* para reconstruir a imagem através da obtenção direta de uma solução aproximada para o conjunto de dados mencionado anteriormente (Vallejo, 2007), onde a solução proposta respeita o diagrama de blocos na Figura 2.

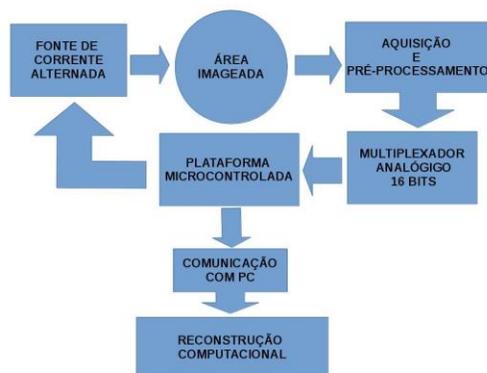


Figura 2 - Diagrama de blocos.

- **Plataforma Microcontrolada:** Baseada em *open-hardware* de baixo custo, é responsável

pelo controle do módulo de excitação dos eletrodos e também a leitura das tensões oriundas dos pares a considerar, feitas através da multiplexação de entradas analógicas.

- **Fonte de Corrente Alternada:** Dimensionou-se uma fonte de corrente senoidal de 1 mA a fim de atender as necessidades de um sinal com baixa amplitude e frequências na faixa 10 KHz a 250 KHz (Gurmeet *et al.*, 2015).
- **Aquisição e Pré-Processamento:** Os sinais que serão coletados dos eletrodos são tratados e amplificados para a leitura através dos multiplexadores.
- **Multiplexador Analógico de 16 bits:** Entrega ao microcontrolador a leitura das tensões de um par de eletrodos seguindo as técnicas vistas na introdução.
- **Comunicação com Computador:** Os dados oriundos da leitura devem ser transmitidos de forma digital, a fim de serem processados pelo *software* de reconstrução.
- **Reconstrução computacional:** Em um computador, os dados do mapeamento das impedâncias são processados por um algoritmo que reconstrói a imagem.

Uma das formas de obter o mapa de condutividade ou permissividade elétrica na seção do corpo está ilustrada no esquema a seguir, sendo esta uma forma de resolução indireta do problema de TIE através de algoritmos de otimização, tais como: Evolução Diferencial (Ribeiro *et al.*, 2014a), Algoritmo Genético (Ribeiro *et al.*, 2014b), Simulated Annealing (Ribeiro *et al.*, 2015), Otimização por Enxame de Partículas (Feitosa *et al.*, 2014), Busca por Cardume de Peixes (Barbosa *et al.*, 2016), Programação Evolucionária (Silva *et al.*, 2016), entre outros.

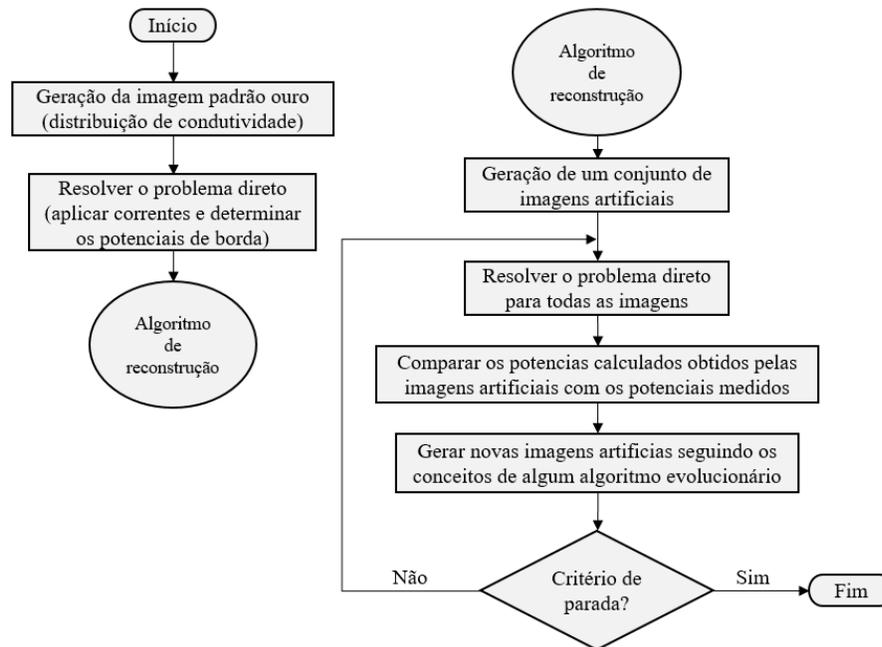


Figura 3 - Fluxograma da reconstrução de imagens de TIE como um problema de otimização.

Na Figura 3 é dado o fluxograma da simulação da reconstrução de imagens de tomografia por impedância elétrica como um problema de otimização. O primeiro passo do método é a elaboração de

uma imagem de prova ao qual por simulação iremos tentar reconstruí-la usando os conceitos de TIE e algum algoritmo de otimização. Essa imagem é chamada de imagem padrão ouro a qual é dividida pelas formas geométricas consideradas pelo Método que a define. A distribuição de condutividade é o conjunto formado pelos valores de condutividade de todos os elementos que compõem a imagem. Em seguida, por meios computacionais, correntes elétricas são aplicadas à imagem padrão ouro e a resposta a esta excitação (i.e. os potenciais elétricos na borda da imagem) é medida. Os dados de corrente de excitação e potenciais de borda medidos são então consideradas no algoritmo de reconstrução. Os métodos de reconstrução utilizados neste trabalho foram algoritmos iterativos baseado em populações, dessa forma, a reconstrução começa a partir da geração de um conjunto de imagens artificiais e para cada imagem é resolvido o problema direto obtendo seus potenciais de borda. Esses potenciais são comparados com os potenciais de borda da imagem padrão ouro através do Erro Médio Quadrático. Usando os conceitos de algum algoritmo evolucionário, novas imagens são geradas a cada iteração com o objetivo de obter um erro cada vez menor. O processo de geração de novas imagens será repetido até que algum critério de parada do algoritmo evolucionário seja satisfeito: a imagem obtida com o menor erro médio quadrático será considerada como reconstruída. É importante observar que as duas primeiras etapas do fluxograma são necessárias por estarmos tratando a simulação da reconstrução por impedância elétrica, no caso da realização da tomografia real, onde se é aplicado de fato correntes elétricas e medidos os potenciais de borda de um objeto ou corpo, estes itens não são necessários.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A aplicação de algoritmos inteligentes têm tido progresso significativo e direcionado novos métodos que tem melhorado a resolução das imagens. A Figura 4 contém três imagens padrão ouro geradas em um ambiente de simulação computacional: Centralizada, entre o centro e borda e na.

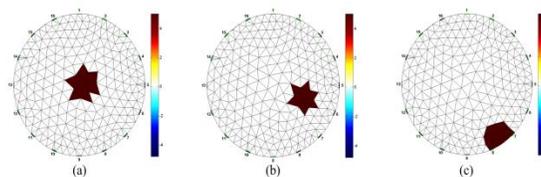


Figura 4 - Imagens geradas pelo EIDORS

Como o *hardware* do tomógrafo ainda está em processo de desenvolvimento, gera-se imagens padrão ouro para aferir a qualidade das imagens reconstruídas pelas técnicas propostas. Pode-se destacar os resultados de dois trabalhos desenvolvidos por pesquisadores do grupo de Tomografia por Impedância Elétrica do programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade

Federal de Pernambuco: Um utilizando Algoritmos genéticos (AG) (Ribeiro *et al.*, 2014b) e outro a Evolução Diferencial (ED) (Ribeiro *et al.*, 2015) como demonstrado nas Figuras 5 e 6.

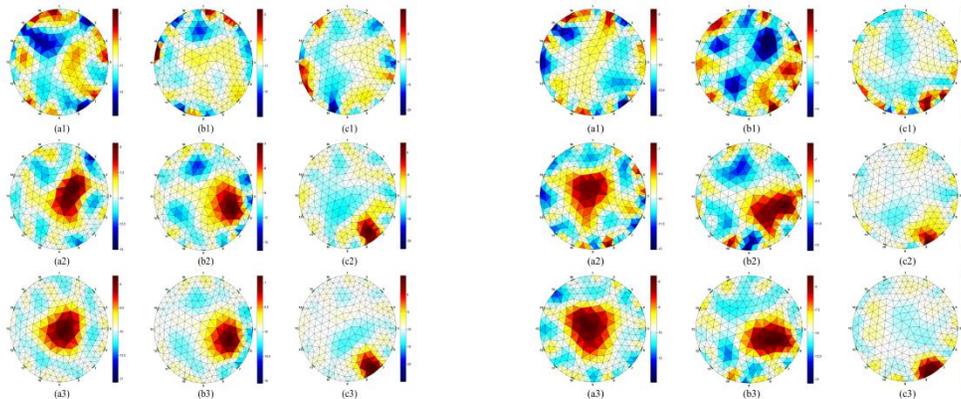


Figura 5 - Algoritmos Genéticos.

Figura 6 - Evolução diferencial.

Cada figura representa os resultados de reconstrução para objetos colocados no centro (a1, a2 e a3), entre centro e borda (b1, b2 e b3), e perto da borda (c1,c2 e c3) do domínio circular para 50, 300 e 500 iterações usando AG e ED, respectivamente. O aumento de iterações faz com que os algoritmos convirjam para resultados com menor erro e conseqüente melhor qualidade das reconstruções. Apesar do resultado ser satisfatório, pesquisas em andamento buscam novos algoritmos ou técnicas híbridas para uma melhor resolução das imagens em menos tempo de processamento. Neste contexto, um objetivo importante de *software* de reconstrução foi alcançado, com soluções que mostram resultados consistentes e com baixo custo computacional facilitando execução em computadores de menor preço de aquisição.

Com relação ao *hardware*, há um esforço para a aquisição de materiais que possibilitem a construção completa do tomógrafo. embora haja a facilidade de trabalhar com *hardware* aberto ainda é insuficiente a oferta de componentes em nosso país, tendo assim a necessidade de importação de alguns componentes para conclusão dessa etapa do trabalho e que completará o objetivo geral do trabalho de concluir um protótipo completo, seguro em sua utilização e portátil.

## 4. CONCLUSÃO

A Tomografia por Impedância Elétrica se mostra uma técnica promissora que poderá vir a ocupar mais espaços no apoio ao diagnóstico, sendo importante ferramenta a ser considerada em aplicações médicas. Espera-se que ao término do protótipo de baixo custo, a pesquisa comece a gerar as próprias imagens a serem reconstruídas e comparadas com outras ferramentas para fins de consolidação.

Implementar um dispositivo baseado em *hardware* aberto (*Open-Hardware*) com um bom tratamento dos sinais provenientes da leitura dos eletrodos e um aprimoramento de técnicas baseadas

em algoritmos inteligentes poderá deixar o protótipo encaminhado a um dispositivo comercial e completamente integrado à realidade da tomografia.

## 5. REFERÊNCIAS

- ADLER, A.; LIONHEART, W. R. B. Uses and abuses of EIDORS: an extensive *software* base for EIT. *Physiol. Meas.* 27, S25-S42. 2006
- BARBOSA, V. A. F.; RIBEIRO, R. R.; FEITOSA, A. R. S.; FREITAS, R. C.; NELO, M. F. B.; SILVA, V. L. B. A.; SOUZA, R. E.; SANTOS, W. P. Reconstrução de imagens de TIE usando busca por cardume de peixes e density based on fish school search. In: XXV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, 2016, Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil.
- BORCEA, L. Electrical impedance tomography. *Inverse Problems*, v. 18, p. R99-R136, 2002.
- FEITOSA, A. R. S.; RIBEIRO, R. R.; BARBOSA, V. A. F.; SOUZA, R. E.; SANTOS, W. P. Reconstruction of electrical impedance tomography images using particle swarm optimization, genetic algorithms and non-blind search. In: 5th IEEE Biosignals and Biorobotics Conference, 2014, Salvador. ISSNIP- BIOSIGNALS AND ROBOTICS FOR BETTER AND SAFER LIVING, 2014.
- GARCIA, F. D.; SOUZA, M. N.; PINO, A. V. Algoritmo de reconstrução de imagens para um sistema de Tomografia por Impedância Elétrica (TIE) baseado em configuração multiterminais. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*, v. 29, n. 2, p. 133-143. 2013.
- GURMEET, S.; ANAND, B. L.; SRIVASTAVA, A. and SING, V. "Development of a microcontroller based electrical impedance tomography system," Systems, Applications and Technology Conference (LISAT), 2015 IEEE Long Island, Farmingdale, NY, p. 1-4, 2015.
- LIU, Y; SUN, F. A fast differential evolution algorithm using k-Nearest Neighbour predictor. *Expert Systems with Applications*, v. 38, n. 4, p. 4254-4258, 2011.
- MENIN, O. H. Método dos Elementos de Contorno para Tomografia por Impedância Elétrica. Tese (Mestrado), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2009.
- PRICE, K.; STORN, R. M.; J. A. LAMPINEM. *Differential Evolution: a practical approach to global optimization*. New York: Springer, 2005.
- RIBEIRO, R. R.; FEITOSA, A. R. S.; SOUZA, R. E.; SANTOS, W. P. A modified differential evolution algorithm for the reconstruction of electrical impedance tomography images. In: 5th IEEE Biosignals and Biorobotics Conference, 2014, Salvador. ISSNIP- BIOSIGNALS AND ROBOTICS FOR BETTER AND SAFER LIVING, 2014a.
- RIBEIRO, R. R.; FEITOSA, A. R. S.; SOUZA, R. E.; SANTOS, W. P. Reconstruction of electrical impedance tomography images using genetic algorithms and non-blind search. In: IEEE International Symposium on Biomedical Imaging, 2014, Beijing. In: IEEE International Symposium on Biomedical Imaging, 2014b.
- RIBEIRO, R. R.; FEITOSA, A. R. S.; BARBOSA, V. A. F.; SILVA, V. L. B. A.; ROCHA, A. D. D.; FREITAS, R. C.; SOUZA, R. E.; SANTOS, W. P. Reconstrução de Imagens de TIE usando Simulated Annealing, Evolução Diferencial e Algoritmos Genéticos. In: XII Congresso Brasileiro de Inteligência Computacional, 2015, Curitiba. XII Congresso Brasileiro de Inteligência Computacional, 2015.
- SILVA, V. L. B. A.; BARBOSA, V. A. F.; FREITAS, R. C.; RIBEIRO, R. R.; LIMA, M. P. M.; SOUZA, R. E.; SANTOS, W. P. Aplicação de programação evolucionária e algoritmo genético para reconstrução de imagens e EIT. In: XXV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, 2016, Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil. XXV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, 2016.
- TEHRANI, J. N.; JIN, C.; MCEWAN, A.; SCHAİK, A. A comparison between compressed sensing algorithms in Electrical Impedance Tomography. *32nd Annual Conference of IEEE EMBS*, 2010.



VALLEJO, M. F. M. Algoritmo de Tomografia por Impedância Elétrica utilizando Programação Linear como Método de Busca da Imagem. Tese (Mestrado), Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2007.

## **6. AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem às agências de fomento à pesquisa CAPES e FACEPE pelo financiamento parcial desta pesquisa.



# **TERAPIAS EM SAÚDE**



ÁREA DE SUBMISSÃO: TERAPIAS EM SAÚDE – TS 1

## TRATAMENTO DE PACIENTES COM *OVERDOSE* AGUDA POR BENZODIAZEPÍNICOS

T. S. O. ALMEIDA<sup>1</sup>, C. MOLA<sup>1</sup>, K. P. RANDAU<sup>2</sup> e S. L. S. M. A. BALTAR<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT)

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

E-mail para contato: thassysarmento@hotmail.com; mola.carla@gmail.com

*RESUMO - Benzodiazepínicos surgiram em meados dos anos 60, como o aumento no interesse da descoberta de novas substâncias tranquilizantes, atuando como moduladores alostéricos positivos através da interação com os receptores GABA. Entretanto ainda existem controvérsias e escassez de evidências científicas a respeito da farmacodependência por benzodiazepínicos, sendo apenas consenso à geração de tolerância ao uso dessas substâncias. Entretanto, a classe dos benzodiazepínicos é a responsável pelo maior número de intoxicações por medicamentos. O presente trabalho teve o objetivo de apresentar os tratamentos indicados para pacientes com intoxicações por benzodiazepínicos através de uma revisão sistematizada da literatura mediante busca eletrônica em base de dados MEDLINE-NLM, MEDLINE-EBSCO, Scopus da Elsevier, SciELO e Cochrane Library, utilizando as palavras “benzodiazepines AND toxicology”. Constatou-se que o uso irracional de benzodiazepínicos pode gerar graves problemas de saúde, em especial, nos casos de intoxicações que, apesar de não apresentarem alta letalidade, trazem sofrimento ao paciente e oneram o sistema de assistência em saúde no Brasil. Neste sentido, são necessárias medidas urgentes de prevenção e de controle dos agravos que abordem essa problemática em uma perspectiva interdisciplinar e multiprofissional.*

*Palavras-chave: Intoxicação, terapêutica, farmacodependência.*

*ABSTRACT - Benzodiazepines emerged in the mid-60s, as the increase in the interest of finding new substances tranquilizers, acting as positive allosteric modulators through interaction with GABA receptors. There are still controversies and lack of scientific evidence about drug dependence by benzodiazepines, and only consensus the generation of tolerance to the use of these substances. However, the class of benzodiazepines is responsible for the largest number of poisonings by drugs. This study aims to list the*



*possible treatments for patients with poisoning by benzodiazepines through a systemized review of current literature through electronic search in the databases MEDLINE-NLM, MEDLINE-EBSCO, Scopus da Elsevier, SciELO and Cochrane Library, using the words "benzodiazepines AND toxicology". Therefore, the irrational use of benzodiazepines may lead to serious problems, in particular cases of poisonings, although not present high lethality, bring suffering to the patient and burden the health care system in Brazil. Preventive and control measures are necessary and urgent and to address this issue in an interdisciplinary and multidisciplinary perspective.*

*Key-words: Poisoning, therapy, drug dependence.*

## 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a industrialização mundial e a facilidade de acesso a substâncias potencialmente tóxicas contribuíram, fatalmente, para o aumento dos eventos tóxicos (Araújo, 2012). No Brasil, a Rede Nacional de Centros de Informação e Assistência Toxicológica (RENACIAT), registrou, em 2012, 99.035 casos de intoxicação em humanos, e os medicamentos ocuparam a primeira posição em um conjunto de 13 grupos de substâncias (SINITOX, 2014).

Em trabalhos disponíveis na literatura científica (Alcântara *et al.*, 2013; Bernardes *et al.*, 2010; Bertasso-Borges *et al.*, 2010; Morais *et al.*, 2008) que avaliam exposições intencionais a medicamentos, constata-se que os benzodiazepínicos, os antidepressivos não tricíclicos e os antipsicóticos foram responsáveis pelo maior número de exposições tóxicas registradas em atendimentos de emergência (Alcântara *et al.*, 2013; Bernardes *et al.*, 2010; Bertasso-Borges *et al.*, 2010; Morais *et al.*, 2008). Entretanto, a classe dos benzodiazepínicos é a responsável pelo maior número de intoxicações por medicamentos, destacando-se o clonazepam e o bromazepam (Alcântara *et al.*, 2013; Bertasso-Borges, 2010; Souto, 2012).

Os benzodiazepínicos surgiram em meados dos anos 60, para substituir os barbitúricos no tratamento da ansiedade, como novas substâncias tranquilizantes (Ferraz, 2010). Eles atuam como moduladores alostéricos positivos, interagindo com os receptores GABA do subtipo GABA<sub>A</sub>, os quais estão localizados no córtex cerebral, cerebelo e estruturas límbicas. Em contraste com os barbitúricos, a modulação do receptor pelos agonistas benzodiazepínicos não é maior do que a condutância que pode ser conseguida com altas concentrações de receptores GABA sozinhos, e não abrem o canal de cloro na ausência de GABA (Rudolph; Knoflach, 2011). Essa interação ocorre de forma indireta, pois os receptores dos benzodiazepínicos se situam na mesma estrutura desses receptores GABA e, dessa forma, aumentam a resposta ao neurotransmissor GABA, que é inibitório, pois, ao se abrir, permite a entrada de cloreto, hiperpolarizando o neurônio. Desse modo, os compostos gabaérgicos, como os benzodiazepínicos, apresentam os efeitos de sedação, redução da ansiedade e agressividade, indução do sono, relaxamento muscular, amnésia anterógrada e ação anticonvulsivante (Fuchs; Wannmacher, 2010).

Atualmente, estes fármacos perdem seu lugar para as drogas agonistas dos receptores GABA<sub>A</sub>, como o zolpidem MR (*Modified-Release*), para uso clínico e o Eszopiclona (*Eszopiclone*), para uso a longo prazo para insônia, considerando aspectos de segurança. Embora sejam mais onerosas, possuem eficácia semelhante e menos efeitos colaterais (Sukys-Claudino *et al.*, 2010).



É necessário enfatizar que a tolerância é a primeira manifestação do uso crônico e que, somada à síndrome de abstinência, constituem em fenômenos resultantes de adaptações fisiológicas reversíveis, que ocorrem como uma consequência natural da exposição a um fármaco e que não implicam em dependência (Moreau, 2008; Stahl, 2010). Apesar do intenso e característico desconforto inicial, devido à presença da síndrome de abstinência, pacientes conseguem ficar livres dos benzodiazepínicos. A melhor técnica, amplamente reconhecida como a mais efetiva, é a retirada gradual da medicação, sendo recomendada mesmo para pacientes que usam doses terapêuticas. Além das vantagens relacionadas ao menor índice de sintomas e a maior possibilidade de sucesso, essa técnica é facilmente exequível e de baixo ônus (Berger, *et al.*, 2012; Maremani, *et al.*, 2013).

Sobre a farmacodependência por benzodiazepínicos, quase não existem evidências científicas que comprovem o desenvolvimento em usuários desse fármaco, entretanto, um estudo realizado na Polônia, do tipo caso-controle, no qual se comparou um grupo pareado de pacientes psiquiátricos (N=120) com diagnóstico de farmacodependência e um grupo de ex-usuários não farmacodependentes, se observou que o risco de farmacodependência aos benzodiazepínicos foi maior para pacientes com dificuldades psicossociais, prévias ao uso, de reação às dificuldades da vida. O diagnóstico de farmacodependência dos pacientes foi feito usando a Classificação Internacional de Doenças (CID-10) (Konopka *et al.*, 2013). Recentemente, um relato de caso, apontou dependência de um paciente com uma história de tratamento psiquiátrico por 20 anos com dependência de benzodiazepínicos (Kacirova *et al.*, 2016).

Os benzodiazepínicos são fármacos relativamente seguros. Depressão respiratória e cardiovascular pode ocorrer em circunstâncias especiais, como injeção intravenosa rápida ou em pacientes com disfunção hepática. A administração de fármacos de ação ultracurta, como o midazolam pode causar apneia e óbito. A via intravenosa também pode estar associada com maior grau de hipotensão do que as demais vias (Lima *et al.*, 2008).

Considerando, portanto, os benzodiazepínicos como fármacos mais prevalentes em intoxicações humanas, inclusive intencionais, o objetivo desta revisão é uma reflexão sobre aspectos fármaco-toxicológicos dessas substâncias como estratégia para melhor tratar os indivíduos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Uma revisão sistematizada da literatura galgou responder a seguinte pergunta: qual a estratégia para melhor tratar os indivíduos com intoxicação aguda por benzodiazepínicos? Assim, foi conduzida a busca nas seguintes bases de dados: MEDLINE-NLM, MEDLINE-EBSCO, Science Direct. Artigos publicados no período de 2010 a 2016 foram incluídos. Foram utilizados os seguintes descritores, extraídos do MeSH (*Medical Subject Headings*), em combinação: *Benzodiazepines AND Toxicology*. Foram incluídos excluídos os estudos que não envolviam o manejo ao paciente intoxicado por benzodiazepínico na urgência/emergência. As pesquisas incluídas nesta revisão relataram medidas de resultados sensíveis a fim de estabelecer os benefícios da intervenção.

Mediante a busca eletrônica foram identificados 599 estudos potenciais, eliminando-se após os estudos duplicados. Destes, 568 foram excluídos com base no título e no resumo, procedendo-se a leitura completa dos 31 estudos restantes. Baseando-se nos critérios de elegibilidade (apresentação de método (s) de tratamento (s) na intoxicação aguda por benzodiazepínico). Assim, 24 estudos foram excluídos. Com isso, restaram, sete estudos na revisão. Devido à relevância científica também foram



incluídos os resultados apresentados em “Protocolos de manejo do paciente intoxicado” (Peña; Zuluaga, 2012).

## 2.1 Análise dos Dados

Foi realizada a leitura analítica com a finalidade de obter as respostas objetivadas. A análise dos artigos permitiu a extração e o registro das informações em instrumento específico: autores, ano, método, resultados (análise de antes e após a intervenção). Em sequência, após a leitura analítica, procedeu-se a discussão mediante o referencial teórico.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os envenenamentos são injúrias de ocorrência mundial, se constituem, portanto, em problemas de saúde pública (Benson *et al.*, 2013). São situações que, dependendo da circunstância, são de difícil manejo. Quando se deve suspeitar de uma intoxicação? O quadro clínico se inicia subitamente; existem antecedentes do uso de polifarmácia, tentativa de suicídio, exposição ocupacional, transtornos psiquiátricos; no exame físico, há odor diferente, miose punctiformes, queimaduras em pele e mucosas, e ainda história clínica que não tem relação com o exame físico. Com o objetivo de estabilizar o paciente, se deve proceder o ABCD (*Airway* – via aérea, *Breathe* – ventilação, *Circulation* – controle circulatório/déficit neurológico e *Decontamination* – descontaminação) (Santamaría; Peña, 2012).

No procedimento de descontaminação, as terapias como indução da emese, lavagem gástrica, catárticos e carvão ativado têm sido usadas há décadas para descontaminação do trato gastrointestinal de pacientes com exposição aguda a altas doses de medicamentos.

A lavagem gástrica pode trazer complicações, como alterações eletrolíticas, perfuração esofágica, pneumonia por aspiração e arritmias. Nesse sentido, não deve ser realizado rotineiramente em sua totalidade. Na situação rara onde a lavagem gástrica pode parecer adequada, os médicos devem considerar o tratamento com carvão ativado ou observação e cuidados de suporte, em lugar da lavagem gástrica (Benson *et al.*, 2013).

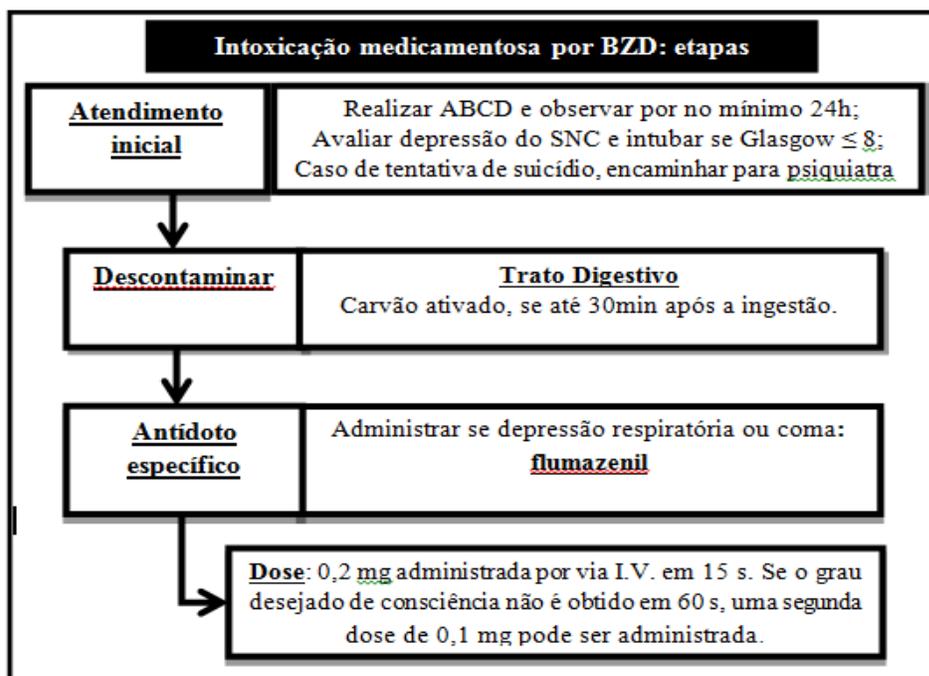
Em uma atualização recente, estudos clínicos confirmam que não existem benefícios sobre o uso de xarope de ipeca como emético para tratamento de intoxicações agudas. O uso em residências e serviços de saúde deve ser definitivamente evitado (Höjer *et al.*, 2013).

A administração de carvão ativado em dose única pode ser considerada quando da ingestão de doses potencialmente tóxicas e de substâncias comprovadamente adsorvidas pelo carvão ativado, levando em consideração que a efetividade diminui com o tempo e que não deve ser administrado rotineiramente para pacientes intoxicados. Sua administração deverá se dar para pacientes cooperativos, em que a indicação pode melhorar resultados intermediários (tal como reduzir o tempo de internação) ou em intoxicações graves por benzodiazepínicos (pacientes com arritmias ou insuficiência de múltiplos órgãos, por exemplo). Uma vez que a relação risco-benefício não está bem estabelecida, o carvão ativado em dose única somente deve ser utilizado com as vias aéreas intactas; caso haja depressão neurológica ou respiratória, as vias aéreas devem ser protegidas antes da administração do carvão ativado. A complicação mais grave de *overdose* é a pneumonia por

aspiração. Há relatos de casos graves de pneumonia por aspiração em associação com a administração de carvão ativado ou confirmação de carvão ativado nos pulmões (Isbister; Kumar, 2011).

Os casos de intoxicações por benzodiazepínicos podem ser clinicamente abordados somente com tratamento de suporte (manutenção de via aérea pérvia e ventilação, se necessário). Porém, alguns quadros requerem a administração do antagonista específico flumazenil. A ausência desse e dos demais antídotos ou medicamentos para as intoxicações nas unidades de emergência e serviços de referência, representa importante fator limitante ao restabelecimento dos pacientes (Smith, 2010). Grande número dos produtos requer importação ou é comercializado em apresentações impróprias à terapia. Nesse cerne, temos que a qualidade da assistência aos pacientes intoxicados no país está comprometida (Galvão *et al.*, 2013).

Quadro 01. Algoritmo do atendimento a pacientes com quadro de intoxicação.



Fonte: Berrouet; Zuluaga, 2012 (adaptado)

O flumazenil é um antagonista específico dos benzodiazepínicos, que atua por inibição competitiva na ligação desses fármacos ao complexo GABA, invertendo os efeitos sedativos dos benzodiazepínicos. Possui um volume de distribuição alto (1L/Kg), baixa união a proteínas (50%) e alta lipossolubilidade, atravessando rapidamente a barreira hematoencefálica e revertendo a sedação induzida (Berrouet; Zuluaga, 2012).

No entanto, devido à sua meia-vida relativamente curta (50 min), comparado com outras benzodiazepinas, a possibilidade de ressedação deve ser considerada após o tratamento com flumazenil. Esse medicamento, entre outros fármacos e antídotos, é apontado como essencial por consensos internacionais disponíveis, que contemplam itens necessários para prestar assistência



farmacêutica em intoxicações (Galvão *et al.*, 2013). O flumazenil só deve ser usado quando a intoxicação por overdose for unicamente por benzodiazepínicos. É contraindicado em pacientes com aumento da pressão intracraniana, com história de epilepsia ou naqueles com exposição a antidepressivos tricíclicos.

Tendo em vista a primeira dose de 0,2 mg, apontada no quadro 01, doses subsequentes de 0,3 mg a 0,5 mg podem ser administradas – após 30s - a intervalos de 60 segundos, se necessário, até a dose total de 3 mg em adultos. Para reversão da sedação consciente induzida por benzodiazepínicos em crianças com mais de 01 ano de idade, a dose inicial recomendada é de 0,01 mg/kg. Se o grau de consciência desejado não for obtido, nova dose de 0,01 mg/kg pode ser administrada e repetida em intervalos de 60 segundos (até no máximo 4 vezes mais) ou até dose total máxima de 1 mg, aquela que for menor. A reversão do coma deve iniciar 01 a 02 min após a administração e persistir de 01 a 05 h dependendo do agente benzodiazepínico e da dose (Berrouet; Zuluaga, 2012).

#### 4. CONCLUSÃO

Os medicamentos têm se destacado como os principais agentes causais de intoxicações no Brasil, principalmente os benzodiazepínicos. A caracterização do risco de intoxicação por estes fármacos envolve a predição da frequência e da severidade dos efeitos. O manejo da intoxicação aguda por psicotrópicos deve constar, basicamente, de três etapas: atendimento inicial, com a avaliação das funções vitais e intensidade da depressão neurológica para medidas de estabilização do paciente; descontaminação, quando se avalia a viabilidade de oxigenoterapia e uso de carvão ativado e, finalmente, o tratamento específico, com a possibilidade de administração do antídoto, o flumazenil. Diante do exposto, percebe-se que o uso irracional de benzodiazepínicos pode gerar graves problemas, em especial, casos de intoxicações que, apesar de não apresentarem alta letalidade, trazem sofrimento ao paciente e oneram o sistema de assistência em saúde no Brasil. Desta forma, conclui-se que medidas preventivas e de controle são necessárias e urgentes, tanto no que concerne à prescrição e venda de medicamentos psicotrópicos quanto em relação às ações de educação em saúde para os nossos jovens, que abordem essa problemática em uma perspectiva interdisciplinar e multiprofissional.

#### 5. REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA, N.D.F; FERNANDES, H.M.B; OLIVEIRA FILHO, A.A. Avaliação das intoxicações no estado da bahia: um estudo epidemiológico. *Biofar, Rev Biol Farm*, Campina Grande, v. 9, n. 1, p.160-166, mar. 2013.
- ARAÚJO, J.D. Polarização epidemiológica no Brasil. *Epidemiol Serv Saúde*, Brasília, v. 21, n. 4, p.533-538, dez. 2012.
- BENSON B.E, et al. Position paper update: gastric lavage for gastrointestinal decontamination. *Clin Toxicol*, New York, v. 51, p.140-146, jan. 2013.
- BERGER, A., et al. Change in healthcare utilization and costs following initiation of benzodiazepine therapy for long-term treatment of generalized anxiety disorder: a retrospective cohort study, *BMC Psychiatry*, London, v.12, n.177, p.1-10, oct. 2012.



- BERNARDES, S.S; TURINI, CA; MATSUO, T. Profile of suicide attempts using intentional overdose with medicines, treated by a poison control center in Paraná State, Brazil. *Cad Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 26, n. 7, p.1366-1372, jul. 2010.
- BERTASSO-BORGES, M. S. et al. Eventos toxicológicos relacionados a medicamentos registrados no CEATOX de São José do Rio Preto, no ano de 2008. *Arq Ciênc Saúde*, São José do Rio Preto, v.17, n.1, p.35-41, jan-mar. 2010.
- BERROUET, M.C; ZULUAGA, A.F. *Intoxicación por benzodicepinas*. In: PEÑA, L.M; ZULUAGA, A.F. (Ed.) Protocolos de manejo del paciente intoxicado. 1ªed. Departamento de Toxicología e Farmacologia. Centro de extensión, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, 2012.
- FERRAZ, J. A. M. B. *Efeito do substituinte "F" nas interações "fármaco- receptor" em benzodiazepinas*. 99f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas). suFaculdade de Ciências da Saúde. Universidade Fernando Pessoa, 2010.
- FUCHS, F. D; WANNMACHER, L. *Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 1282 p.
- GALVÃO, T.F et al. Antídotos e medicamentos utilizados para tratar intoxicações no Brasil: necessidades, disponibilidade e oportunidades. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 29, p.167-177. 2013.
- HÖJER J, et al. Position paper update: ipecac syrup for gastrointestinal decontamination. *Clin Toxicol*, New York, v. 51, p.134-139, jan. 2013.
- ISBISTER, G.K; KUMAR, V.V.P. Indications for single-dose activated charcoal administration in acute overdose. *Curr opin crit Care*, Hagerstown, v.17, p.351-357, 2011.
- KACIROVA, I; GRUNDMANN, M; SILHAN, P; BROZMANOVA, H. A Case Report of Clonazepam Dependence Utilization of Therapeutic Drug Monitoring During Withdrawal Period. *Medicine* 95(9): e2881, 2016.
- KONOPKA, A., et al. Psychosocial characteristics of benzodiazepine addicts compared to not addicted benzodiazepine users. *Prog neuropsychopharmacol biol psychiatr.*, Oxford, v. 40, p. 229–235, jan. 2013.
- LIMA et al. Classificação dos fármacos mais solicitados em um serviço de atendimento farmacêutico. *Revista Ciência & Saúde*, Porto Alegre, v. 1, n. 2, p. 85-92, 2008. .
- MAEDA, S. et al. Effect of Flumazenil on Disturbance of Equilibrium Function Induced by Midazolam. *Anesth Prog*, Bronx, v. 55, n. 3, p.73-77, jul. 2008.
- MAREMMANI, A. G. I, et al. Clonazepam as Agonist Substitution Treatment for Benzodiazepine Dependence: A Case Report, *Case Reports in Psychiatry*, jan. 4p. 2013.
- MORAIS, I.C.O. et al. Perfil epidemiológico das intoxicações medicamentosas registradas pelo Centro de Assistência e Informação Toxicológica de Campina Grande (PB) no período de 2005 a 2007. *Rev Bras Farm*, Rio de Janeiro, v. 89, n. 4, p. 352-357, 2008.
- MOREAU, R.L.M. *Toxicologia Social e Medicamentos: Fármacos e Drogas*. In: OGA, S. (Ed.). Fundamentos de Toxicologia. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.
- RUDOLPH, U; KNOFLACH, F. Beyond classical benzodiazepines: Novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes. *Nat Rev Drug Discov*, London, v. 10, n. 9, p.685-697, jul. 2011.
- SANTAMARÍA, A.; PEÑA, L.M. *Manejo general del paciente intoxicado*. In: PEÑA, L.M;



SINITOX - SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÃO TÓXICO-FARMACOLÓGICA. CENTRO DE INFORMAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ Casos Registrados de Intoxicação Humana, de Intoxicação Animal e de Solicitação de Informação por Região e por Centro. Brasil, 2012. Disponível em: <  
[http://www.fiocruz.br/sinitox\\_novo/media/b1.pdf](http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/media/b1.pdf)>- Acesso em: 04 de outubro 2016.

SMITH, S.W. Drugs and pharmaceuticals: management of intoxication and antidotes. *EXS*, Basel, v.100, p.397-460. 2010.

SOUTO, C.E., et al. Intoxicações medicamentosas em araucária – pr. *Revista Uniandrade*, v. 13, n. 3, p.210-220, 2012.

STAHL, S.M. *Psicofarmacologia: bases neurocientíficas e aplicações práticas*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 710 p.

SUKYS-CLAUDINO, L. et al. Novos sedativos hipnóticos. *Rev Bras Psiquiat*, São Paulo, v. 32, n. 3, p.288-293, set. 2010.

ÁREA DE SUBMISSÃO: TERAPIAS EM SAÚDE – TS 6

## CARCINOMA DUCTAL INVASIVO EM MULHER JOVEM: UM RELATO DE CASO

<sup>1</sup>BARBOSA, B.T., <sup>1</sup>NASCIMENTO, J.C.F., <sup>1</sup>ALBUQUERQUE, J.L.V., <sup>1</sup>QUIRINO, J.L.,  
<sup>1</sup>FERREIRA, S.A., <sup>2</sup>FITTIPALDI, H.M., <sup>3,4</sup>ROCHA, C.R.C., <sup>4,5</sup>RÊGO,  
M.J.B.M.; <sup>1,4</sup>BELTRÃO, E.I.C.

<sup>1</sup>Setor de Patologia, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

<sup>2</sup>Setor de Anatomia Patológica do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP)

<sup>3</sup>Setor de Biologia Molecular, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

<sup>4</sup>Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas (CCB), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

<sup>5</sup>Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT-UFPE)

E-mail para contato: [brunotrajanobarbosa@outlook.com](mailto:brunotrajanobarbosa@outlook.com)

**RESUMO** – *O câncer de mama é considerado raro em mulheres com até 40 anos, sendo nesses casos mais agressivo e resultando em prognóstico reservado. O uso de biomarcadores teciduais para subtipagem molecular do câncer de mama constitui potencial ferramenta diagnóstica, prognóstica e terapêutica. O presente trabalho relata o caso de uma paciente com 33 anos que apresentou carcinoma ductal invasivo de mama (CDI). Com o objetivo de traçar o perfil molecular da lesão, imunohistoquímica foi realizada contra os alvos: Receptor de Estrógeno (RE), Receptor de Progesterona (RP), Ki-67, HER-2 e HIF1 $\alpha$ . A paciente apresentou positividade para todos os marcadores analisados, indicando que apesar do alto grau de malignidade a paciente é uma boa candidata aos tratamentos disponíveis.*

**Palavras chave:** *Carcinoma Ductal Invasivo, HIF1 $\alpha$ , Mulheres Jovens*

**ABSTRACT** – *Breast cancer is rare in women up to 40 years, It is more aggressive in these cases, resulting in a poor prognosis. The use of tissue biomarkers for breast cancer molecular subtyping is potential diagnostic tool, prognostic and therapeutic. This paper reports the case of a patient 33 years old who had breast invasive ductal carcinoma (IDC). In order to trace the lesion's molecular profile, immunohistochemistry was performed against the following targets: estrogen receptor (ER), Progesterone Receptor*

(PR), Ki-67, HER-2 and HIF1 $\alpha$ . The patient was positive for all markers analyzed, indicating that despite the high degree of malignancy, the patient is a good candidate to available treatments.

*Keywords: Invasive Ductal Carcinoma; HIF1 $\alpha$ ; Young Women.*

## 1. INTRODUÇÃO

Na mulher adulta-jovem cerca de 4 a 7% de todos os casos de câncer de mama são diagnosticados em idade inferior a 40 anos (ANDERS et al., 2009; GABRIEL; DOMCHEK, 2010; DESANTIS et al., 2014). Embora raro, o câncer de mama em mulheres jovens (CMMJ) merece destaque, pois neoplasias malignas nestas pacientes tendem a apresentar um fenótipo mais agressivo e com prognóstico reservado em decorrência do menor tempo de sobrevida e maior tendência a bilateralidade quando comparado a pacientes mais velhas (KATAOKA et al., 2016).

Em geral, no momento do diagnóstico as mulheres jovens apresentam tumores em estágio avançado, com tamanho >2cm, tendência a ser pouco diferenciado, maior índice de proliferação e alta frequência de invasão linfática, além de apresentarem maior incidência de receptores hormonais (Receptor de Estrógeno - RE e Receptor de Progesterona -RP) negativos e uma alta expressão do receptor do fator de crescimento epidermal humano tipo 2 (HER-2) (KATAOKA et al.; 2014). Esses alvos são utilizados para subtipagem molecular do câncer de mama e consequente determinação de terapêutica e prognóstico de acordo com o Consenso de Saint Gallen (2013).

Apesar dos biomarcadores de rotina (RE, RP e HER-2) serem bem aceitos e utilizados na clínica, a busca de novos alvos ainda persiste. Neste cenário biomarcadores envolvidos na hipóxia tumoral podem ser promissores no diagnóstico e prognóstico da doença, dentre estes biomarcadores destaca-se o HIF-1 $\alpha$  (Fator induzido por hipóxia) que é descrita como uma proteína produzida constitutivamente e cuja acumulação é estimulada pela quando há uma distância maior do que 180 $\mu$ m entre a célula e o vaso. HIF-1 $\alpha$  está relacionada à progressão tumoral e angiogênese, participando do controle da expressão de uma variedade de genes envolvidos na adaptação à deficiência de oxigênio que levam à sobrevivência celular e inibição da apoptose. Este processo ocorre pela alteração do metabolismo energético destas células, as quais passam a apresentar altas taxas de glicólise anaeróbia, além de induzir a migração celular (POWIS et al., 2004; RYU et al.; 2011, GAO et al.; 2016). em tumor de mama presente em paciente jovem diagnosticada como carcinoma ductal invasivo (CDI) utilizando a técnica de imuno-histoquímica

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### *Amostra e dados clínicos*

Biópsia em parafina do tumor foi obtida do Setor de Anatomia Patológica do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), Recife, PE. Todos os dados relacionados à paciente e relatados nesse trabalho foram obtidos do seu prontuário arquivado no IMIP. O

presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (CAAE 06586612.9.0000.5208 – Parecer No. 140.876 em 07/11/2012).

### **Análise Imuno-histoquímica**

A técnica de imuno-histoquímica foi realizada de acordo o protocolo estabelecido por RÊGO et al (2011), utilizando o anticorpo monoclonal anti-HIF-1 $\alpha$  (clone I-20), na diluição 1:150, obtido da Santa Cruz Biotechnology (CA, USA). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico Nikon Eclipse 50i acoplado a câmera digital Nikon DS-Fi1. Para análise do HIF-1 $\alpha$  foi utilizado o *cut off* descrito por BOS et al. (2005) e VAN DER GROEP et al. (2013) que estabelece a positividade nuclear para  $\geq 10\%$  das células tumorais.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Paciente de 33 anos cuja menarca foi aos 13 anos, não fazia uso de contraceptivos orais, múltipara (quatro filhos e dois abortos) apresentando tumoração na mama direita, retração do mamilo, inchaço nas axilas e lombalgia. Procurou o mastologista, e após a realização de ultrassonografia e core biópsia identificou um tumor de 13x10 cm e linfonodomegalia, sendo diagnosticada com Carcinoma Ductal Invasivo. A análise de imuno-histoquímica foi positiva para RE, RP e HER-2. A paciente foi submetida à cintilografia e ressonância magnética que indicaram a presença de múltiplas lesões ósseas na bacia, coluna vertebral, costela e fêmur, sugerindo metástase óssea. Após avaliação clínica e histopatológica a lesão apresentou estadiamento T4N1M1. Foi indicado quimioterapia neoadjuvante com esquema composto por 4 ciclos de antraciclina e 12 ciclos de taxano. Após a terapia neoadjuvante a paciente foi submetida à mastectomia radical e esvaziamento linfonodal. Em seguida a paciente iniciou o tratamento com docetaxel, carboplatina e 11 ciclos de trastuzumab. Atualmente a paciente encontra-se realizando terapia sistêmica paliativa.

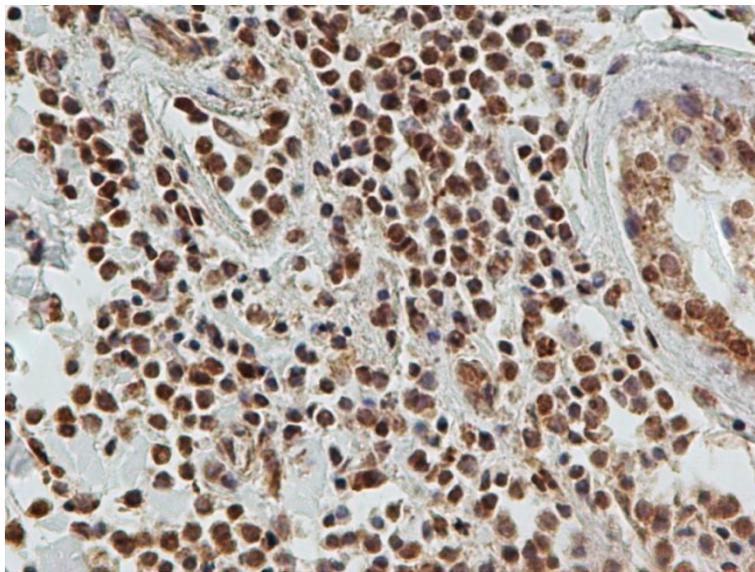
Entre mulheres jovens a maior incidência de câncer mama está na faixa etária de 35-39 anos, correspondendo a 31,6 casos a cada 100.000 habitantes. Quando a idade cai para 30-34 anos, faixa etária onde está inserida a paciente do presente estudo, esse número diminui para 13,3 casos a cada 100.000 habitantes (KIATOKA et al.; 2016). No caso relatado os dados clínico-patológicos citados foram condizentes com as características dos pacientes com CMMJ relatados nos trabalhos de SIDONI *et al* (2003), FREDHOLM *et al* (2009) KIAOKA *et al* (2016), tais como maior probabilidade de apresentar invasão linfonodal e metástase a distância e maior propensão a tumores maiores.

Os achados imuno-histoquímicos revelaram positividade para todos os marcadores analisados, destacando-se a superexpressão do HER-2. A superexpressão do HER-2 está envolvida na proliferação e sobrevivência celular por facilitar a formação de dímeros o que constitui potencial mecanismo para aumentar a transdução de sinal através da fosforilação e desfosforilação de proteínas transmembranas intermediárias e intracelulares (GUTIERREZ e SCHIFF, 2011). Embora o tumor apresente um

fenótipo agressivo, os resultados da subtipagem molecular indicam a possibilidade de manejo utilizando as terapias atualmente disponíveis.

O tumor apresentou positividade para o HIF-1 $\alpha$  (figura 1), proteína comumente encontrada em tumores sólidos humanos e moduladora de muitos aspectos no microambiente tumoral (LIU; SEMENZA; ZHANG, 2015). O microambiente hipóxico desempenha um papel significativo nas células tornando-as mais agressivas, aumentando a progressão tumoral e seu poder de invasão e metástase. Vários estudos mostraram a correlação entre a expressão de HIF-1 $\alpha$  e a presença de invasão linfonodal em tumores maiores que 5 cm. Tal fato é aceitável graças à presença de regiões de hipóxia em tumores grandes devido a distância dos vasos sanguíneos e as células tumorais. Giatromanolaki et al. (2004) também mostraram que a expressão da proteína HER-2 está ligada à expressão da proteína HIF-1 $\alpha$  no câncer de mama, e a agressividade HER-2-relacionada no câncer de mama foi HIF-1 $\alpha$ -dependente. Estes resultados sugerem que a interação entre o HIF-1 $\alpha$  e HER-2 e desempenha um papel importante na progressão do câncer de mama.

A análise de biomarcadores, além do seu valor diagnóstico e prognóstico, possibilita uma melhor compreensão da biologia do tumor influenciando como preditivos de maior sucesso quanto à conduta terapêutica a ser adotada. Desta forma o perfil de HIF-1 $\alpha$  em um caso de CDI em paciente adulta-jovem auxilia na caracterização do tumor.



**Figura 01:** Imuno-histoquímica para o Fator induzido por hipóxia (HIF-1 $\alpha$ ). Sua positividade foi correlacionada com a invasão linfonodal. (Aumento 40x).

#### 4. CONCLUSÃO

Os biomarcadores selecionados para o estudo e validados na rotina clínica (PR, ER, HER-2 e Ki-67) e o perfil de HIF-1 $\alpha$  de um caso de CDI em paciente adulta-jovem auxiliam na caracterização do tumor e possibilitam um melhor entendimento e correlação dos aspectos

clínicos, morfológicos e moleculares do câncer de mama tendo importância terapêutica, epidemiológica e preditiva.

## 5. REFERÊNCIAS

- ANDERS, C. K. et al. Breast cancer before age 40 years. *Seminars in oncology*, v. 36, n. 3, p. 237–249, jun. 2009.
- DESANTIS, C. et al. Breast cancer statistics, 2013. *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 64, n. 1, p. 52–62, 2014.
- FREDHOLM, H. et al. Breast cancer in young women: poor survival despite intensive treatment. *PloS one*, v. 4, n. 11, p. e7695, nov. 2009.
- GABRIEL, C. A.; DOMCHEK, S. M. Breast cancer in young women. *Breast cancer research : BCR*, v. 12, n. 5, p. 212, 2010.
- GUTIERREZ, C., SCHIFF, R. HER2: Biology, Detection, and Clinical Implications. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, v. 135, p. 55-62, 2011
- GAO, T. et al. The mechanism between epithelial mesenchymal transition in breast cancer and hypoxia microenvironment. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 80, p. 393–405, 2016.
- KATAOKA, A. et al. Young adult breast cancer patients have a poor prognosis independent of prognostic clinicopathological factors: a study from the Japanese Breast Cancer Registry. *Breast cancer research and treatment*, v. 160, n. 1, p. 163–172, nov. 2016.
- KATAOKA, A. et al. Clinicopathological features of young patients (<35 years of age) with breast cancer in a Japanese Breast Cancer Society supported study. *Breast cancer (Tokyo, Japan)*, v. 21, n. 6, p. 643–650, nov. 2014.
- RYU, K.; PARK, C.; JOO-LEE, Y. Hypoxia-inducible factor 1 alpha represses the transcription of the estrogenreceptor alpha gene in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, v.407, p.831–836, 2011.
- SIDONI A, CAVALIERE A, BELLEZZA G, SCHEIBEL M, BUCCIARELLI E. Breast cancer in young women: clinicopathological features and biological specificity. *Breast*. 2003;12:247-50
- VAN DER GROEP, P.; VAN DIEST, P.J.; SMOLDERS, Y.H.; AUSEMS, M.G.; VAN DER LUIJT, R.B.; MENKO, F.H.; BART, J.; DE VRIES, E.G.; VAN DER WALL, E. HIF-1 $\alpha$  overexpression in ductal carcinoma in situ of the breast in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Plos One*, v.8, p.1-7, 2013.

## 6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.



**VIGILÂNCIA E  
EPIDEMIOLOGIA EM SAÚDE**



ÁREA DE SUBMISSÃO: VIGILÂNCIA E EPIDEMIOLOGIA EM SAÚDE – VE 2

## TENTATIVAS DE SUICÍDIO POR INTOXICAÇÃO EXÓGENA COM RATICIDAS

R. A. de MELO<sup>1</sup>, F. E. C. V. FERNANDES<sup>2</sup>, I. B. da SILVA<sup>3</sup>, M. L. de M. B. BEZERRA<sup>4</sup>, K. P. RANDAU<sup>5</sup>, e S. L. S. M. de A. BALTAR<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

<sup>5</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

<sup>6</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

E-mail para contato: rosana.melo@upe.br

**RESUMO** – *O estudo objetivou analisar as tentativas de suicídio e letalidade por intoxicação exógena com raticida no Brasil entre 2009 e 2014. Estudo descritivo, analítico de tendência temporal com base nos dados das notificações das intoxicações exógenas disponibilizadas pelo Sistema de Informação de Agravos e Notificação disponíveis no Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde. Buscaram-se as notificações das intoxicações exógenas com tentativa de suicídio com a utilização de raticidas em pessoas com 10 anos ou mais de idade em ambos os sexos. Os dados foram tabulados no Microsoft Office Excel 2013 e tratados pelo programa estatístico Stata 12.0. Lançou-se mão da estatística descritiva, análise de regressão, teste de Kruskal Wallis e coeficiente de correlação de Spearman, ao nível de significância de 5%. Os resultados foram apresentados em tabelas e gráficos. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Pernambuco, sob o parecer 1.801.201. Os raticidas foram agentes tóxicos bastante usados nas tentativas de suicídio no Brasil, perdendo somente para os medicamentos. A região Sudeste foi a que teve maior número de casos de tentativas de suicídio, porém foi nas regiões Norte e Nordeste as maiores taxas por uso de raticidas, sendo os indivíduos na faixa etária de 20 a 39 anos de idade, do sexo feminino, com taxa de letalidade maior no sexo masculino e idosos. Este estudo demonstra a importância do conhecimento sobre as tentativas de suicídio por raticidas na formulação de políticas públicas para medidas de prevenção efetivas e tomadas de decisão.*



*Palavras-chave: Letalidade; Sinan; Toxicologia; Envenenamento; Rodenticidas*

*ABSTRACT – The study aimed to analyze the suicide attempts and lethality by exogenous intoxication with rodenticide in Brazil between 2009 and 2014. A descriptive study, temporal trend of analytical based on data from notifications of exogenous intoxication provided by the Information and Notification System available at the Department of Health System Information. notifications of exogenous intoxication with suicide attempt were sought with the use of rodenticides in people 10 years or older in both sexes. Data were tabulated in Microsoft Office Excel 2013 program and processed by Stata 12.0. Were employed descriptive statistics, regression analysis, Kruskal Wallis test and Spearman correlation coefficient at a significance level of 5%. The results were presented in tables and graphs. The study was approved by the Research Ethics Committee of the University of Pernambuco, in the opinion 1.801.201. Rodenticides were toxic agents widely used in suicide attempts in Brazil, second only to drugs. The Southeast region was the one that had the greatest number of cases of suicide attempts, but was in the North and Northeast regions the highest rates of use of rodenticides, and individuals aged 20-39 years old, female, with higher mortality rate in elderly male and sex. This study demonstrates the importance of knowledge about suicide attempts by rodenticides in the formulation of public policies for effective prevention measures and decision-making.*

*Keywords: Lethality; Sinan; Toxicology; Poisoning; Rodenticides.*

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as taxas de suicídio aumentaram 60% nas últimas décadas, tornando-se a terceira causa de morte entre indivíduos com idade entre 15 e 44 anos (WHO, 2013). No Brasil, cerca de quatro habitantes por 100 mil, em média, suicidam-se, e um número difícil de calcular, tenta suicídio (Minayo, 2010). Embora as taxas de suicídio sejam consideradas baixas quando comparadas às de outros países, entre 1998 e 2008 o total de suicídios no nosso país representou um aumento de 33,5%, enquanto o crescimento da população do país foi de 17,8%, no mesmo período (Waiselfisz, 2011).

No conjunto dos agentes tóxicos, 10.278 casos apresentaram algum tipo de pesticida como gênese de intoxicações: agrotóxicos de uso agrícola (4.798), raticidas (2.576), agrotóxicos de uso doméstico (2.094) e produtos veterinários (810) (Fiocruz, 2010). Dentre os agentes tóxicos, observa-se que os raticidas ocupam o segundo lugar na quantidade de casos por intoxicações por pesticidas, tanto nas intoxicações por acidente, como nas tentativas de autoextermínio (Rebello *et al.*, 2011).

Uma grande variedade de materiais é atualmente usada como raticidas, e por se tratar de substâncias muito usadas no combate dos roedores em ambiente domésticos, apesar de proibido, o risco de acidentes ou mesmo o uso dessas substâncias nas tentativas de suicídios são altos. Os efeitos adversos à saúde humana relacionados ao uso de raticidas dependem do perfil toxicológico do produto, tipo e intensidade da exposição e da susceptibilidade dos indivíduos que



ingerem (Lira *et al.*, 2009).

Diante das lacunas do conhecimento relacionadas à temática e o perfil das intoxicações exógenas nos casos de tentativas e suicídios por raticidas no país, o presente estudo tem por objetivo analisar as tentativas de suicídio e letalidade por intoxicação exógena com raticida no Brasil entre os anos de 2009 a 2014.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado estudo descritivo, analítico de tendência temporal com base nos dados das notificações das intoxicações exógenas disponibilizadas pelo Sistema de Informação de Agravos e Notificação (SINAN) do Ministério da Saúde disponíveis no Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS). A amostra foi composta pelas notificações das intoxicações exógenas cuja circunstância da ocorrência tenha sido a tentativa de suicídio com a utilização de raticidas ocorridas no Brasil no período de 2009 a 2014 em pessoas de 10 anos ou mais de idade em ambos os sexos. Os dados ignorados foram excluídos da amostra.

Inicialmente foi realizada estatística descritiva por meio de distribuição de frequência das notificações no Brasil e regiões. Para a análise da tendência tomou-se o número absoluto de notificações e a taxa de letalidade geral e específica como variável dependente. As variáveis independentes corresponderam aos anos de notificação dos eventos. A evolução das ocorrências no período foi verificada separando-se por sexo e faixa etária (10 a 19 anos, 20 a 39 anos, 40 a 59 anos e 60 anos ou mais). Para a letalidade, calculou-se o número de óbitos por intoxicações exógenas por raticida dividido pelo número de notificações por intoxicações exógenas por raticida, multiplicado por 100.

O teste estatístico utilizado para avaliação da tendência foi a regressão. Considerando-se o sinal do coeficiente e a significância estatística para definição de tendência de crescimento ou estabilização. A avaliação da diferença do número de notificações e da taxa de letalidade entre sexo foi realizada pelo teste de Mann-Whitney, considerando a não normalidade da variável dependente pelo teste Shapiro Wilk ( $p < 0,000$ ). A verificação das ocorrências entre as faixas etárias e ano foi realizada pelo teste Kruskal Wallis. A análise de correlação entre letalidade e faixa etária foi realizada por meio do teste de correlação de Spearman. Para todos os testes estatísticos adotou-se nível de significância de 5% e intervalo de confiança de 95%.

Todos os aspectos éticos foram respeitados. O projeto integra a pesquisa: Óbitos por causas externas em mulheres: tendência e diferenças regionais no Brasil e foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade de Pernambuco sob o número do Parecer: 1.801.201. Os dados foram tratados no Stata 12.0. As tabelas e gráficos foram construídas no Microsoft Office Excel 2013.

## 3. RESULTADOS

Os raticidas representaram o segundo agente tóxico mais utilizado nas tentativas de suicídio no Brasil, ficando atrás apenas dos medicamentos. A região Sudeste apresentou maior proporção nas tentativas de suicídio, seguida da região Sul e Nordeste. No período de 2009 a 2014, 136.487 tentativas foram notificadas. A região Norte apresentou a maior proporção por esse agente seguida da região Nordeste em comparação com as demais regiões do país (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição dos agentes tóxicos utilizados nas tentativas de suicídio segundo Região brasileira em pessoas maiores de 10 anos. Brasil, 2009 – 2014

Agente Tóxico	Norte		Nordeste		Sudeste		Sul		Centro-Oeste		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Medicamento	1.059	40,2	12.019	54,1	51.214	73,2	24.034	76,2	6.240	61,6	94.566	69,3
Raticida	718	27,2	3.983	17,9	9.723	13,9	2.937	9,3	1.696	16,7	19.057	14,0
Agrotóxico agrícola	309	11,7	2.837	12,8	2.600	3,7	1.894	6,0	554	5,5	8.194	6,0
Prod. uso domiciliar	187	7,1	1.243	5,6	1.783	2,5	737	2,3	474	4,7	4.424	3,2
Agrotóxico doméstico	128	4,9	655	3,0	836	1,2	659	2,1	349	3,4	2.627	1,9
Prod. veterinário	76	2,9	476	2,1	901	1,3	353	1,1	310	3,1	2.116	1,6
Prod. químico	59	2,2	386	1,7	732	1,0	284	0,9	189	1,9	1.650	1,2
Outro	56	2,1	279	1,3	903	1,3	273	0,9	123	1,2	1.634	1,2
Drogas de abuso	11	0,4	108	0,5	692	1,0	155	0,5	82	0,8	1.048	0,8
Alimento e bebida	4	0,2	62	0,3	211	0,3	63	0,2	34	0,3	374	0,3
Cosmético	13	0,5	73	0,3	162	0,2	46	0,1	42	0,4	336	0,2
Metal	2	0,1	31	0,1	116	0,2	41	0,1	10	0,1	200	0,1
Agrotóxico saúde pública	10	0,4	32	0,1	61	0,1	29	0,1	14	0,1	146	0,1
Planta tóxica	4	0,2	19	0,1	59	0,1	20	0,1	13	0,1	115	0,1
<b>Total de notificações</b>	<b>2.636</b>	<b>1,9</b>	<b>22.203</b>	<b>16,3</b>	<b>69.993</b>	<b>51,3</b>	<b>31.525</b>	<b>23,1</b>	<b>10.130</b>	<b>7,4</b>	<b>136.487</b>	<b>100</b>

Quando analisadas as tentativas de suicídio por raticidas segundo sexo e faixa etária, observou-se que apenas os adolescentes (10 a 19 anos) não apresentaram tendência de crescimento e as mulheres realizaram mais tentativas que os homens. As demais faixas etárias seguem tendência de aumento em números absolutos ( $p < 0,005$ ). A letalidade e a faixa etária apresentaram-se fortemente correlacionadas, na qual quanto maior a idade, maior a letalidade ( $\rho: 0,8548$ .  $p < 0,0001$ ). A evolução da letalidade das tentativas tanto no sexo masculino quanto no feminino, independente da faixa etária, não apresentou significância estatística quanto ao crescimento. Contudo quando analisados de forma separada por faixa etária em cada sexo, observou-se que nos homens a partir de 20 anos, seguem aumentando e nas mulheres dos 20 aos 59 anos também apresentam mesmo comportamento (Figura 1).

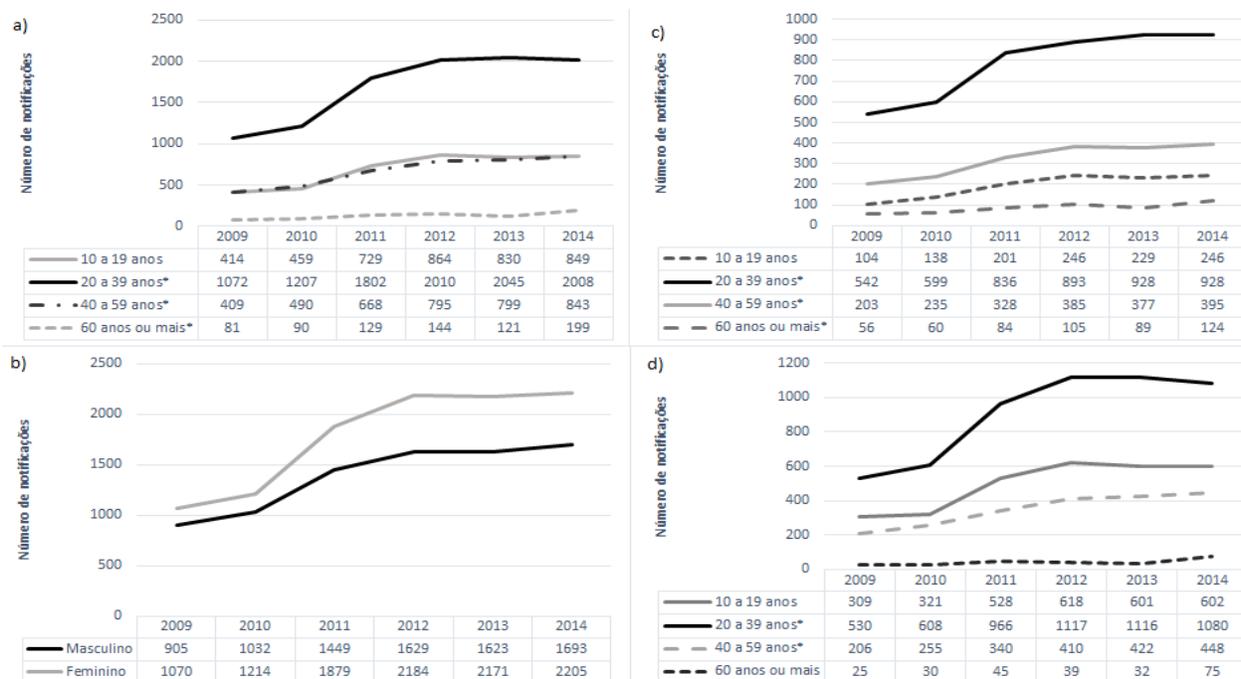


Figura 1 – Tendência das notificações geral segundo faixa etária (a), geral por sexo (b), segundo faixa etária no sexo masculino (c) e segundo faixa etária no sexo feminino (d). \* $p < 0,05$ .

A letalidade é um importante indicador de gravidade de um determinado agravo. No presente estudo, não houve diferença da letalidade média entre os anos estudados, para o país. Contudo, quando analisadas as faixas etárias e sexo, constatou-se maior letalidade nos idosos, em um contexto geral. Para os homens a letalidade foi ainda maior em comparação com as mulheres.

Tabela 2 – Análise da letalidade por intoxicação exógena provocada por ingestão de raticida segundo ano, faixa etária e sexo, Brasil, 2009 a 2014

Letalidade média	Geral			p-valor*	Masculino			p-valor*	Feminino			p-valor*
	Média	IC95%			Média	IC95%			Média	IC95%		
2009	9,2	2,5	15,8	0,946	13,7	2,8	24,5	0,847	3,8	1,0	6,7	0,502
2010	10,7	4,8	16,6		14,6	7,1	22,0		7,7	1,7	13,6	
2011	8,1	3,2	12,9		8,4	2,7	14,1		8,3	2,6	14,1	
2012	10,8	3,9	17,7		11,0	4,1	17,9		14,9	0,7	29,1	
2013	6,4	2,9	10,0		7,8	3,3	12,4		6,2	1,8	10,6	
2014	9,8	2,3	17,2		12,5	2,8	22,3		3,4	1,7	5,1	
Letalidade média	Geral			p-	Masculino			p-	Feminino			p-

Faixa etária (em anos)	valor*			valor*			valor*		
	Média	IC95%		Média	IC95%		Média	IC95%	
10 a 19	2,0	1,5	2,4	2,9	1,8	3,9	2,1	1,5	2,7
20 a 39	2,8	2,3	3,3	3,4	2,8	4,0	2,3	1,9	2,7
40 a 59	5,5	4,9	6,1	7,4	6,4	8,4	4,1	3,0	5,2
60 ou mais	15,5	12,5	18,6	17,9	13,5	22,4	15,1	8,9	21,3

\*Teste de Kruskal Wallis

#### 4. DISCUSSÃO

As ingestões de raticidas nas tentativas de suicídios estão baseadas em diversos fatores alheios aos indivíduos que fazem o uso da substância tóxica, porém, observa-se que existe um perfil característico, considerando a idade, sexo e local de origem, observado em outros estudos (Rodrigues, *et al.*, 2009; Fiocruz, 2010). A notificação e encaminhamento correto dos casos vai depender do reconhecimento e entendimento das situações que envolvem os atos.

De acordo com os dados pesquisados, observou-se que houve crescimento expressivo do número de tentativa de suicídio entre os anos de 2009 e 2014 nas faixas etárias acima de 20 anos por raticidas, à exceção dos homens idosos e dos adolescentes. Esse dado pode estar associado às intensas mudanças da vida nos centros urbanos, ligadas ao estresse, depressão e desesperança, que vem atingindo cada vez mais a população (Dantas *et al.*, 2013). As situações de estresse que mais resultam em tentativas de suicídio ou concretização do ato são o desemprego, a pobreza, perda familiar, relações afetivas malsucedidas e problemas no trabalho (Lima *et al.*, 2008).

Os indivíduos com idade entre 20 a 39 anos são considerados adultos jovens e adultos, que, segundo a literatura, é um período de gozo da aprendizagem, composta de inúmeras situações que levam uma pessoa a agir, a pensar e a decidir de diferentes modos (Portal da Educação, 2014). Dessa forma, a frequência de comportamentos autodestrutivos entre essa parcela da população apresenta-se como um desafio para toda sociedade e para a saúde pública, onde tabus devem ser quebrados, a fim de que se notifiquem as tentativas de autoextermínio, vislumbrando estudos epidemiológicos com finalidades de estabelecer estratégias de prevenção de casos novos e reincidências (Dantas *et al.*, 2013).

Outro achado da pesquisa foi o fato de os casos de tentativas de suicídio por raticidas terem se sobressaído em mulheres. Ressalta-se que suicídio e tentativas de suicídio podem ser compreendidas como fenômenos distintos e ocorrem de forma diferente entre os gêneros, onde as maiores taxas de suicídio se dar entre os homens, que tentam menos frequentemente, mas com métodos mais eficazes, obtendo êxito em maior número de vezes; e as tentativas, entre as mulheres, que tem menos êxito, por utilizarem drogas menos tóxicas (Lira *et al.*, 2009; Rebelo *et al.*, 2011).

Apesar das subnotificações e dificuldades de diagnósticos, observou-se que a região do Brasil com mais casos de tentativa de suicídio foi a região sudeste, seguida das regiões sul e



nordeste, onde esta última foi a segunda região com maior número de casos de intoxicação por raticidas. Esse achado pode estar associado ao fato de a região nordeste ter diversos municípios menores e menos urbanizados, com muitas lavouras de produção agrícola, onde o uso raticida é um dos pesticidas mais usado, e isso facilita o acesso do produtor (Seleghim *et al.*, 2012; Miret *et al.*, 2010; Vieira; Santana; Suchara, 2015).

Ressalta-se que os raticidas são considerados um dos mais potentes agentes tóxicos e o pesticida mais utilizado na gênese das intoxicações (Lira *et al.*, 2009). Já a taxa de letalidade encontrada mostrou que o sexo masculino foi o mais acometido, confirmando que a letalidade do método está diretamente relacionada à preferência do gênero na escolha do método suicida mais potente (Vieira; Santana; Suchara, 2015).

## 5. CONCLUSÕES

O estudo demonstrou que as tentativas de suicídio no Brasil apresentaram elevados números entre as regiões do país e acometimento entre sexo e faixas etárias diferentes, no período de estudo analisado. Nesse contexto, os raticidas foram agentes tóxicos bastante usados nessas tentativas, ficando atrás somente dos medicamentos. A região do país em que mais houve casos foi a região Sudeste, porém foram as regiões Norte e Nordeste os maiores números de tentativas de suicídio por raticidas. O perfil do indivíduo intoxicado foi predominantemente na faixa etária de 20 a 39 anos de idade, do sexo feminino, apesar de a taxa de letalidade ser maior no sexo masculino e em idosos.

O fácil acesso aos agentes tóxicos, como raticidas, favorece o impulso de cometer o suicídio através de sua ingestão, e dessa forma, medidas restritivas de acesso a esses produtos são importantes, o que envolve campanhas de conscientização para o uso dos raticidas somente nas lavouras, maior controle sobre a venda dessas substâncias e programas sociais que promovam a assistência aos indivíduos que tentam suicídio, de forma a identificar e intervir nas situações de risco.

As limitações desta pesquisa estão relacionadas a não avaliação de risco com medidas relativizadas. A análise avaliou os números absolutos das notificações. Outro aspecto pode estar relacionado às subnotificações, considerando que foram utilizados dados agregados e de domínio público.

## 6. REFERÊNCIAS

LIRA SVG, SILVA JG, ABREU RNDC, MOREIRA DP, VIEIRA LJES, FROTA MA. Intoxicações por pesticidas em crianças, adolescentes e jovens no município de Fortaleza (CE). *Cienc Cuid Saude* 2009 Jan/Mar; 8(1):48-55

DANTAS JSS, UCHÔA SL, CAVALCANTE TMC, PENNAFORT VPS, CAETANO JA. Perfil do paciente com intoxicação exógena por “chumbinho” na abordagem inicial em serviço de emergência. *Rev. Eletr. Enf.* [Internet]. 2013 jan/mar;15(1):54-60.



LIMA MA, BEZERRA EP, ANDRADE LM, CAETANO JA, MIRANDA MC. Perfil epidemiológico das vítimas atendidas na emergência com intoxicação por agrotóxicos. *Cienc Cuid Saude*. 2008;7(3):288-94.

RODRIGUES DS, REBOUÇAS DS, TELES MAS, FILHO JNC, GUIMARÃES CRR, SANTANA OAM, TANAJURA GM, RIGO SCC. *Apostila de Toxicologia Básica*. Centro de Informações Antiveneno da Bahia. Secretaria da Saúde do Estado da Bahia (SESAB). Salvador, 2009. [Internet]. [acesso em: 10 oct 2016].

FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX). *Casos registrados de intoxicação humana por agente tóxico e centro, 2010*. [Internet]. [acesso em: 10 oct 2016].

PORTAL DA EDUCAÇÃO. *Fases de vida adulta*. 2014. [Internet]. [acesso em: 10 oct 2016].

REBELO FM, CALDAS AD, HELIODORO VO, REBELO MR. Intoxicação por agrotóxicos no Distrito Federal, Brasil, de 2004 a 2007 – análise da notificação ao Centro de Informação e Assistência Toxicológica. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2011;16(8):3493-502.

SELEGHIM MR, BELLASALMA ACM, MATHIAS TAF, OLIVEIRA MLF. Caracterização das tentativas de suicídio entre idosos. *Cogitare Enferm*. 2012;17(2):277-83.

MIRET M, NUEVO R, MORANT C, SAINZ-CORTÓN E, JIMÉNEZ MA, LÓPEZ JJ. Differences between younger and older adults in the structure of suicidal intent and its correlates. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2010;18(9):839-47.

VIEIRA LP, SANTANA VTP, SUCHARA EA. Caracterização de tentativas de suicídios por substâncias exógenas. *Cad. Saúde Colet.*, 2015, Rio de Janeiro, 23 (2): 118-123

MINAYO MCS. *Conceitos, teorias e tipologias de violência: a violência faz mal à saúde*. In: Njaine K, Assis SG, Constantino P, editoras. *Impactos da violência na saúde*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2010. p. 21-42.

WASELFISZ JJ. *Mapa da violência 2011: os jovens no Brasil*. São Paulo: Instituto Sangari; 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Suicide*. Preventing suicide: a global imperative [Internet]. [acesso em: 15 oct 2016].



ÁREA DE SUBMISSÃO: VIGILÂNCIA E EPIDEMIOLOGIA EM SAÚDE – VE 3

## EPIDEMIOLOGIA DAS TENTATIVAS DE ABORTO CAUSADAS POR AGENTES TÓXICOS EXÓGENOS NO BRASIL

M. L. M. B. BEZERRA<sup>1</sup>, I. B. da SILVA<sup>1</sup>, S. L. S. M. de A. BALTAR<sup>1</sup>, F. E. C.V. FERNANDES<sup>1</sup>, R. A. de MELO<sup>1</sup> e K. P. RANDAU<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Programa Pós-graduação em Inovação Terapêutica.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT).

E-mail para contato: [lusia.bezerra@gmail.com](mailto:lusia.bezerra@gmail.com)

*RESUMO – As intoxicações por agentes exógenos têm sido relacionadas a diversas circunstâncias e o emprego desses agentes com finalidade abortiva requer a atenção das gestantes. Nesse sentido, este trabalho objetivou investigar o perfil epidemiológico das tentativas de aborto provocadas por agentes tóxicos exógenos no Brasil. Foram investigados os casos de tentativa de aborto por agentes tóxicos exógenos notificados no período de 2009 a 2014 pelo Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN). Foram consideradas as mulheres com faixa etária entre 10 a 39 anos. No Brasil foram notificados 623 casos e destes 42,7% foram registrados para a região sudeste e 21,0% para o nordeste. Observou-se a partir de 2010 um aumento do número de notificações de tentativa de aborto ao longo dos anos avaliados. Entre os agentes tóxicos mais utilizados como agentes abortivos, destacaram-se os medicamentos (60,0%), as plantas tóxicas (9,3%) e os raticidas (7,5%). Diante deste contexto é de fundamental importância o investimento em políticas públicas que visem mitigar a ocorrência dos agravos à saúde materno-infantil por tentativas de aborto.*

*Palavras-chaves: Gravidez, Emenagogo, Intoxicação.*

*ABSTRACT - Poisoning by exogenous agents have been linked to different circumstances and the use of these agents with abortive purpose requires the attention of pregnant women. This study aimed to investigate the epidemiological profile of abortion attempts caused by exogenous toxic agents in Brazil. Cases of abortion attempt were investigated by exogenous toxic agents reported in the period 2009 to 2014 by the Notifiable Diseases Information System (SINAN). Women aged were considered from 10 to 39 years. In Brazil it was reported 623 cases and of these 42.7% were recorded for the Southeast and 21.0% to the northeast. It was observed from 2010 an increase in the number of notifications of attempted abortion over the years evaluated. Among the most toxic agents used as abortifacient agents, stood out medicines (60.0%), toxic plants (9.3%) and rodenticides (7.5%). Given this context is*



*crucial investment in public policies to mitigate the occurrence of harm to maternal and child health by abortion attempts.*

*Keywords: Pregnancy, Emenagogue, Intoxication.*

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil, segundo Loureira e Vieira (2004), apresenta uma estimativa anual de 730 a 940 mil casos de abortos. Essa prática eleva os riscos de morte dessas mulheres, além de favorecer o desenvolvimento de sequelas físicas e/ou psicológicas permanentes. Organização Mundial de Saúde (OMS, 1994) define de aborto como a interrupção da gravidez pela morte do embrião ou feto, que acontece até a 22ª semana de desenvolvimento ou até o feto atingir 500 gramas. A prática pode ser ocasionada por fatores endógenos e exógenos. Barros e Albuquerque (2005) destacam em seu trabalho que a água inglesa, o “coquetel” (associação em doses elevadas de hormônios sexuais sintéticos), misoprostol e chás são as substâncias mais empregadas nas tentativas de aborto por adolescentes no nordeste brasileiro.

É considerado agente tóxico toda substância química capaz de causar dano a um sistema biológico, alterando uma função ou levando-o à morte sob certas condições de exposição. Os usuários de plantas medicinais acreditam que é um método seguro, barato e eficaz, desconsiderando dessa forma, a toxicidade de alguns compostos químicos presentes nos vegetais, bem como o potencial patológico e as possíveis interações entre compostos naturais e os sintéticos (Junior; Pinto; Maciel, 2005). Neste sentido, considera-se planta tóxica, todo vegetal que em contato com o organismo humano ou animal e em condições naturais, é capaz de causar algum dano à saúde (Barbosa *et al.*, 2007).

Segundo Clarke, Rates e Bridi (2007) gestantes e puérperas acreditam que o uso de plantas medicinais não causam danos ao feto ou ao bebê. No entanto, Moreira e colaboradores (2001) destacam que as tentativas de aborto por mulheres do Nordeste acontecem principalmente através do uso de chás e infusões de plantas medicinais, ou com o fármaco misoprostol. Diante deste contexto a temática “abortamento” precisa ser tratada com mais atenção, por ser um problema de Saúde Pública, que carece de políticas públicas inclusivas que garantam tratamento holístico para as mulheres que praticaram. Considerando o quadro clínico e epidemiológico das mulheres que realizam aborto no Brasil e a escassez de estudos que relacione agentes tóxicos utilizados na prática, este trabalho objetivou investigar o perfil epidemiológico das tentativas de aborto provocadas por agentes tóxicos exógenos no Brasil.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo epidemiológico descritivo, cujos dados foram obtidos por meio de consulta à base de dados do Sistema de Informações de Agravos de Notificação – SINAN, disponível no Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde – DATASUS (<http://datasus.saude.gov.br/>), com acesso no período de 04 a 22 de outubro de 2016. Foram investigados os casos de tentativa de aborto por agentes tóxicos exógenos notificados no período de 2009 a 2014. As variáveis analisadas foram: número de notificações, região de notificação, ano da ocorrência, tipo de agente tóxico e faixa etária das mulheres adolescentes e adultas (10-14; 15-

19 e 20-39 anos). A organização dos dados, exposição gráfica e análise descritiva (frequência, média, desvio padrão) foram conduzidas no programa Microsoft Office Excel 2007.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Brasil foram notificados 623 casos de tentativa de aborto por agentes exógenos no período de 2009 a 2014. A região sudeste registrou 42,7% (266) dos casos, seguindo pelo nordeste, Sul, Centro – Oeste e Norte que detiveram 21,0% (131), 19,4% (121), 11,4% (71) e 5,5% (34) dos casos, respectivamente, como observado na Figura 1.

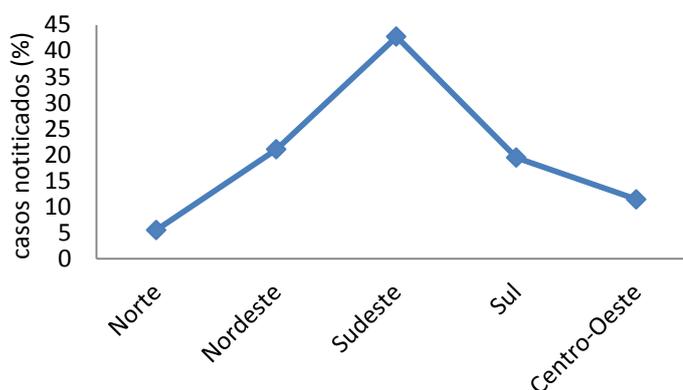


Figura 1 - Distribuição do percentual de casos notificados de tentativa de aborto por intoxicação exógena nas regiões brasileiras, no período de 2009 a 2014\*.

\*Dados de 2013 e 2014 atualizados em 02/10/2015, sujeitos à revisão.

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN.

Observou-se que a partir de 2010 em todas as regiões brasileiras houve aumento do número de notificações de tentativa de aborto ao longo dos anos avaliados. Quando comparadas as médias de casos notificados por unidade federativa houve diferença significativa ( $p < 0,0001$ ) entre a média do sudeste ( $44,33 \pm 15,12$ ) em relação ao nordeste ( $21,83 \pm 5,74$ ), Sul ( $20,17 \pm 5,23$ ), Centro-oeste ( $11,83 \pm 5,42$ ) e Norte ( $5,67 \pm 3,011$ ). Também houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparadas as regiões Sul e Nordeste com a região Norte.

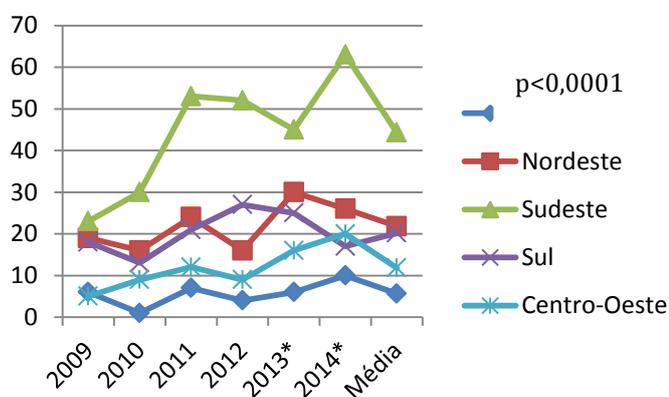


Figura 3 - Casos de tentativa de aborto por intoxicação exógena, notificados entre 2009 e 2014,

considerando região de notificação e o ano do(s) primeiro(s) Sintoma(s).

\*Dados atualizados em 02/10/2015, sujeitos à revisão.

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN

Considerando as regiões brasileiras, o maior número de casos foi registrado para mulheres com idades entre 20 a 39 anos, seguido pelas faixas etárias adolescentes: 15 a 19 anos e 10 a 14 anos (Figura 2). O elevado registro de indução de aborto entre adolescentes e adultos jovens constitui um agravo preocupante à saúde da mulher. Em estudo conduzido por Barros e Albuquerque (2005) realizado com quarenta adolescentes na faixa etária entre 13 e 21 anos, 25% afirmou ter utilizado alguma substância ou medicamento com finalidade abortiva ou emenagoga.

Apesar da faixa etária adolescente entre 10 e 14 anos não ter apresentado números tão elevados de notificações, a literatura aponta um número elevado de gravidez nessa faixa etária. De acordo com dados do Ministério da Saúde entre 2000 e 2012 a proporção de nascimentos de mães com idades menores que 15 anos representou cerca de 30 mil nascimentos ao ano (Brasil, 2014). Consequentemente, essa situação promove a elevação de casos de aborto para interrupção de gravidez indesejada. Nesse sentido, Vieira *et al.* (2007) destacam a necessidade de maior atenção aos adolescentes entre 10 e 14 anos, uma vez que os programas de prevenção da gravidez e orientação sobre a sexualidade tem alcançado adolescentes entre 15 e 19 anos.

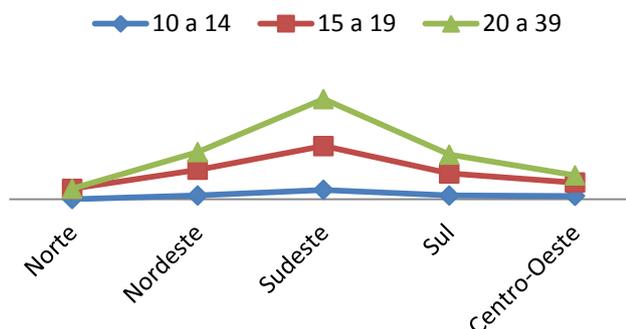


Figura 2 - Casos notificados de tentativa de aborto por intoxicação exógena considerando a região de notificação e a faixa etária das mulheres, no período de 2009 a 2014\*.

\*Dados de 2013 e 2014 atualizados em 02/10/2015, sujeitos à revisão.

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN

Dentre os agentes tóxicos exógenos utilizados pelas mulheres com finalidade abortiva destacaram-se os medicamentos (60,0%), as plantas tóxicas (9,3%) e os raticidas (7,5%), como pode ser observado na Tabela 1. Os medicamentos têm sido apontados pela literatura como causa principal de intoxicação no Brasil, independente da circunstância (Barros; Albuquerque, 2005; Teles *et al.*, 2013). Em situações de tentativa de aborto o uso do fármaco misoprostol sozinho ou associado com mifepristona ou com metotrexato foi referido por Roehsig *et al.* (2011). Estes autores também destacam as plantas como recurso muito utilizado para provocar o aborto.

Segundo Barros e Albuquerque (2005), em estudo conduzido em unidade de saúde, adolescentes utilizam medicamentos ou chás para induzir o aborto. Contudo, os autores chamam a atenção para o fato de que esses métodos podem não ser suficientes para causar o aborto, mas ocasionar danos ao feto (prematuridade, defeitos congênitos, baixo peso ao

nascer), ou de fato provocar o aborto e culminar com graves complicações e até o óbito materno.

Tabela 1 – Distribuição absoluta e percentual dos agentes tóxicos utilizados para tentativa de aborto, critérios de confirmação e evolução dos casos notificados no Brasil e regiões, no período de 2009 a 2014\*.

Variáveis	Regiões					Brasil
	Norte n (%)	Nordeste n (%)	Sudeste n (%)	Sul n (%)	Centro- Oeste n (%)	
<b>Agente Tóxico</b>						
Medicamento	14 (41,2)	66 (50,4)	165 (62,0)	89 (73,6)	39 (55,0)	373 (60,0)
Planta tóxica	07 (20,7)	19 (14,5)	22 (8,3)	-	10 (14,1)	58 (9,3)
Raticida	05 (14,7)	09 (6,9)	16 (6,0)	10 (8,3)	07 (9,9)	47 (7,5)
Prod. uso domiciliar	01 (2,9)	07 (5,3)	07 (2,6)	08 (6,6)	05 (7,0)	28 (4,5)
Agrotóxicos**	03 (8,8)	08 (6,1)	03 (1,1)	04 (3,3)	01 (1,4)	19 (3,0)
Drogas de abuso	-	02 (1,5)	14 (5,3)	01 (0,8)	-	17 (2,7)
Outros***	01 (2,9)	11 (8,4)	20 (7,5)	03 (2,5)	04 (5,6)	39 (6,3)
Ign****/Branco	03 (8,8)	09 (6,9)	19 (7,1)	06 (4,9)	05 (7,0)	42 (6,7)
<b>Critério Confirmação</b>						
Clínico-Laboratorial	-	02 (1,5)	08 (3,0)	04 (3,3)	03 (4,2)	17 (2,7)
Clínico-epidemiológico	17 (50,0)	41 (31,3)	61 (22,9)	45 (37,2)	20 (28,2)	184 (29,5)
Clínico	16 (47,1)	69 (52,7)	173 (65,1)	66 (54,6)	44 (62,0)	368 (59,1)
Ign/Branco	01 (2,9)	19 (14,5)	24 (9,0)	06 (4,9)	04 (5,6)	54 (8,7)
<b>Evolução</b>						
Cura sem sequela	27 (79,4)	97 (74,0)	201 (75,6)	112 (92,6)	54 (76,1)	491 (78,8)
Cura com sequela	-	-	06 (2,3)	01 (0,8)	02 (2,8)	09 (1,4)
Óbito por intoxicação Exógena	01 (2,9)	03 (2,3)	-	-	01 (1,4)	05 (0,8)
Perda de Seguimento	02 (5,9)	01 (0,8)	07 (2,6)	03 (2,5)	03 (4,2)	16 (2,6)
Ign/Branco	04 (11,8)	30 (22,9)	52 (19,5)	05 (4,1)	11 (15,5)	102 (16,4)
Total	34 (100,0)	131 (100,0)	266 (100,0)	121 (100,0)	71 (100,0)	623 (100,0)

\*Dados de 2013 e 2014 atualizados em 02/10/2015, sujeitos à revisão; \*\* domiciliar

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN.

Na tabela 1 é possível observar que os produtos de uso domiciliar, os agrotóxicos e as drogas de abuso apresentaram representatividade de 4,5%, 3,0% e 2,7%, respectivamente. Apesar da baixa frequência de notificação, são situações que também merecem destaque. Malaspina *et al.* (2011) ao traçar o perfil epidemiológico das intoxicações por agrotóxicos no Brasil com base no SINAN, identificaram 18 casos de tentativa de aborto entre adolescentes (10-19 anos) e 40 casos envolvendo mulheres adultas (20-49 anos).

A maioria dos casos de intoxicação foi confirmada através do critério clínico (59,1%) e clínico-epidemiológico (29,5). Em apenas (2,7%) utilizou-se o critério clínico-laboratorial. Verificou-se ainda que 78,8% dos casos evoluíram para cura sem sequela. Mas destaca-se que apesar do percentual de óbito abaixo de 3%, esse dado demonstra a gravidade do uso dos agentes abortíferos.

As plantas tóxicas constituíram o segundo agente tóxico mais utilizado para provocar aborto. Segundo Wolff, Martinhago e Ueno (2009), no primeiro trimestre da gestação, o consumo excessivo de algumas ervas pode levar à defeitos na numeração dos cromossomos, o que colabora com falhas de implantação e a morte fetal. No entanto, Clarke, Rates e Bridi (2007) enfatizam que mesmo diante do caráter tóxico de algumas espécies vegetais, existe resistência de algumas pessoas em acreditar nos possíveis danos causados com o uso em longo prazo.

A literatura evidencia que inúmeras plantas tóxicas têm propriedades emenagoga e abortiva. A tabela 2 apresenta o nome científico de algumas das plantas medicinais tóxicas utilizadas para tentativa de aborto no Brasil e informações adicionais.

Tabela 2 - Plantas medicinais tóxicas utilizadas para tentativa de aborto no Brasil.

Plantas mais usadas para provocar aborto			
Nome científico	Nome popular	Princípio ativo	Referência
<i>Ruta graveolens</i> L.	Arruda	<i>Furanocoumarinas</i> (bergapteno, psoraleno)	Gonzales <i>et al.</i> (2006)
<i>Punica granatum</i> L.	Romã	Alcaloide	Vidal <i>et al.</i> (2003)
<i>Aloe ferox</i> Miller.	Aloe	Antraquinonas	Fernandez <i>et al.</i> (2012)
<i>Luffa operculata</i> Cogn.	Buchinha do norte Cabacinha	Cucurbitacinas	Mengue; Mentz; Shenkel (2001)
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Gengibre	Gingerol óleo essencial	Conover (2003)
<i>Phyllanthus niruri</i> L.	Quebra-pedra	Naftoquinonas (antraquinona)	Matos (2002) Sousa <i>et al.</i> (2004)
<i>Acanthospermum hispidum</i> DC.	Carrapichinho	Sesquiterpenóides e fenol	Lemonica e Alvarenga (1994)
<i>Plecthrantus barbatus</i> Andrews	Boldo	Ascaridol (óleo essencial)	Almeida e Lemonica (2000)

Considerando os dados nacionais, o percentual de casos ignorados/ branco referente às variáveis analisadas foi bem expressivo. Quanto às variáveis, tipo de agente tóxico, critério de confirmação do caso e evolução houve descaso no preenchimento do campo no formulário de notificação em 6,7%, 8,7% e 16,4% dos casos, respectivamente (Tabela 2). Esses dados revelam a necessidade de investir em ações que estimulem a completitude dessas informações e consequentemente a melhoria da qualidade das informações epidemiológicas fornecidas pelo SINAN.

Embora o SINAN apresente limitações, devido, sobretudo, à falta de completitude das variáveis presentes na ficha de notificação, associados às subnotificações, ainda assim representa uma ferramenta capaz de gerar informações epidemiológicas importantes para o desenvolvimento de ações preventivas e de controle de agravos de notificação a exemplo das intoxicações exógenas.

#### 4. CONCLUSÃO

Com base no sistema de informação epidemiológica utilizado no presente estudo, os agentes tóxicos mais utilizados no Brasil, no período avaliado, para tentativa de aborto foram os medicamentos, as plantas tóxicas e os raticidas. Diante deste contexto é de fundamental



importância investir em políticas públicas que visem mitigar a ocorrência dos agravos à saúde materno-infantil por tentativas de aborto. Destaca-se ainda a necessidade de melhorias no processo inserção das informações no SINAN, desde a coleta de informações do paciente, preenchimento das fichas de notificação até a inserção no banco de dados.

## 5. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F.C.G.; LEMONICA, I.P. The toxic effects of *Coleus barbatus* B. on the different periods of pregnancy in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v.73, p.53-60, 2000.
- BARBOSA, R.R. *et al.* Plantas tóxicas de interesse pecuário: importância e formas de estudo. *Acta Veterinaria Brasílica*. v.1, p.1-7, 2007.
- BARROS, F. R.; ALBUQUERQUE, I.L. Substâncias e medicamentos abortivos utilizados por adolescentes em unidade secundária de saúde. *RBPS*. v.18, n. 4: 177-184, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação em Saúde. Saúde Brasil 2013: uma análise da situação de saúde e das doenças transmissíveis relacionadas à pobreza. Brasília : Ministério da Saúde, 384 p., 2014.
- CONOVER, E.A. Herbal agents and over-the-counter medications in pregnancy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. v.17, n.2, p.237- 51, 2003.
- CLARKE, J. H. R.; RATES, S. M. K.; BRIDI, R. Um alerta sobre o uso de produtos de origem vegetal na gravidez. *Infarma*, v.19, p. 41-48, 2007.
- FERNÁNDEZ, R.N.D. *et al.* El gel de *Aloe vera*: estructura, composición química, procesamiento, actividad biológica e importancia en la industria farmacéutica y alimentaria. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. v.11, p. 23-43, 2012.
- GONZALES, J.R. *et al.* Efecto embriotóxico y teratogénico de *Ruta chalepensis* L. «ruda», en ratón (*Mus musculus*). *Revista Peruana Biología*, v.13, p.223-5, 2006.
- JUNIOR, V.F.V.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? *Quim. Nova*, v. 28, p. 519-528, 2005.
- LEMONICA, I.P.; ALVARENGA, C.M.D. Abortive and teratogenic effect of *Acanthospermum hispidum* DC and *Cajanus cajan* (L) Millps in pregnant rats. *J Ethnopharmacol*. v. 43, p. 39-44, 1994.
- LOUREIRO, D.C.; VIEIRA, E.M. Aborto: conhecimento e opinião de médicos dos serviços de emergência de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, sobre aspectos éticos e legais. *Cad. Saúde Pública*, v. 20, p. 679-688, 2004.
- MALASPINA, F. G. *et al.* Perfil epidemiológico das intoxicações por agrotóxicos no Brasil, no período de 1995 a 2010. *Cad Saúde Coletiva*, v.19, n.4, p. 425-34, 2011.
- MATOS, F.J.A. Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais “projeto para pequenas comunidades”. Fortaleza: EUFC, 2002. 267p.
- MENGUE, S.S.; MENTZ, L.A.; SHENKEL, E.P. Uso de plantas medicinais na gravidez. *Revista Brasileira Farmacognosia*, v.11, p.21-35, 2001.
- MOREIRA, L. M. A. *et al.* Associação entre o uso de abortifacientes e defeitos congênitos. *RBGO*, v. 23, n. 8, 2001.



OMS. *Clinical Management of abortion complications: a practical guide*. Geneva, 1994.

ROEHSIG, M. *et al.* Abortifacientes: efeitos tóxicos e riscos. *Saúde, Ética & Justiça*. v.16, n.1, p. 1-8, 2011.

TELES, A. dos S. *et al.* Papel dos medicamentos nas intoxicações causadas por agentes químicos em município da Bahia, no período de 2007 a 2010. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.*, v. 34, n.:281-288, 2013.

VIDAL, A. *et al.* Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, v.89, p.295-300, 2003.

VIEIRA, L. M. *et al.* Abortamento na adolescência: um estudo epidemiológico. *Ciência & Saúde Coletiva*, 12 (5): 1201-1208, 2007.

WOLFF, P.; MARTINHAGO, C. D.; UENO, J. Diagnóstico genético pré-implantacional: uma ferramenta importante para a rotina de fertilização in vitro? *Feminina*. 37 (6): 297-303, 2009.

## 6. AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação (PPGIT-UFPE) e ao Sistema de Informações de Agravos de Notificação - SINAN.



ÁREA DE SUBMISSÃO: VIGILÂNCIA E EPIDEMIOLOGIA EM SAÚDE – VE 4

## PERFIL DO PACIENTE USUÁRIO DE TERAPIA RENAL SUBSTITUTIVA E IMPACTO EM SEU ESTILO DE VIDA

R. R. D ALVES<sup>1</sup>, D. B. G do NASCIMENTO<sup>1</sup>, E. R de SOUZA<sup>1,2</sup>, G. T. dos SANTOS<sup>2</sup>, L. F. COSTA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro Universitário Maurício de Nassau, Departamento de Saúde

<sup>2</sup> Universidade Federal do Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Antibióticos  
E-mail para contato: raphaella.d.alves00@gmail.com

**RESUMO** – *As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) vem atingindo cada vez mais pessoas em todo mundo. Dentre essas doenças estão as doenças renais crônicas (DRC). Em virtude do aumento do número de pessoas com problemas renais crônicos, também cresce a quantidade de usuários de terapia renal substitutiva (TRS). O objetivo foi descrever o perfil dos pacientes com doença renal que fazem uso de diálise. Realizou-se uma revisão de literatura considerando artigos a partir de 2010 à 2016. A doença renal se divide em 5 estágios e a partir disso se caracteriza como aguda ou crônica. O diagnóstico da doença na sua fase inicial trás para o paciente mais qualidade de vida e melhor previne a função renal, que ocorrerá com o tratamento adequado para cada situação. Hoje estão dispostos vários tratamentos que podem ser utilizados: tratamento conservador, hemodiálise (HD), diálise peritoneal (DP) ou transplante. Os pacientes em HD e DP apresentam sentimento de depressão e ansiedade. A escolha mais utilizada é a HD, entretanto a DP proporciona ao indivíduo melhor estilo de vida.*

*Palavras-chave: Doença renal. Insuficiência renal crônica. Hemodiálise.*

**ABSTRACT** - *The chronic non-communicable diseases (NTCD) is reaching more and more people around the world. Among these diseases are chronic kidney disease (CKD). Due to the increase in the number of people with chronic kidney problems, also grows the amount of users of renal substitution (RS). The goal was to describe the profile of patients with kidney disease that make use of dialysis. It conducted a literature review considering articles published between 2010 and 2016. Kidney disease is divided into 5 stages that could be characterised as acute or chronic. The diagnosis of the disease in the early stage brings the patient more quality of life and better prevents kidney function, which will occur with appropriate treatment for each situation. Today there are several treatment that can be used: conservative treatment, hemodialysis (HD), peritoneal dialysis (PD) or transplant. The paciente that uses HD and PD deals with anxiety and depression in which*



*can effect your lifestyle.*

*Key-words: Kidney disease. Chronic kidney failure. Hemodialysis.*

## 1. INTRODUÇÃO

Consideradas problema de saúde pública, as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) vem atingindo cada vez mais pessoas em todo o mundo (Bastos *et al*, 2010), sendo responsáveis por cerca de 70% das causas de morte no Brasil no ano de 2013 (Ministério da Saúde, 2014 a). Entre estas doenças podemos destacar as doenças renais, que segundo a Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN) atinge 1 em cada 10 brasileiros (Sesso *et al*, 2012). Doenças como hipertensão e o diabetes mellitus, que também são DCNT, estão relacionadas com o aumento no número de pessoas portadoras de problemas renais que precisam fazer uso de processo dialítico (Cherchiglia *et al*, 2010). Aproximadamente 25% dos indivíduos com diabetes tipo 1, avançam para as doenças renais bem como 5 a 10% dos portadores da diabetes tipo 2 (SBN, 2015 a; Almeida *et al*, 2013).

O mecanismo utilizado para aferir se o indivíduo possui DRC é a filtração glomerular. A taxa de filtração glomerular (TFG) indica um problema renal crônico se apresentar em, um período mínimo de três meses, valores abaixo da normalidade (Bastos, Kirsztajn, 2011). A obtenção desses valores, é realizada a partir da creatinina sérica, considerada um dos mais eficientes e fidedignos biomarcadores para a avaliação da TFG (Spanaus *et al*, 2011). A DRC é dividida em seis estágios de acordo com o grau da função renal. O grau 1 onde o indivíduo apresenta função renal normal, e o grau 6, fase terminal da função renal sendo necessário uso da terapia renal substitutiva (TRS) (Dutra *et al*, 2010).

O sistema renal uma vez danificado não regenera e a função renal passa por um período de adaptação, preservando o paciente sem sintomas. Nesse período cerca de 50% da atividade renal já foi perdida como afirma o Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 2014 b). A evolução da doença acarreta graves danos que vão desde um transplante até a TRS, situação em que os danos além de físicos são psicológicos e ocasionam mudanças drásticas no estilo de vida, desencadeando, muitas vezes, outras doenças como a depressão. Portanto, é de grande importância a percepção dessa doença na sua fase inicial (Ho, 2013; Gonçalves *et al*, 2015; Ponce *et al*, 2011).

Em decorrência do aumento no número de pessoas com problemas renais crônicos o número de doente que faz uso da TRS está em constante crescente sendo, portanto, necessário conhecer mais detalhadamente o perfil desse tipo de paciente e o seu estilo de vida, para que o sistema de saúde possa prestá-lhe melhor assistência e de forma adequada às suas necessidades físicas e psicológicas. Desta feita, o presente estudo tem por objetivo descrever o perfil dos pacientes com doença renal que fazem uso de diálise.

## 2. MATERIAIS E MÉTODO

Realizou-se uma revisão de literatura com pesquisa eletrônica de artigos nas bases de busca: Scientific Electronic Library Online-Scielo (Scielo), Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (Lilacs) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).



Buscou-se também informações no site da Organização Mundial de Saúde (OMS) e da Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN). Utilizou-se palavras-chave associadas ao assunto principal: doença renal, Insuficiência renal, terapia renal substitutiva e hemodiálise. Foram considerados artigos a partir dos anos de 2010 até o ano de 2016, nos idiomas português, inglês e espanhol. A escolha dos artigos iniciou-se pela relação com o tema pesquisado, realizando uma leitura prévia do resumo e seguidamente a leitura completa que permitiu um melhor entendimento e compreensão das ideias expostas para contribuição da pesquisa.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Insuficiência renal e associação com outras doenças** – A insuficiência renal decorre da incapacidade dos rins de filtrar o sangue, além de outras substâncias. Quando isso ocorre, o acúmulo excessivo dessas substâncias pode levar ao desequilíbrio da composição do sangue. A insuficiência renal aguda (IRA) encontra-se mais comumente em pacientes já hospitalizados e refere-se a um súbito declínio da função renal e diminuição da TFG. Com a perda progressiva da função renal tem-se a insuficiência renal crônica (IRC), que está intimamente ligada a doenças como glomerulonefrite, nefropatia diabética, pielonefrite, síndrome nefrótica, litíase renal, Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) e o Diabetes Mellitus (DM), sendo a HAS e DM, considerados precursores ou agravantes para essas doenças (Denner *et al*, 2010; Souza *et al*, 2010).

A TFG mostra-se muito significativa para o diagnóstico da IR visto que é a taxa que uma substância é retirada do plasma por uma unidade de tempo. A IRA e IRC são assim classificadas com o auxílio da TFG de acordo com o nível em que se encontra (Salman *et al*, 2015; Pena *et al*, 2012). Hoje, faz-se de grande importância um diagnóstico precoce aliado a tratamento e encaminhamento, quando necessário, além de medidas de prevenção para a IRC. A atenção deve ser maior com os grupos de risco (idosos, diabéticos, hipertensos e pessoas que tenham histórico familiar da doença) (Bastos, Kirsztajn, 2011). Os exames laboratoriais utilizados no diagnóstico da IRC são: sumário de urina/microalbuminúria, creatinina sérica e TFG, sendo o último considerado o mais sensível para identificar a IRC.

A grande maioria dos médicos da atenção primária solicitam para os pacientes com DM (88.7) e HAS (93.5%) exames para detecção da IRC, a dosagem de creatinina sérica é o primeiro a ser solicitado. O segundo exame mais utilizado é o sumário de urina/microalbuminúria, utilizado como forma de detectar proteína na urina (70%) e por último a TFG que é solicitada por apenas 8.1% dos médicos para portadores de DM e 4.8% dos indivíduos com HAS. Apesar de este ser considerado o mais fidedigno para avaliação do sistema renal (Pena *et al*, 2012). Essa informação pode ser vista na figura 1.

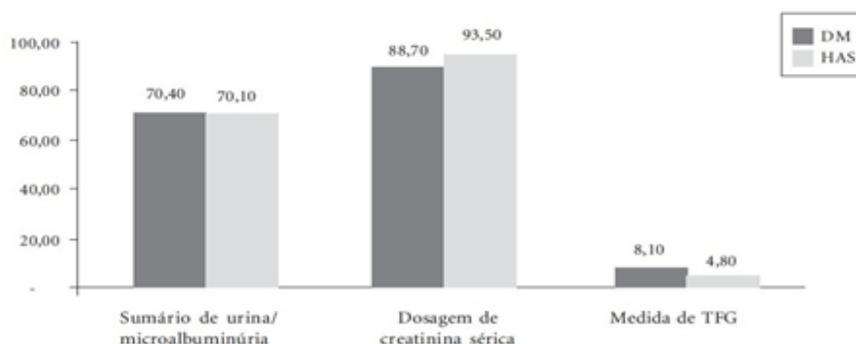


Figura 1 – Relação entre exames solicitados para detecção da IRC.

Fonte: Pena *et al.*, 2012.

De forma ideal, toda a etapa de detecção da doença deveria ocorrer antes de chegar a sua forma crônica. Contudo, ainda há a necessidade da capacitação dos profissionais de saúde para uma melhor detecção da insuficiência renal, principalmente na prevenção em pacientes com DM e HAS (Bastos, Kirsztajn, 2011). A IRC apresenta-se geralmente em indivíduos com idade a partir de 50 anos, do sexo masculino. Onde boa parte não apresenta ensino fundamental completo (Moura *et al.*, 2015).

**Hemodiálise, diálise peritoneal e transplante** – Alguns procedimentos são utilizados como forma de tratamento para doença renal. A hemodiálise ocorre através de uma máquina que executará a função do rim, qual seja eliminar do sangue substâncias prejudiciais para o paciente, e controlar os níveis de potássio, sódio, creatinina, ureia, bem como regular a pressão arterial. O acesso vascular pode ser feito por cateter ou fistula arteriovenosa (SBN, 2016 a). A diálise peritoneal apresenta a mesma finalidade da hemodiálise, porém o processo ocorre dentro do paciente por meio de um filtro (peritônio) que reveste órgãos abdominais. Insere-se um cateter na cavidade peritoneal através de uma pequena cirurgia, e através dele é vertida a solução de diálise que será drenada, após algum tempo, e entrará em contato com o sangue. Já o transplante renal é indicado para pacientes com IRC avançada. A substituição por um rim totalmente saudável faz com que esse seja o método mais completo de substituição da função renal. A escolha para cada um desses tratamentos é feita pela equipe médica de acordo com a necessidade de cada paciente (SBN, 2016 b).

A diálise peritoneal pode ser utilizada como método inicial, mas na maioria dos casos a IR é detectada no seu estágio avançado dando início a TRS de forma emergencial e não de modo programado. Por muitas vezes devido à falta de leitos e profissionais capacitados, torna mais viável o uso da hemodiálise. Uma pesquisa analisou 22 pacientes e observou que apenas 18 iniciaram a TRS pela hemodiálise, os 4 restantes pela diálise peritoneal. A maior parte foi introduzida no tratamento de forma emergencial. A cada 8 pacientes que deram início a TRS de forma programada 4 começaram pela hemodiálise e 4 pela diálise peritoneal (Rocha *et al.*, 2010). Essa diferença pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1 – Relação entre a modalidade de diálise e forma de entrada em terapia renal substitutiva (emergencial x programada)

		Primeiro método dialítico		
		HD	DP	Total
Forma de entrada	Emergencial	14	0	14
	Programada	4	4	8
Total		18	4	22

Legenda: HD – Hemodiálise; DP- diálise peritoneal.

Fonte: Rocha *et al.*, 2010.

**Terapia renal substitutiva e estilo de vida** - Os pacientes ao receberem a notícia da hemodiálise deparam-se com o medo e sofrimento, além do sentimento de “peso” que possam proporcionar em seus familiares, em face às limitações de um doente renal. Procuram utilizar estratégias para conviver com a doença enfrentando o problema focando na emoção, com o apoio da família, apego à religião e crença. Outros focam no problema se adaptando às mudanças, aderindo ao tratamento como forma de amenizar sua condição (Silva *et al.*, 2016; Chaves *et al.*, 2015). Para que ocorra o sucesso da TRS, é importante a aceitação do paciente ao tratamento (Machado *et al.*, 2015).

Em um estudo realizado com 338 pacientes em TRS foi comparado a hemodiálise e a diálise peritoneal com relação ao estilo de vida que cada uma proporciona, sendo 222 pacientes em hemodiálise e 116 em diálise peritoneal. Houve uma média de idade de 58 anos para os que estavam em diálise peritoneal, e 54 anos para os pacientes em hemodiálise, não apresentando muitas divergências com relação ao gênero. Analisando as comorbidades relacionadas com a hemodiálise e a diálise peritoneal destaca-se a hipertensão arterial sistêmica quando observada na hemodiálise (41,9%), e a hipertensão arterial sistêmica associada com diabetes mellitus notado na diálise peritoneal (33,0%). Seguidamente, tem-se a associação da hipertensão arterial sistêmica e diabetes mellitus, na hemodiálise, e a hipertensão arterial sistêmica nos pacientes em diálise peritoneal. (Tabela 3) 5 pacientes não responderam (Gonçalves *et al.*, 2015).

Ao comparar a hemodiálise e a diálise peritoneal aos aspectos relevantes do cotidiano. A diálise peritoneal se destacou em três variáveis enquanto a hemodiálise, em apenas duas. Contudo as duas variáveis apresentadas na hemodiálise (função física e função emocional) têm significância na vida do paciente fora da clínica, enquanto na diálise peritoneal apenas uma (situação trabalho) se mostrou significativa (Gonçalves *et al.*, 2015). Distúrbios do humor como ansiedade e a depressão são partilhados entre pacientes em TRS. Usuários de hemodiálise apresentam maior taxa de depressão, pela restrição do paciente à sua rotina pelo fato de estar ligado ao aparelho durante todo o processo como também pela ausência de atividade física. A diálise peritoneal oferece mais independência e moderação em sua dieta e vida social (Machado *et al.*, 2015; Coutinho, Costa, 2015; Andrade *et al.*, 2015; Cavalcanti *et al.*, 2014 ).



## 4. CONCLUSÃO

No Brasil, o uso das terapias renais substitutivas tem apresentado números cada vez maiores. Nota-se que os pacientes de forma geral apresentam idade a partir de 50 anos, e a intensidade da doença avança com a idade por ser de caráter progressivo. Afeta na maioria dos casos homens e pessoas com baixa escolaridade e apresentam como comorbidades a hipertensão e o diabetes mellitus.

Evidenciou-se que ao comparar os dois tipos de terapia renal substitutiva com o estilo de vida, a diálise peritoneal mostrou que seria mais favorável uma vez que oferece ao paciente mais mobilidade e independência, o que é um obstáculo na hemodiálise. Em contra partida, hemodiálise é mais utilizada, pelo fato da doença ser descoberta em estágios avançados e precisar de tratamento imediato. A depressão e a ansiedade são comuns em paciente em hemodiálise como em diálise peritoneal não apresentando muita diferença entre as duas.

Muitos avanços ocorreram ao longo dos anos, mas a ausência de um programa de prevenção específico para o grupo de risco desfavorece o diagnóstico precoce da doença. Conhecer o perfil desses pacientes, proporciona aos serviços de saúde, melhor forma de cuidar da saúde física e mental do indivíduo de forma integrada.

## 5. REFERÊNCIAS

ALMEIDA M. I. C.; CARDOSO M. S.; GARCIA C. P. C.; OLIVEIRA J. R. F.; GOMES, M. L. F. Perfil dos Pacientes Renais Crônicos de um Hospital Público da Bahia. *Rev. Enfer. Cont.*, v. 2, n. 1, p. 157-168, 2013.

ANDRADE S. V.; SESSO R.; DINIZ D. H. M. P. Desesperança, ideação suicida e depressão em pacientes renais crônicos em tratamento por hemodiálise ou transplante. *J. Bras. Nefrol.*, v. 37, n. 1 p. 55-63, 2015.

BASTOS M. G.; BREGMAN R.; KIRSZTAJN G. M. Doença Renal Crônica: frequente e grave, mas também prevenível e tratável. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v. 56, n. 2, p. 248-253, 2010.

BASTOS M. G.; KIRSZTAJN G. M. Doença renal crônica: importância do diagnóstico precoce, encaminhamento imediato e abordagem interdisciplinar estruturada para melhora do desfecho em pacientes ainda não submetidos à diálise. *J. Bras. Nefrol.*, Vv. 33, n. 1, p. 93-108, 2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. DEPARTAMENTO DE ATENÇÃO ESPECIALIZADA E TEMÁTICA. Diretrizes Clínicas para o Cuidado ao paciente com Doença Renal Crônica – DRC no Sistema Único de Saúde. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE; INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pesquisa nacional de saúde 2013: percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas: Brasil, grandes regiões e unidades da federação. Rio de Janeiro: IBGE, 2014.



CAVALCANTI C. T. A.; ARAÚJO FILHO J. C.; MARINHO P. E. M. Nível de atividade física e sintomas depressivos em pacientes submetidos à hemodiálise: um estudo de corte transversal. *Fisioter Pesq.*, v. 21, n. 2, p. 161-166, 2014.

CHAVES ECL, CARVALHO TP, CARVALHO CC, GRASSELLI CSM, LIMA RS, TERRA FS, et al. Associação entre Bem-Estar Espiritual e Autoestima em Pessoas com Insuficiência Renal Crônica em Hemodiálise. *Psychology/Psicologia Reflexão e Crítica*. 2015;28, n. 4, p. 737-743.

CHERCHIGLIA M. L.; MACHADO E. L.; SZUSTER D. A. C.; ANDRADE E. I. G.; ACÚRCIO F. A.; CAIFFA W. T. Perfil epidemiológico dos pacientes em terapia renal substitutiva no Brasil, 2000-2004. *Rev Saú. Púb.*, v. 44, n. 4, p. 639649, 2010.

COUTINHO M. P. L.; COSTA F. G. Depressão e insuficiência renal crônica: uma análise psicossociológica. *Psic. Soc.*, v. 27, n. 2, p. 449-459, 2015.

DENNER P.; DOUGLAS IS.; ANDERSON R.; Acute kidney injury in the intensive care unit: An update and primer for the intensivist. *Crit Care Med*. 2010; 38, n. 1, p. 261-275.

DUTRA M. C.; ULIANO E. J. M.; MACHADO D. F. G. P.; Martins T.; Schuelter-Trevisol F.; Trevisol D. J. Avaliação da função renal em idosos: um estudo de base populacional. *J. Bras. Nefrol.*, v. 32, n. 1, p. 51-56, 2010.

GONÇALVES F. A.; DALOSSO I. F.; BORBA J. M. C.; BUCANEVE J.; VALERIO N. M. P.; OKAMOTO C. T. Qualidade de vida de pacientes renais crônicos em hemodiálise ou diálise peritoneal: estudo comparativo em um serviço de referência de Curitiba - PR. *J. Bras. Nefrol.* v. 37, n. 4, p. 467-474, 2015.

MACHADO IMJ, BANDEIRA MB, PINHEIRO HS, DUTRA NS. Adaptação transcultural de escalas de aderência ao tratamento em hemodiálise: Renal Adherence Behaviour Questionnaire (RABQ) e Renal Adherence Attitudes Questionnaire (RAAQ). *Cad. Saúde Pública*, v. 31, n. 10, p. 20932098. 2015.

MOURA L.; ANDRADE SSCA.; MALTA DC.; PEREIRA CA.; PASSOS JEF.; Prevalência de autorrelato de diagnóstico médico de doença renal crônica no Brasil: Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. *Rev. Bras. Epidemiol.*, v. 18, n. 2, p. 181-191, 2015.

PENA PFA.; SILVA JÚNIOR AG.; OLIVEIRA PTR.; MOREIRA GAR.; LIBÓRIO AB.; Cuidado ao paciente com doença renal crônica no nível primário: pensando na integralidade e o matriciamento. *Ciência & Saúde Coletiva.*, v. 17 n. 11, p. 3135-314, 2012.

PONCE D.; ZORZENON C. P. F.; SANTOS N. Y.; TEIXEIRA U. A.; BALBI A. L. Injúria renal aguda em unidade de terapia intensiva: Estudo prospectivo sobre a incidência, fatores de risco e mortalidade. *Rev. Bras. Ter. Int.*, v. 23, n. 3, p.321-326, 2011.

ROCHA PN.; SALLENAVE M.; CASQUEIRO V.; CAMPELO NETO B.; PRESÍDIO S. Motivo de “escolha” de diálise peritoneal: exaustão de acesso vascular para hemodiálise? *J Bras Nefrol.* v.



2010;32, n. 1, p. 23-28, 2010.

SÁ HO. Chronic Kidney Disease (CKD) prevention or The urgency of a national policy of screening and early treatment. *Port J Nephrol Hypert.*, v. 27, n. 1, p. 9-12, 2013.

SALMAN M.; KHAN AH.; ADNAN AS.; SULAIMIN SAS.; HUSSAINK.; SHEHZADI.; et al. Attributable causes of chronic kidney disease in adults: a five-year retrospective study in a tertiary-care hospital in the northeast of the Malaysian Peninsula. *Sao Paulo Med J.*, v. 133, n. 6, p. 502-509, 2015.

SESSO R. C.; LOPES A. A.; THOMÉ F. S.; LUGON J. R.; WATANABE Y.; SANTOS D. R. Relatório do censo brasileiro de diálise crônica 2012. *J Bras Nefrol.*, v. 36, n. 1, p. 48-53, 2014.

SILVA R. A. R.; SOUZA V. L.; OLIVEIRA G. J. N.; SILVA B. C. O.; ROCHA C. C. T.; HOLANDA J. R. R. Estratégias de enfrentamento utilizadas por pacientes renais crônicos em tratamento hemodialíticos. *Esc Anna Nery.*, v. 20, n. 1, p. 147154, 2016.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA (SBN). Diabetes mellitus. [acesso em: 2015 nov 18]. Disponível em: <<http://sbn.org.br/publico/doencascomuns/diabetes-mellitus/>>.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA (SBN) Transplante renal. [acesso em: 206 mai 12]. Disponível em: <<http://sbn.org.br/publico/tratamentos/transplante-renal/>>

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA (SBN). Diálise peritoneal. [acesso em: 2016 mai 12]. Disponível em: <<http://sbn.org.br/publico/tratamentos/dialise-peritoneal/>>.

SOUZA M. L.; MALAGUTTI W.; RODRIGUES F. S. M.; BARNABÉ A. S.; FRANCISCO L, SILVA R. N. Incidência de insuficiência renal aguda e crônica como complicações de pacientes internados em uma unidade de terapia intensiva. *ConScientiae Saúde*, v. 9, n. 3, p. 456-461, 2010.

SPANNAUS K. S.; KOLLERLTS B.; HERSBERGER M.; KRONENBERG F.; ECKARDSTELN A. V. Creatinina sérica, cistatina C e proteína  $\beta$ -traço no estadiamento diagnóstico e na predição da progressão da doença renal crônica não diabética. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, v. 47, n. 1, p. 13-23, 2011.

## 6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Centro Universitário Maurício de Nassau e a Universidade Federal de Pernambuco.



ÁREA DE SUBMISSÃO: VIGILÂNCIA E EPIDEMIOLOGIA EM SAÚDE – VE 5

## A VIOLÊNCIA LETAL CONTRA MULHERES: TENDÊNCIA E DIFERENÇAS REGIONAIS NO BRASIL

F. E. C. V. FERNANDES<sup>1</sup>, L. C. A. OLIVEIRA<sup>2</sup>, I. S. LEAL, R. A. MELO<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Economia da Saúde

<sup>2</sup> Universidade de Pernambuco - Campus Petrolina, Graduação em Enfermagem

<sup>3</sup> Enfermeira pela Universidade de Pernambuco

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

E-mail para contato: [flavia.fernandes@upe.br](mailto:flavia.fernandes@upe.br)

*RESUMO – O estudo objetivou avaliar a tendência e diferenças regionais da ocorrência da violência letal contra as mulheres brasileiras no período de 2003 a 2012. Estudo descritivo do tipo ecológico com avaliação de tendência temporal e diferenças regionais, com dados do Sistema de Informação sobre Mortalidade do Sistema Único de Saúde e informações censitárias do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, sendo realizado um recorte do período compreendido entre 2003 e 2012. Stata 12.0. Lançou-se mão da estatística descritiva, análise de regressão, teste de Kruskal Wallis e coeficiente de correlação de Spearman, ao nível de significância de 5%. Os resultados foram apresentados em tabelas e gráfico. A violência letal contra as mulheres segue com tendência crescente no país, apresentando importantes diferenças regionais nos casos de feminicídio, ao longo do tempo. Este estudo nos mostra a necessidade de formulação de políticas públicas que atendam às diversas necessidades existente entre as regiões do país, considerando que a problemática se configura como uma situação preocupante, necessitando da aplicação de medidas eficazes para o seu enfrentamento.*

*Palavras chaves: Violência; Letalidade; Feminicídio; Mulher.*

*ABSTRACT - The study aimed to evaluate the trends and regional differences in the occurrence of lethal violence against Brazilian women from 2003 to 2012. Descriptive study of ecological type with time trend assessment and regional differences, with data from the Mortality Information System Health system and census information from the Brazilian Institute of Geography and Statistics, and made a cut in the period between 2003 and 2012. Stata 12.0. We employed descriptive statistics, regression analysis, Kruskal Wallis test and Spearman correlation coefficient at a significance level of 5%. The results were presented in tables and graphics. Lethal violence against women continues*



*with growing trend in the country, with significant regional differences in the cases of femicide, over time. This study shows the need for public policy formulation to meet the diverse needs existing between regions of the country, considering that the problem is configured as a concern, necessitating the implementation of effective measures for solving them.*

*Key words: Violence; Lethality; femicide; Woman.*

## 1. INTRODUÇÃO

Desde a década de 1980 até o ano de 2013 os números de violência letal contra a mulher têm aumentado, ganhando proporções em escalas até então nunca vistas, com um aumento percentual de 252%. Este cenário, que vem sendo vivenciado ao longo da história em todas as sociedades, deve ser tratado como um problema de saúde pública (Waiselfisz, 2015). Segundo a Organização Mundial de Saúde, a violência pode ser definida como o uso intencional da força física ou do poder, real ou em ameaça, contra si próprio, contra outra pessoa, ou contra um grupo ou uma comunidade, que resulte ou tenha grande possibilidade de resultar em lesão, morte, dano psicológico, deficiência de desenvolvimento ou privação (OMS, 2002).

Os homicídios são registrados como violência, considerado como desfecho de um percurso da vida de muitas pessoas, e em 2012, o Brasil ocupou o sétimo lugar no *ranking* de homicídios entre os 84 países do mundo. (Waiselfisz, 2012; Meneghel, 2013). Algo que assusta, além do grande aumento do número de casos, são as formas de agressões sofridas contra essas mulheres. Menos de 50% dos homicídios são causados por arma de fogo, ao mesmo tempo em que aumenta os números de homicídios por estrangulamento, perfuro-cortante e objetos contundente, inferindo-se o aumento de crimes por motivos fúteis ou fúria (Waiselfisz, 2015).

O feminicídio é um termo de caráter político e legal que faz referência a qualquer expressão ou execução de tratamento distinto de poder entre os gêneros, onde este pode ocorrer na esfera familiar ou domiciliar da vítima, de modo proposital, que venha causar dano ou agravamento do estado de saúde de uma ou de múltiplas mulheres, resultando em óbito, unicamente pela razão de ser mulher. Em março de 2015 foi sancionada a Lei 13.104/2015, que classifica o feminicídio como um crime hediondo que pode ser agravado em determinadas situações em que a mulher se encontra em maior grau de vulnerabilidade, como por exemplo gestante, na presença dos filhos, menor de idade dentre outros (Waiselfisz, 2015).

O feminicídio pode processar-se em circunstâncias distintas, que abrange crimes em série, violência sexual seguida de morte, homicídios cometidos por parceiro íntimo incluindo ou não violência sexual, homicídio de mulher ligado à morte de outra pessoa, entre outros (Carcedo, 2010). Estes crimes têm sido associados a condições de escassez financeira, machismo, condições ilegais como crime organizado e tráfico, e locais com altas taxas de homicídios de homens (Meneghel, Hirakata, 2011). Numericamente, os homicídios encontram-se mais prevalentes em pessoas negras, a maior parte destes ocorre na rua (31,2%), porém, o ambiente doméstico também se destaca como local de alto índice de homicídios (27,1%) e tem como principal agressor o companheiro ou ex-



companheiro (67,2%) (Waiselfisz, 2015).

Ao contrário da violência letal sofrida pelos homens, os homicídios femininos possuem, na maioria dos casos, uma única direção sendo o perpetrador pessoa conhecida da vítima. Essas vítimas estão em maior condição de vulnerabilidade por ser mulher e são assassinadas por manter-se em uma sociedade submissa (Carcedo, 2010).

A magnitude dos episódios de violência doméstica contra a mulher tem imposto cada vez mais a necessidade de estudos e ponderação que fundamentem compreensões deste fenômeno complexo. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a tendência e diferenças regionais da ocorrência da violência letal contra as mulheres brasileiras no período de 2003 a 2012.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

Realizou-se estudo descritivo do tipo ecológico com avaliação de tendência temporal e diferenças regionais. Para os dados de mortalidade, foram utilizadas informações do Sistema de Informação sobre Mortalidade do Sistema Único de Saúde (SIM/SUS) disponibilizados pelo Ministério da Saúde por meio do DATASUS. Os dados populacionais são referentes às informações censitárias do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) também disponibilizados pelo DATASUS.

Realizou-se um recorte de 10 anos com período iniciado em 2003 e finalizado em 2012. Este, é o último ano com informações demográficas disponibilizadas pelo DATASUS. Lançou-se mão da Classificação Internacional de Doenças em sua 10ª revisão (CID-10) para tabulação dos óbitos. Para os CVLI os códigos CID-10 compreenderam do X85 a Y09. Os acidentes de transporte terrestre (ATT) foram classificados do V01 ao V99 e os Suicídios do X60 ao X84.

Procedeu-se ao cálculo da taxa de mortalidade por causa específica incluindo-se no numerador Número de óbitos em mulheres em determinado local e período dividido pela população feminina no mesmo local e período, multiplicado por 100.000 habitantes.

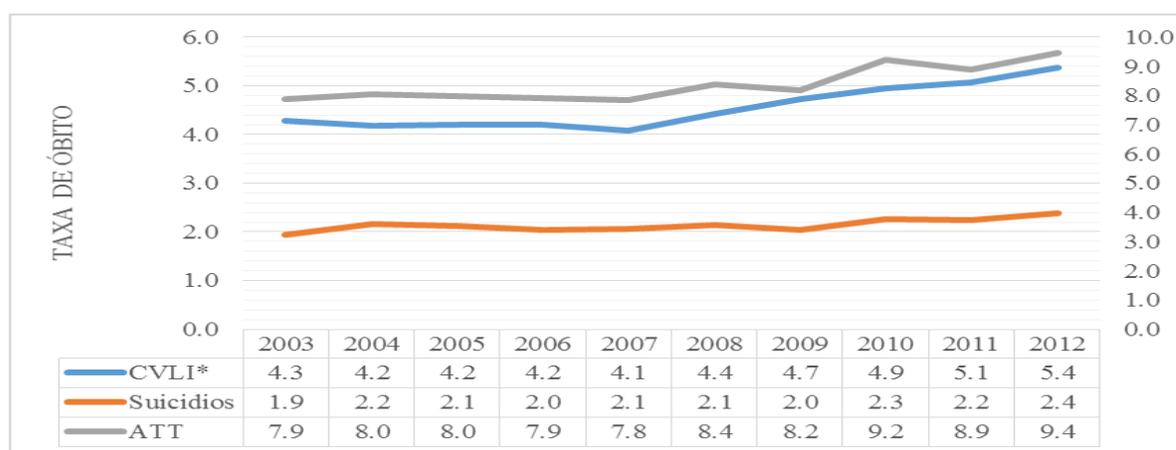
Para a análise estatística, foi aplicado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis para diferença de taxa média entre as regiões, considerando a não normalidade da distribuição segundo o teste Shapiro Wilk ( $p < 0,000$ ). Para análise da tendência da taxa, foi aplicada a análise de regressão com correção de erros robustos considerando tendência de crescimento o escore z positivo e valor de p significativo. Tendência de redução, escore z negativo e valor de p significativo e tendência de estabilização valo de p que não tenha apresentado significante estatisticamente. Para todos os testes foi adotada significância estatística de 5% e intervalo de confiança de 95% assumindo a distribuição de Poisson.

Todos os aspectos éticos foram respeitados. O projeto integra a pesquisa: Óbitos por causas externas em mulheres: tendência e diferenças regionais no Brasil e foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade de Pernambuco sob o número do Parecer: 1.801.211. Os dados

foram tratados no Stata 12.0. As tabelas e gráficos foram construídas no Microsoft Office Excel 2013.

### 3. RESULTADOS

Os crimes violentos, letais e intencionais (CVLI) perpetrados contra mulheres têm aumentado ao longo dos anos. No Brasil, no período de 2003 a 2012, 41.424 mulheres foram assassinadas, sendo o crescimento neste período de 19,9%. Em números absolutos, esses óbitos passaram de 3.937 casos em 2003 para 4.719 em 2012. Quando avaliados os riscos expressos pelas taxas ao longo dos anos, percebeu-se uma tendência de crescimento dos crimes letais, apesar da taxa de ATT ser maior. A análise dos suicídios e acidentes não apresentou significância estatística na análise temporal para o país, podendo ser observado na Figura 1.



\* $p < 0,001$ . Os ATT foram colocados no eixo secundário para melhor comparação e visualização das curvas.

Figura 1 – Tendência das dos óbitos femininos por CVLI, Acidentes de Transporte Terrestre (ATT) e Suicídios. Brasil, 2003 – 2012.

A Tabela 1 aponta as diferenças regionais da taxa média dos crimes no Brasil no período da realização do estudo. Essas taxas são um importante indicador de diferenças da ocorrência da violência contra a mulher nas diversas regiões do país com destaque para a Região Centro-Oeste, com a maior taxa média no período estudado, seguida da Região Norte. As regiões Nordeste e Sudeste foram equivalente, e a região Sul apresentou a menor taxa.

Tabela 1 – Distribuição da taxa média por 100.000 habitantes dos CVLI em mulheres segundo Região brasileira. Brasil. 2003 - 2012

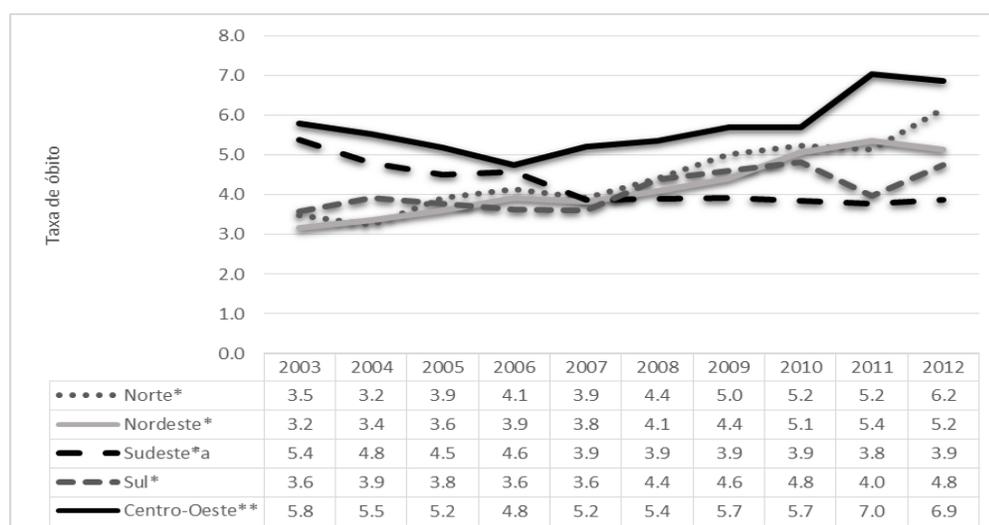
Região	Taxa média	IC95%*	p-valor**
Norte	4,5	3,3 6,0	<0,001

Nordeste	4,2	3,0	5,7
Sudeste	4,2	3,0	5,7
Sul	4,1	2,9	5,6
Centro-Oeste	5,7	4,3	7,4

\*Intervalo de Confiança de 95% assumindo a distribuição de Poisson

\*\*Teste de Kruskal-Walis

A Figura 2 mostra a evolução das taxas de CVLI em mulheres por 100.000 habitantes segundo região de residência da mulher no Brasil, entre 2003 e 2012. Observou-se uma tendência de crescimento nas regiões Norte, Nordeste e Sul ( $p < 0,001$ ). O Sudeste brasileiro apresentou tendência de diminuição dos CVLI ( $p < 0,001$ ). Contudo, apesar da Região Centro-Oeste ter apresentado uma taxa média maior para o período em relação às demais localidades, como apresentado na Tabela 1, a sua taxa não apresentou tendência significativa de aumento ( $p = 0,063$ ).



\* $p < 0,001$ ; <sup>a</sup> Tendência de redução; \*\* O crescimento da taxa não foi significativo ( $p = 0,063$ )

Figura 2 – Tendência da taxa de óbito por CVLI em mulheres segundo Região. Brasil. 2003 – 2012.

## 4. DISCUSSÃO

A morte de mulheres por questões de gênero, denominada de feminicídios, é um fato antigo e encontra-se presente em toda a sociedade. Tem origem de uma cultura enraizada historicamente de dominação masculina e inferiorização da condição de ser mulher. Perpetrada principalmente por pessoas próximas, é precedida de atos de violência até que chegue à sua expressão máxima: o óbito.

Quando analisados os dados do Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM) nos anos de 2003 a 2012, observa-se uma taxa crescente de CVLI. Estes achados corroboram com estudo do



Instituto de Pesquisa Econômica e Aplicada (IPEA), que analisou o impacto da implantação da lei 11.340/2006, conhecida como Lei Maria da Penha, sobre a mortalidade e taxas de agressões contra as mulheres. Constatou-se que não houve redução significativa dos índices de violência, tendo um sutil decréscimo no ano de 2007, logo após a vigência da lei (IPEA, 2016), sendo que esses números voltaram a crescer nos anos subsequentes (Garcia *et al*, 2013). Os dados reforçam a ideia de uma legislação ainda falha e com lacunas que não efetivam a criminalização da violência contra a mulher. A ausência de punição mais severa e demora nos julgamentos geram a sensação de impunidade e não inibem os agressores (Garcia *et al*, 2013).

As taxas de CVLI, apresentaram diferenças entre as regiões do país e a ocorrência de crimes letais contra as mulheres. A região Centro-Oeste se destaca, quando avaliada a taxa média por 100.000 habitantes. Essa região é apontada com a maior taxa média em outros estudos que utilizam o SIM como fonte de dados (IPEA, 2016). Em pesquisa realizada sobre as estimativas corrigidas de feminicídios, com recorte feito entre 2009 a 2011, a região Nordeste aparece com as maiores taxas, seguida da região Centro-oeste (Garcia *et al*, 2015). Quando comparados a índices de homicídios no geral os achados coincidem com resultados encontrados por outros estudiosos, fenômeno em que o Nordeste aparece com os maiores índices (Nóbrega Junior, 2015). As diferenças regionais nas taxas de CVLI contra as mulheres, podem estar relacionadas à aceitação cultural da violência contra a mulher e a sua ocorrência, e também a baixa qualidade nas notificações e cobertura do registro de mortalidade (Garcia *et al*, 2015).

A violência letal contra mulheres apresentou tendência de crescimento em algumas regiões como Norte, Nordeste e Sul, e de redução na região Sudeste. A região Centro-Oeste não apresentou valor significativo em sua tendência. Apesar disto, apresenta-se também aumento na taxa de CVLI. Estes dados reforçam a preocupação com a situação atual e com o futuro, que evidencia um crescimento contínuo dos índices de assassinato de mulheres no país, apesar de ser de forma lenta (Waiselfisz, 2015). Estudo sobre a tendência da mortalidade de mulheres por agressão em países da América Latina, mostrou o Brasil com estimativas de crescimento sutil. O país aparece como um dos países mais violentos, com taxa média de feminicídio acima da média mundial (Molinatti; Acosta, 2015).

Com a obtenção de resultados alarmantes para os crimes letais contra mulheres, conclui-se que a magnitude deste problema ainda foi de altas taxas em todas as regiões brasileiras, apesar da tendência de redução em uma das regiões. Esta é uma situação preocupante, tendo em vista que são situações evitáveis, quando há a aplicação de medidas eficazes para o enfrentamento da violência contra a mulher e dos feminicídios, através de intervenção do Poder Público e medidas protetivas para as mulheres.

## 5. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que a violência letal contra as mulheres segue com tendência crescente no país quando analisado de forma agregada. Contudo, importantes diferenças regionais foram encontradas inclusive com tendências diferentes ao longo do tempo. Este estudo chama a



atenção para a necessidade de formulação de políticas públicas que atendam às diversas necessidades existente entre as regiões do país.

Algumas limitações são apontadas no estudo como a utilização de bancos de dados secundários com dados agregados, o que depende diretamente da alimentação dos Sistemas de Informações, podendo variar de região para região. Possíveis subnotificações ou subregistros podem existir nesse contexto. Novos estudos, com métodos diferentes, são necessários considerando a necessidade de discussão da relevante temática que é a violência contra a mulher.

## 6. REFERÊNCIAS

- CARCEDO, A. *No olvidamos ni aceptamos*. Femicídio em Centro América, 2000-2006. San Jose: CEFEMINA, 2010.
- GARCIA LP; FREITAS LRS; HÖFELMANN, DA. *Avaliação do impacto da Lei Maria da Penha sobre a mortalidade de mulheres por agressões no Brasil, 2001-2011*. Epidemiologia e Serviços de Saúde. 22(3): 383-394. Brasília, 2013.
- GARCIA LP; FREITAS LRS; SILVA GDM; HÖFELMANN, DA. Estimativas corrigidas de feminicídios no Brasil, 2009 a 2011. *Revista Panamericana de Salud Publica*. 2015;37(4/5):251-7.
- IPEA. Instituto de Pesquisa Econômica e Aplicada. *Mortalidade de Mulheres por Agressão no Brasil: Perfil e Estimativas Corrigidas*. Texto para Discussão. Brasília, 2016.
- MENEGHEL, SN; HIRAKATA, V.N. Femicídios: homicídios femininos no Brasil. *Rev. Saúde Publica*, v.45, n.3, p.564-74, 2011.
- MENEGHEL, SN et al. Femicídios: narrativas de crimes de gênero. *Interface (Botucatu)*, Botucatu, v. 17, n. 46, p. 523-533, Set. 2013
- MOLINATTI F; ACOSTA LD. Tendencias de la mortalidad por agresiones en mujeres de países seleccionados de América Latina, 2001-2011. *Revista Panamericana Salud Publica*. 2015;37(4/5):279-86.
- NÓBREGA JÚNIOR JNP. *Diagnóstico da violência no Brasil e os desafios para a segurança pública*. Revista Espaço Acadêmico. N° 107. Rio de Janeiro, 2015.
- OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. *Relatório Mundial sobre Violência e Saúde*. Violência: um problema mundial de saúde pública. Genebra: OMS; 2002.
- WASELFISZ, JJ. *Mapa da violência 2012: a cor dos homicídios no Brasil*. Rio de Janeiro: CEBELA, FLACSO, 2012.
- WASELFISZ, J.J. *Mapa da violência 2015: homicídios de mulheres no Brasil*. Brasília: FLACSO, 2015.



ÁREA DE SUBMISSÃO: VIGILÂNCIA E EPIDEMIOLOGIA EM SAÚDE – VE 6

## PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DOS ACIDENTES OFÍDICOS CAUSADOS POR SERPENTES DO GÊNERO *BOTHTROPS* NA REGIÃO NORDESTE DO BRASIL, 2010-2015: RELAÇÃO ENTRE O TEMPO DO ACIDENTE/ATENDIMENTO E A EVOLUÇÃO CLÍNICA DO CASO NOS ÚLTIMOS CINCO ANOS

A. P. de B. ALBUQUERQUE<sup>1</sup>, D. G. ARAÚJO<sup>2</sup>, K. P. RANDAU<sup>3</sup>, e S. L. S. M. de A. BALTAR<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica,

E-mail para contato: amandabalbuquerque@hotmail.com

*RESUMO-* Com base nos dados notificados pelo SINAN-MS (Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Ministério da Saúde), entre janeiro de 2010 a dezembro de 2015, foi realizado um estudo epidemiológico dos acidentes ofídicos ocorridos na região nordeste do Brasil. Os resultados foram organizados com base no número de acidentes, gênero da serpente, distribuição mensal e anual, faixa etária e sexo dos indivíduos e a relação entre o tempo da picada/atendimento e a evolução clínica e classificação quanto à gravidade. Totalizando 271.145 casos, os acidentes foram causados por espécies pertencentes aos gêneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Micrurus*, *Lachesis* e casos ignorados. Os maiores índices de acidentes foram registrados no gênero *Bothrops* (25.069), onde não foi possível a identificação da espécie. Houve predomínio dos acidentes nos meses janeiro a julho com 17.760 casos (70%), em indivíduos do sexo masculino (70%) e com idades entre 20 a 39 anos. O tempo decorrido entre o acidente e o atendimento prevaleceu entre 1 a 3 horas. Com este tempo de atendimento 62,9% dos casos evoluíram para cura dos pacientes, 31% dos casos tiveram classificação de nível leve, 23% de nível moderado e 2,2 de nível grave. Os resultados obtidos evidenciam a importância dos acidentes botrópicos no âmbito da saúde pública da região nordeste do Brasil e ainda revelam a suma importância do tempo de atendimento para a evolução clínica dos casos.

*Palavras-chave:* Acidente botrópico, Epidemiologia, Saúde Pública.



*ABSTRACT- Based on data reported by SINAN-MS (Notifiable Diseases Information System - Ministry of Health), from January 2010 to December 2015, we conducted an epidemiological study of snakebites occurred in northeastern Brazil. Results were organized based on the accidents number, snake genus, monthly and annual distribution, age and sex of individuals and the relationship between the bite of time/attendance and clinical evolution and severity classification. Totalling 271,145 cases, the accidents were caused by species belonging to Bothrops, Crotalus, Micrurus, Lachesis genus and ignored cases. Highest rates accident were recorded in the Bothrops genus (25 069), where it was not possible to identify the species. Predominance of accidents occurred in the months from January to July with 17,760 cases (70%), in males (70%) and aged 20-39 years. Time between the accident and the service prevailed between 1 to 3 hours. With this service time 62.9% of the cases evolved to cure the patients, 31% of cases had mild level of classification, 23% of moderate and 2.2% severe level. The results show the importance of Bothrops snakebites in the field of public health in northeastern Brazil and also show the great importance of the service time for the clinical course of the disease.*

*Keywords: Bothropic accident, Epidemiology, Public Health.*

## 1. INTRODUÇÃO

Considerado como principal doença tropical negligenciada do século 21, o envenenamento causado por serpentes constitui um problema de saúde pública (GUTIERRÉZ *et al.*, 2006), particularmente em países da América Latina, África e Ásia (Gutiérrez *et al* apud Waldez, 2009). Anualmente, estima-se que ocorram cerca de 5,5 milhões de acidentes causados por serpentes em todo o mundo, resultando em cerca de 421.000 casos de envenenamento e cerca de 20 mil mortes em humanos (Kasturirante *et al.*, 2008; Chippaux, 2010; Warrell, 2010).

No Brasil, as espécies pertencentes ao gênero *Bothrops* apresentam-se distribuídas em todo o território nacional e são responsáveis por cerca de 80% dos acidentes notificados anualmente pelo Ministério da Saúde. Embora a letalidade do acidente botrópico seja baixa, a elevada frequência das sequelas decorrentes das complicações locais o torna um problema de saúde pública para o país (Brasil, 2010). A região nordeste apresenta o menor coeficiente de incidência de acidentes ofídicos do País (6,84/100.000 habitantes), porém registra a maior letalidade (0,81%), cerca do dobro da média nacional (0,45%), como consequência de subnotificações e das dificuldades de acesso aos serviços de saúde (Lira-da-Silva *et al.*, 2009).

No Brasil os dados sobre acidentes ofídicos são coletados através de sistemas de notificação, como: Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN/MS), Sistema de Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX/Fiocruz/MS), Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde/MS e o SIM (Sistema de Informações sobre Mortalidade/MS). Entre os parâmetros avaliados nesses sistemas está a evolução clínica do



paciente e período de tempo entre o acidente e o atendimento. Estudos revelam que o menor tempo entre a picada da serpente e a intervenção médica é condicionante para o salvamento do paciente e minimização das complicações locais (Brasil, 2014; Lemos *et al.*, 2009).

O mecanismo de ação do veneno deste gênero possui atividades proteolítica, coagulante e hemorrágica, causando quadro clínico com manifestações hemorrágicas locais e sistêmicas e apresentando dor e edema evidente que ultrapassa o local da picada como os principais sintomas observados (Melgarejo, 2010). Embora o soro polivalente seja o procedimento terapêutico tradicionalmente utilizado nos casos de envenenamento, sua eficácia está restrita a neutralização das toxinas responsáveis pela indução dos danos sistêmicos, as toxinas que induzem o complexo padrão de danos teciduais locais não são neutralizadas (Rucavado *et al.*, 2000; Farrapo *et al.*, 2011). Isto não se deve a ausência de anticorpos neutralizantes nos soros, mas ao desenvolvimento extremamente rápido dos danos teciduais locais, o que dificulta o acesso dos anticorpos a área antes que ocorra a lesão (Gutiérrez *et al.*, 1998).

Considerando a importância dos estudos epidemiológicos para promoção de melhores condições de atendimento e tratamento aos acidentados, assim como sua provável contribuição para descoberta de terapias alternativas que visem evitar ou mesmo combater as consequências locais do envenenamento (Silva *et al.*, 2016; Tribuiani, 2016), o objetivo do presente estudo é analisar o perfil epidemiológico dos acidentes ofídicos causados por serpentes do gênero *Bothrops* na região Nordeste do Brasil a fim de avaliar a relação entre o tempo do acidente/atendimento e a evolução clínica dos casos ao longo dos últimos cinco anos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Realizou-se uma análise descritiva cuja população do estudo foi constituída pelo universo dos acidentes por animais peçonhentos, registrados no banco de dados anuais do SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) no sítio eletrônico do Departamento de Informática do Ministério da Saúde (DATASUS), sendo considerado como caso todo registro de paciente notificado por acidente por animais peçonhentos, causado por serpentes, referentes ao período 2010 a 2015. Foram excluídos os agravos provocados por outros tipos de animais peçonhentos, como escorpiões e aranhas. Os resultados foram organizados com base no número de acidentes, gênero da serpente, distribuição mensal e anual, faixa etária e sexo dos indivíduos e a relação entre o tempo da picada/atendimento e a evolução clínica e classificação quanto à gravidade na região Nordeste. Com base nesses dados foram calculadas as porcentagens do número e evolução clínica dos acidentes por gênero de serpente, a distribuição mensal e anual, a faixa etária e o sexo do indivíduo e a relação entre o tempo decorrido do acidente/atendimento, a evolução clínica e a classificação quanto à gravidade dos acidentes botrópicos. O programa Microsoft Excel foi utilizado para análise estatística descritiva dos dados.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gênero *Bothrops* compreende mais de 30 espécies com predominância e elevada importância médica em países como Brasil, Colômbia, Equador, Venezuela, Bolívia e Peru (Higuchi et al., 2007). Os dados notificados na região nordeste, nos anos de 2010 a 2015, registraram 271.145 casos de acidentes ofídicos causados por serpentes. Dentre os quais, 25.069 foram causados por espécies do gênero *Bothrops*, 4.214 por espécies do gênero *Crotalus*, 689 por espécies do gênero *Micrurus*, 206 por espécies do gênero *Lachesis* e 3.109 por serpentes não peçonhentas (Figura 1). Os casos ignorados ou não identificados registraram 237.858 (dados não mostrados). Tais resultados estão em acordo com os dados epidemiológicos nacionais onde as serpentes deste gênero são responsáveis pela maioria dos casos de acidentes registrados (Cruz et al., 2009). Acredita-se que tal responsabilidade decorra da sua ampla adaptação em diferentes tipos de ambientes, em diversos ecossistemas e até em regiões alagadas (Moreno et al., 2005).

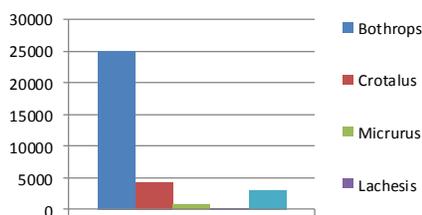


Figura 1- Número de acidentes ofídicos/gênero de serpente notificados na região nordeste do Brasil, 2010 a 2015.

Quando comprada a evolução clínica dos casos notificados por gênero de serpente ao longo dos últimos cinco anos, os acidentes causados por espécies do gênero *Bothrops* lideram o maior número de casos que evoluíram para cura (13%) e óbito (30%) dos pacientes (Figura 2). Juntos estes resultados evidenciam à elevada incidência e letalidade dos acidentes causados por espécies do gênero *Bothrops* e conduziram a investigação do perfil epidemiológico destes na região nordeste do país.

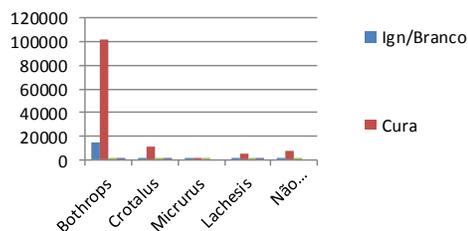


Figura 2- Evolução clínica dos acidentes ofídicos/gênero de serpente na região nordeste do Brasil, 2010 a 2015.

O rápido padrão de danos teciduais locais decorrentes do envenenamento causado por serpentes, na maioria dos casos, promove o desenvolvimento de sequelas físicas permanentes com perdas teciduais e funcionais, além de importantes consequências sociais e psicológicas à pessoa afetada (Gutiérrez; *et al.* 2006; Williams et al., 2010). Ao avaliar o tempo de atendimento das vítimas de acidente botrópico desde o momento da picada até o socorro médico em toda a região nordeste observou-se que 23% dos casos foram atendidos em intervalo de tempo menor que 1 hora, 38% num intervalo de 1 a 3 horas, 16% num intervalo de 3 a 6 horas e cerca de 5% num intervalo de 6 a 24 horas (Figura 3). Estes resultados assemelham-se ao perfil epidemiológico dos acidentes ofídicos registrados no Rio de Janeiro entre os anos de 2001 a 2006 (Machado *et al.*, 2012).

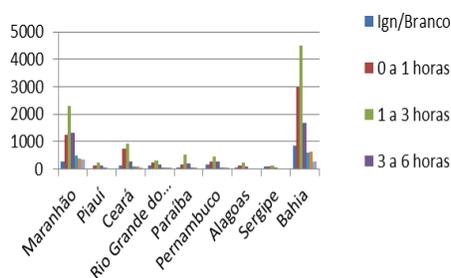


Figura 3- Tempo de atendimento as vitimas de acidente botrópico nos estados da região nordeste do Brasil, 2010 a 2015.

Ao relacionar à evolução clínica dos acidentes botrópicos com o tempo de atendimento observou-se que 62,9% dos casos de cura dos pacientes ocorreram quando o atendimento foi realizado em até 3 horas após o acidente, figura 4. De forma semelhante, ao avaliar a relação entre os dados clínicos quanto à gravidade do acidente e o tempo de atendimento observou-se que 31% dos casos (37.753) diagnosticados como leve, 23% (29.103) dos casos diagnosticados como moderado e 2,2% (2.668) dos casos diagnosticados como grave foram atendidos em até 3 horas após o acidente, figura 5. Tais resultados sugerem que a precocidade no atendimento as vítimas de envenenamento botrópico na região nordeste do Brasil contribui para minimização das sequelas e mortes uma vez que a ausência de sequelas em casos com diagnósticos de classificação leve, moderado e grave está diretamente associada a um tempo de atendimento médico inferior a 6 horas (Pinho *et al.*, 2004).

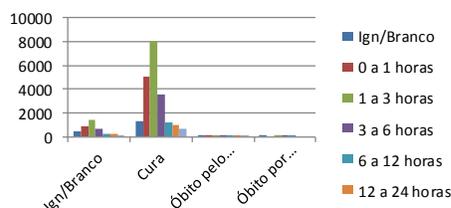


Figura 4- Relação entre a evolução clínica dos acidentes botrópicos e o tempo de atendimento a vítima na região nordeste do Brasil, 2010 a 2015.

A análise do perfil epidemiológico dos acidentes ofídicos no Brasil, baseada nos casos registrados entre 2010 e 2015, revelou que os acidentes ocorrem com maior frequência no início do ano, em pessoas do sexo masculino, principalmente em trabalhadores rurais, na faixa etária de 15 a 49 anos, sobretudo acometem membros inferiores e a maioria desses acidentes foi atribuída ao gênero *Bothrops* (Bochner; Struchiner, 2003). As notificações atuais quanto ao gênero das vítimas revelam um padrão similar onde o maior número de acidentes ocorreu com indivíduos do sexo masculino (77,4%) seguido por indivíduos do sexo feminino (22,5%) (figura 6) e a faixa etária com maior número de casos registrados foi entre 20 a 39 anos, com 8.639 casos (34,4%), figura 7.

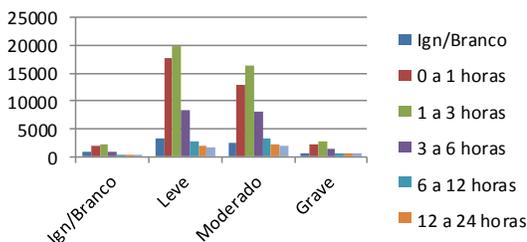


Figura 5- Relação entre a classificação do quadro clínico e o tempo de atendimento as vítimas de acidente botrópico na região nordeste do Brasil, 2010 a 2015.

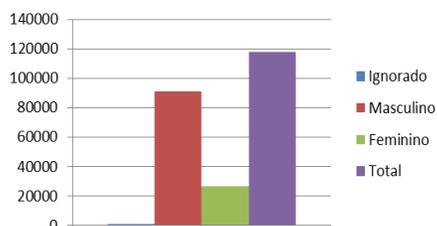


Figura 6- Casos de acidente botrópico quanto ao gênero da vítima na região nordeste do Brasil, 2010 a 2015.

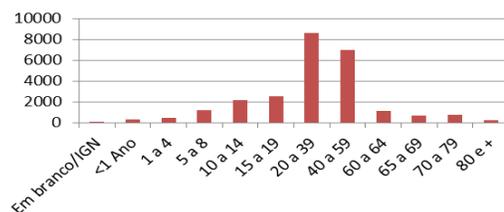


Figura 7- Faixa etária das vítimas de acidente botrópico na região nordeste do Brasil, 2010 a 2015.

Quanto à distribuição sazonal dos acidentes, os meses com maiores incidências foram janeiro a julho, totalizando 17.760 casos (70%). Nos demais meses, agosto a dezembro, foram registrados 7.309 casos (29%), figura 8. Estes resultados estão em acordo com dados nacionais onde a ocorrência dos acidentes botrópicos é mais elevada no período chuvoso com predominância entre os meses de janeiro a abril e associados com o aumento da temperatura e pluviosidade (Mise, 2007).

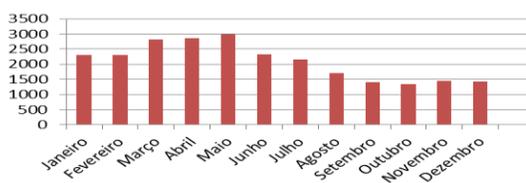


Figura 8- Sazonalidade dos acidentes botrópicos na região nordeste do Brasil, 2010 a 2015.

## 4. CONCLUSÃO

O conhecimento sobre número de acidentes botrópicos e a relação entre o tempo de atendimento, a evolução clínica e classificação quanto à gravidade do caso torna-se essencial para avaliar o problema, contribuir para a adoção de medidas preventivas e fomentar o desenvolvimento de políticas públicas destinadas a reduzir o número de acidentes, melhorar a ajuda médica e com isso minimizar sequelas e a mortes causadas por este gênero de serpente para as vítimas.

## 5. REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Saúde. Acidentes por animais peçonhentos. Serpentes. Aspectos epidemiológicos. 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Departamento de Informática. DATASUS. Informações em saúde: mortalidade.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014.
- BOCHNER, R.; STRUCHINER, C.J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. *Cad Saúde Pública*, v. 19, p. 7-16, 2003.
- CHIPPAUX, J.P. Control of ophidism in Brazil: a model for Africa. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2010;16(2):188-90.



- CRUZ, L.S.; VARGAS, R.; LOPES, A.A. Snakebite envenomation and death in the developing world. *Ethn Dis.* 2009;19:42-46.
- FARRAPO, N.M.; SILVA, G.A.A.; COSTA, K.N.; COGO, M.G.S.; BELO, C.A.D.; SANTOS, M.G.; GROppo, F.C.; FRANCO, Y.O. Inhibition of Bothrops jararacussu venom activities by *Plathymentia reticulata* Benth extracts. *J Venom Res.* 2011, 2:52-58.
- GUTIÉRREZ J.M., LEÓN G., ROJAS G., LOMONTE B., RUCAVADO A. Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon* 1998;36:1529-1539.
- GUTIÉRREZ, J.M.; THEAKSTON, R.D.; WARRELL, D.A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. *PLoS Med* 2006; 3:727-731.
- HIGUCHI, D.A.; BARBOSA, C.M.V.; BINCOLETTI, C.; CHAGAS, J.R.; MAGALHAES, A.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E.F.; PESQUERO, J.B.; ARAUJO, R.C.; PESQUERO, J.L. Purification and partial characterization of two phospholipases A2 from *Bothrops leucurus* (White-tailed-jararaca) snake venom. *Biochimie* 2007;89:319-328.
- KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A.R.; SILVA, N.; GUNAWARDENA, N.K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALLOO, D.G.; SILVA, H.J. The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. *PLoS Med* v. 5, p. 1591-1604. 2008
- LEMOS, J.C.; ALMEIDA, T.D.; FOOK, S.M.L.; PAIVA, A.A.; SIMÕES, M.O.S. Epidemiologia dos acidentes ofídicos notificados pelo Centro de Assistência e Informação Toxicológica de Campina Grande (Ceatox-CG), Paraíba. *Rev. bras. epidemiol.* vol.12 n.1 São Paulo Mar. 2009.
- LIRA-DA-SILVA, R.M.; MISE, Y.F.; BRAZIL, T.K.; CASAIS-E-SILVA, L.L.; CARVALHO, F.M. Morbimortalidade por ofidismo no nordeste do Brasil (1999-2003). *Gaz Med Bahia*, v. 79, p.21-25, 2009.
- MACHADO, C.; BOCHNER, R.; FISZON, J.T. Epidemiological profile of snakebites in Rio de Janeiro, Brazil, 2001-2006. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, vol.18 no.2 Botucatu, 2012.
- MISE, Y.F.; SILVA, R.M.L.; CARVALHO, F.M. Envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* no Estado da Bahia: aspectos epidemiológicos e clínicos. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 40, p. 569-573, 2007.
- MELGAREJO, A.R. Serpentes Peçonhentas: Principais Grupos, Identificação, Veneno, Acidentes e Primeiros Socorros. Disponível em: <[http://www.ivb.rj.gov.br/palestras/roteiro.doc./](http://www.ivb.rj.gov.br/palestras/roteiro.doc/)>. Acesso em: 20 jul. 2016.
- MORENO, E.; QUEIROZ, A.M.; LIRA, S.R.M.; TAVARES, N.J. Características clínicoepidemiológicas dos acidentes ofídicos em Rio Branco, Acre. *Rev Bras Med Trop*, v. 38, p. 15-21, 2005.
- PINHO, F. M. O.; OLIVEIRA, E. S.; FALEIROS, F. Acidente Ofídico no Estado de Goiás. *Ver. Assoc. Med. Bras.* 2004; 50(1): 93-6.
- RUCAVADO, A.; TERESA, E.; FRANCESHI, A.; FERNANDO, C.; LEON, G.; CURY, Y.; OVADIA, M.; GUTIÉRREZ, J.M. Inhibition of local hemorrhage and dermonecrosis induced by *Bothrops asper* snake venom: effectiveness of early in situ administration of the peptidomimetic metalloproteinase inhibitor batimastat the chelating agent CaNa2 EDTA. *J Trop Med Hyg*, v.63, p. 313-319, 2000.
- SILVA, L.M.G.; SILVA, C.A.A.; SILVA, A.; VIEIRA, R.P.; MESQUITA-FERRAI, R.A.; COGO, J.C.; ZAMUNER, S.R. Photobiomodulation Protects and Promotes Differentiation of C2C12 Myoblast Cells Exposed to Snake Venom. Asakura A, ed. *PLoS ONE*. 2016;11(4):e0152890. doi:10.1371/journal.pone.0152890.
- SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Disponível no sítio eletrônico do Departamento de Informática do Ministério da Saúde (DATASUS), em: <http://datasus.saude.gov.br>.
- TRIBUIANI, N. Uso de veneno de *Bothrops jararacuçu* como ferramenta farmacológica na avaliação do potencial antiofídico de *Terminalia fagifolia* (camaraçi) pelo parâmetro da sinapse nervo-músculo (camundongo/ave). 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Sorocaba/Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas. São Paulo, 2016.



WALDEZ, F.; VOGT, R. C. Aspectos ecológicos de acidentes ofídicos em comunidades ribeirinhas do baixo rio Purus, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, Amazonas, v.39, n.3, p.681-692, 2009.

WARRELL, A.D. Snake bite. *Lancet*. 2010;375(9708):77-88.

WILLIAMS, D.; GUTIÉRREZ, J.M.; HARRISON, R.; WARRELL, D.A.; WHITE, J.; WINKEL, K.D.; GOPALAKRISHNAKONE, P. The Global Snake Bite Initiative: An antidote for snake bite. Global Snake Bite Initiative Working Group; International Society on Toxinology. *Lancet*, v. 375, p. 89–91, 2010.



ÁREA DE SUBMISSÃO: VIGILÂNCIA E EPIDEMIOLOGIA EM SAÚDE – VE 7

## AVALIAÇÃO DA COBERTURA E EFETIVIDADE DO EXAME CITOLÓGICO PREVENTIVO DO CÂNCER DE COLO DO ÚTERO EM PERNAMBUCO, BRASIL

A. M. M. SILVA<sup>1</sup>, F. C. A. SOUZA<sup>1</sup> e U. L. FERREIRA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro Biociências

<sup>2</sup> Universidade de Pernambuco, Campus da Mata Norte

E-mail para contato: [alessandra.m.monteiro@gmail.com](mailto:alessandra.m.monteiro@gmail.com)

**RESUMO** – *O câncer de colo do útero (CCU) é uma patologia de evolução lenta e com isso possui grandes chances de detecção ainda em suas fases iniciais através do exame citológico preventivo, popularmente conhecido como Papanicolau. O objetivo deste estudo foi analisar a cobertura e a efetividade do exame citológico preventivo em Pernambuco, e para isso foi realizado um estudo descritivo, transversal e retrospectivo referente aos anos 2006-2015. Foram utilizados dados secundários coletados através do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), Sistema de Informações Ambulatoriais (SIA), Sistema de Informação do Câncer de Colo do Útero (SISCOLO), Sistema de informação de câncer (SISCAN) e do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). A cobertura média para o período foi de 9.8%, estando muito abaixo do parâmetro recomendado. A porcentagem dos exames com citologia anterior em 2015 foi de 100%, apresentando um aumento de 28.3%. No ano de 2015 não houve o registro de amostras insatisfatórias, no entanto nos anos anteriores, observou-se uma variação de 45%, sendo a maioria por artefato de dessecamento. O período médio de realização foi de 1 ano, e não foram observadas mudanças significativas na taxa de mortalidade por CCU. Com isso foi possível observar que a cobertura do exame preventivo ainda é muito ineficiente, o que compromete a sua efetividade e contribui para que a magnitude do câncer de colo do útero se mantenha estável.*

**Palavras-chave:** HPV; Papanicolau; Prevenção; Saúde Pública.

**ABSTRACT** - *cervical cancer is a condition of slow progress and it has great chances of detection still in its early stages through preventative cytological examination, popularly known as Pap smear. The aim of this study was to analyze the coverage and effectiveness of preventive screening in Pernambuco, and this was a descriptive study,*



*cross-sectional retrospective covering the years 2006-2015. secondary data collected were used by the Department of the Unified Health System, Outpatient Information System, System Information Cervical Cancer, Cancer Information System and Brazilian Institute of Geography and Statistics. The average coverage for the period was 9.8%, far below the recommended parameter. The percentage of tests with previous cytology in 2015 was 100%, with an increase of 28.3%. In the year 2015 there was no record of unsatisfactory samples, however in previous years, there was a 45% increase, mostly by desiccation artifact. The average period of realization was 1 year and there were no significant changes in cancer cervical mortality rate. It was observed that the coverage of the screening test is still very inefficient, which compromises its effectiveness and contributes to the magnitude of cervical cancer remains stable.*

*Keywords: HPV; Pap smear; Prevention; Public health.*

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de colo de útero (CCU), também conhecido como cervical é uma neoplasia maligna que se caracteriza pela divisão descontrolada de células do epitélio de revestimento causando comprometimento ao órgão e possível disseminação de células malignas para órgãos e estruturas próximas ou à distância (Coelho *et al.*, 2008). É classificado em dois grupos segundo o tipo celular de origem em: carcinoma epidermóide o qual se desenvolve em células do tipo escamoso, sendo o mais incidente e responsável por cerca de 90% dos casos, e adenocarcinoma, constituído de células do tipo glandular de ocorrência rara (Santos, Siqueira, Pereira, 2014; Santos, Varela, 2015).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) (2016), no mundo, o CCU figura como o terceiro tipo de câncer mais incidente em mulheres, excetuando-se o de câncer de pele (não melanoma), ficando atrás apenas do câncer de mama e colorretal. Possui em média 530 mil novos casos por ano e é o quarto como causa de morte por câncer com 265 mil óbitos por ano. No Brasil, há uma estimativa de 16.340 casos novos em 2016 com um risco de 15,85 casos a cada 100 mil mulheres, e apresenta-se como o terceiro em incidência e mortalidade dentre os tipos de câncer.

Em relação à sua etiologia, o CCU é primordialmente causado pela infecção persistente por alguns tipos do Papilomavírus Humano (*Human Papiloma Virus-HPV*), uma infecção sexualmente transmissível que de forma geral possuem alta infectividade, correspondendo a prevalência em 10% da população, e baixa patogenicidade, onde em mais de 90% dos casos de novas infecções regridem espontaneamente (Nunes *et al.*, 2015). O HPV atua como condição não única mas necessária para o desenvolvimento do CCU, sendo responsável por cerca de 99% do patogenia das lesões em conjunto com outros estímulos e características individuais, como o uso de anticoncepcionais e tabagismo (Albuquerque *et al.*, 2009). Estas alterações intraepiteliais possuem evolução lenta e inicialmente não apresentam sintomas podendo evoluir para quadros de pequenas hemorragias após relações sexuais, anormalidade da secreção vaginal e incômodos abdominais em estágios mais avançados (Olivero *et al.*, 2016). No entanto quando em estágio inicial as lesões podem ser identificadas através do exame citológico preventivo, também conhecido como Papanicolau, e facilmente curadas, podendo evitar a



incidência da doença entre 60 e 90% dos casos se houver uma cobertura mínima de 80% da população alvo (25 a 64 anos) com qualidade segundo a Organização Mundial de Saúde (*world health organization-WHO*) (2014).

Dentre os demais tipos de câncer o CCU possui características que lhe conferem vantagens em relação ao desenvolvimento e aplicação de técnicas e procedimentos de prevenção e rastreamento. Atualmente as estratégias recomendadas pelo INCA (2016) através do Programa Nacional de Combate ao Câncer de Colo do Útero são a vacinação contra o HPV para meninas de 9 a 13, que confere imunidade aos tipos 6 e 11 de baixo risco oncogênico e, 16 e 18 de alto risco oncogênico e mais prevalentes na população, e a cobertura do programa de rastreamento ou *screening* sistemático da população alvo através do exame citológico do colo do útero em 80%. Sendo importante observar que estas estratégias são ações preventivas de níveis primário e secundário complementares, devido a vacina não conferir imunidade a todos os tipos de HPV de alto risco oncogênico (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 55 e 68) (Nunes, Arruda, Pereira, 2015).

Em relação a detecção de lesões precursoras e diagnóstico do câncer de colo do útero o exame citológico é considerado a principal estratégia, principalmente por possuir as vantagens do baixo custo, ser um procedimento que não necessita de alto nível de tecnológico para a sua execução e apresentar alta especificidade e sensibilidade (Fonseca et al., 2013; INCA, 2016; Nayar, Wilbur, 2015). Com isso, o objetivo deste estudo foi analisar a proporção da população alvo presente no programa de rastreamento sistemático preventivo do CCU através do exame citológico do colo do útero em Pernambuco em comparação aos parâmetros preconizados como ideias na literatura, visto a sua alta potencialidade de impacto no perfil epidemiológico da doença.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo descritivo, transversal e retrospectivo referente aos anos 2006-2015. No qual foram utilizados dados secundários coletados através do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), Sistema de Informações Ambulatoriais (SIA), Sistema de Informação do câncer de colo do útero (SISCOLO), Sistema de informação e m cancer (SISCAN) e do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

A população estudada foi composta por mulheres incluídas na população alvo em relação a faixa etária prioritária para realização do exame preventivo citológico, entre 25 e 65 anos, que realizaram o exame citológico do colo do útero residentes em um dos 185 municípios que compõe o estado de Pernambuco, e que tiveram seus dados registrados nos sistemas de informações citados anteriormente.

Foram utilizados como indicadores de cobertura e efetividade do exame citológico do colo do útero: a proporção e a razão de mulheres incluídas na população alvo que realizaram o exame citológico, a proporção de exames citológicos realizados com exame anterior, a proporção de amostras insatisfatórias para a análise, a proporção de exames citológicos segundo o tempo de realização do último exame, escolaridade e faixa etária das mulheres, e a taxa de mortalidade por CCU.



Para análise dos dados, foram utilizados os cálculos estatísticos de média, variância, desvio padrão, e frequências absolutas e relativas no intuito de se obter dados que justifiquem os objetivos iniciais propostos pelo estudo.

Devido ao não envolvimento direto com seres humanos e impossibilidade de sua possível identificação por meio de dados secundários disponíveis nos sistemas de informação de domínio público, a submissão do projeto de pesquisa ao Comitê de Ética foi dispensada, porém foram seguidas as demais normas relativas a estes (CNS: 466/12).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantidade total de exames citológicos preventivos do CCU realizados no estado de Pernambuco no período de 2006 a 2015 foi de 3.340.721 com desvio padrão de 22.1 e 411.5 exames médios por ano. Neste período, foi possível observar que os 10 municípios com as maiores abrangências de cobertura se situam no sertão e agreste do estado com variação da proporção da população alvo atingida entre 16.3 % e 55.4%. Obteve destaque o município de Carnaíba, situado no sertão do estado, que se manteve como o município com maior abrangência do exame durante todo o período estudado com proporção da população alvo atingida média de 50%.

A proporção de exames citológicos do colo do útero realizados na população alvo entre 2006 e 2015 (Tabela 1) apresentou uma média para o período de 9.83%. Deste modo fica evidente o quão abaixo o estado está da proporção recomendada pelo INCA (2016) de 80% da população alvo alcançada, sendo uma meta já preconizada desde o 1988 pelo Ministério da saúde (2006). No entanto, é importante observar a limitação técnica do dado obtido devido a inserção apenas dos exames realizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS), que pode variar de 15 a 54.3% do quantitativo total de exames realizados segundo Murata *et al.* (2012) e Navarro *et al.* (2014), respectivamente.

A proporção dos exames citológicos do colo do útero com citologia anterior em 2015 foi de 100%, apresentando uma tendência crescente de 28.3 % desde o ano de 2006, o que indica uma boa capacidade de manutenção do exame de rastreamento com a população que já está inserida no sistema. No entanto, devido à baixa cobertura do sistema de rastreamento, também este resultado indica que há falha na captação de mulheres que ainda não iniciaram a rotina de realização dos exames preventivos (Tabela 1).

No quesito de adequabilidade da amostra, de acordo com Nayar e Wilbur (2015), é considerada satisfatória aquela que permite a visualização clara da amostra possibilitando uma conclusão diagnóstica. Para que isso seja possível, é necessário que estejam presentes e possam ser visualizadas células metaplásicas ou endocervicais devido a estas se localizarem na região onde se situam a maioria dos CCU. Quando isto não ocorre, é um indicativo que houve algum erro na coleta ou preparação da amostra para análise. Com isso, foi possível observar que não houve o registro de amostras insatisfatórias para o ano de 2015, contudo nos anos anteriores (2006-2014), nota-se uma variação média de 45% de amostras insatisfatórias, sendo a maioria por artefato de dessecação. Isto indica que houve uma melhora pontual no último ano, mas que é necessária uma maior atenção com os procedimentos pré-analíticos (Tabela 1).

Tabela 1 – Proporções e razão de exames citológicos preventivos do câncer de colo do útero na população alvo, proporção de exames com exame citológico anterior e proporção de amostras insatisfatórias (2006-2015)

Anos / parâmetro	Proporção de exames citológicos preventivos do câncer de colo do útero realizados na população alvo	Proporção de exames citológicos preventivos do câncer de colo do útero com exame citológico anterior	Proporção de exames citológicos preventivos do câncer de colo do útero com amostras insatisfatórias	Razão dos exames citológicos preventivos do câncer de colo do útero sobre a população alvo
2006	11.6 %	71.7 %	45 %	0.22
2007	11.2 %	75.7 %	54 %	0.16
2008	10.5 %	77.4 %	46.5 %	0.20
2009	9.8 %	76.3 %	58.3 %	0.19
2010	9.6 %	76.2 %	52.9 %	0.18
2011	9.1 %	76.2 %	58.9 %	0.17
2012	8.7 %	81.5 %	55.1 %	0.17
2013	7.2 %	84.1 %	42.7 %	0.16
2014	6.9 %	89.6 %	23.3 %	0.16
2015	13.7 %	100 %	-	0.25
<b>Média</b>	9.8 %	80.9 %	43.7 %	0.19
<b>Desvio padrão</b>	+/- 1.94 %	+/- 7.9 %	+/- 17.7 %	+/- 0.2

Fonte: Ministério da Saúde, DATASUS – SISCAN/SISCOLO/SIA/IBGE

Em relação à proporção de exames citológicos preventivos CCU realizados segundo a periodicidade do exame (Tabela 2), foi possível observar a superioridade de exames realizados com o intervalo de 1 ano em 48.2% dos exames. O que indica que há provavelmente o hiperstreamamento dentro da população inserida no sistema, tendo em vista que é indicado a realização do exame anual apenas nos dois primeiros anos, e caso negativos a cada 3 anos. Resultados semelhantes foram descritos por Murata *et al.* (2012) e Santos, Siqueira e Pereira (2014), que relataram as periodicidades de 60 % em 1 ano e 64% em 2 anos, respectivamente. Complementando este indicador, a razão dos exames citológicos preventivos sobre a população alvo também se demonstrou muito aquém do estabelecido como mínimo de 0.3 e meta de 1, possuindo uma média de 0.19 no período, indicador este que estabelece a realização de um exame a cada três anos como o preconizado pela Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer de colo do útero (Tabela 1).

Tabela 2 – Proporção de exames citológicos preventivos do câncer de colo do útero realizados segundo a periodicidade do exame na população alvo (2006-2013)

Tempo do último exame	Frequência	Números absolutos
Mesmo ano	5.6 %	186.407
1 ano	48.2 %	1.587.078
2 anos	19.4 %	640.239
3 anos	7.6 %	248.928

<b>4 anos</b>	2.6 %	86.004
<b>Mais que 5 anos</b>	4.4 %	145.135
<b>Sem exame anterior</b>	10.1 %	329.539
<b>IGN<sup>1</sup></b>	2.1 %	69.902
<b>Total</b>	100%	3.293.232

<sup>1</sup> Ignorados para este parâmetro.

Fonte: Ministério da Saúde, DATASUS – SISCAN/SISCOLO/SIA/IBGE

Em relação a distribuição de exames citológicos do colo do útero realizados segundo a escolaridade (Tabela 3), ficou evidente que a parcela mais expressiva foi a de mulheres com o ensino fundamental incompleto contrariando o esperado que as parcelas com o maior número de anos de estudo fosse a mais frequente segundo Albuquerque *et al.* (2009) e Assunção *et al.* (2015). Podendo este achado guardar relação com o perfil socioeconômico das mulheres que utilizam o SUS. Contudo, chama a atenção a grande proporção de mulheres que não tiveram este parâmetro estabelecido no sistema, revelando uma imensa falha na realização da captação da informação.

Tabela 3 – Proporção de exames citológicos preventivos do câncer de colo do útero realizados segundo a escolaridade da população alvo (2006-2013)

<b>Escolaridade</b>	<b>Frequência</b>	<b>Números absolutos</b>
<b>Analfabeta</b>	3.8 %	127.792
<b>Ensino fundamental incompleto</b>	18 %	595.650
<b>Ensino fundamental completo</b>	6.4 %	208.512
<b>Ensino médio</b>	8 %	262.197
<b>Ensino superior</b>	0.9 %	26.545
<b>IGN<sup>1</sup></b>	62.9 %	2.072.536
<b>(Continuação)</b>		
<b>Total</b>	100%	3.293.232

<sup>1</sup> Ignorados para este parâmetro.

Fonte: Ministério da Saúde, DATASUS – SISCAN/SISCOLO/SIA/IBGE

No tocante a faixa etária foi possível observar na distribuição dos exames citológicos do colo do útero realizados que a maioria dos exames (78%) foi realizada por mulheres na faixa etária de 25 a 49 anos, sendo as faixas entre 50 a 64 anos a menos frequente, o que é preocupante visto a que a incidência do câncer de colo do útero aumenta junto com o aumento da idade (Tabela 4).

Tabela 4 – Proporção de exames citológicos preventivos do câncer de colo do útero realizados segundo a faixa etária da população alvo (2006-2013)

<b>Faixa etária</b>	<b>Frequência</b>	<b>Números absolutos</b>
<b>25 a 29 anos</b>	18 %	594.466



30 a 34 anos	17.6 %	579.866
35 a 39 anos	15.9 %	523.801
40 a 44 anos	14.2 %	469.780
45 a 49 anos	12.2 %	399.680
50 a 54 anos	9.7 %	320.784
55 a 59 anos	7.4 %	240.416
60 a 64 anos	5 %	164.440
<b>Total</b>	<b>100%</b>	<b>3.293.232</b>

Fonte: Ministério da Saúde, DATASUS– SISCAN/SISCOLO/SIA/IBGE

Como indicador de efetividade do sistema de rastreamento pelo exame citológico preventivo, a taxa de mortalidade por CCU se mostrou estável com taxa média anual de 4.2 óbitos a cada 100.000 mulheres e variação de 0.2 com desvio padrão de 0.4. O que indica a falta de efetividade do programa, primariamente devido a falhas de cobertura onde a população que mais se beneficiaria das ações é a que menos o realizam, o que explica em parte a manutenção da magnitude do CCU.

#### 4. CONCLUSÃO

No Brasil e no mundo o exame preventivo é a principal ferramenta de rastreamento para o câncer de colo de útero, sendo de extrema importância a realização da cobertura preconizada. No entanto foi possível observar que a sua cobertura em Pernambuco ainda é muito ineficiente, o que contribui para que a magnitude do câncer do colo do útero se mantenha estável. Apesar da substancial melhora nos quesitos de adequabilidade da amostra e continuidade da população já inserida no Sistema. Sendo urgente para a saúde pública a maior efetividade das ações e serviços assistenciais de prevenção possibilitando um maior impacto no perfil epidemiológico do CCU.

#### 5. REFERÊNCIAS

ABUQUERQUE, K. M.; *et al.* Cobertura do teste de Papanicolaou e fatores associados à não-realização: um olhar sobre o Programa de Prevenção do Câncer do Colo do Útero em Pernambuco, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, V. 25. Sup 2 P. 301-309. 2009.

ASSUNÇÃO, J. R. G.; *et al.* Avaliação de indicadores para câncer de colo do útero no período de 2008 a 2012. *Rev Ciên Plu.* V. 1. N. 3. P. 38-50. 2015.

COELHO, F. R. C.; *et al.* Câncer do colo do útero. São Paulo: Tecmedd Editora; 2008.

FONSECA, A. J. *et al.* Custo-efetividade das estratégias de prevenção primária e secundária do câncer de colo de útero para o Brasil. *Rev Bra Onco Clín.* V. 9. N. 31. P. 11-17. 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (BRASIL). Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer de colo do útero. Rio de Janeiro: INCA. 2ª edição. 2016.



- MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). Controle dos cânceres do colo do útero e de mama. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.
- MURATA, I. M. H.; *et al.* Cobertura do Papanicolaou em mulheres de 25 a 50 anos de Maringá – PR, Brasil. *Rev Bra de Canc.* V. 58. P. 409-415. 2012.
- NAVARRO, C.; *et al.* Cobertura do rastreamento do câncer de colo de útero em região de alta incidência. *Rev saúd púb.* V. 47. P. 1-8 2014.
- NAYAR, R; WILBUR, D. C. The Pap teste and Bethesda 2014. *Acta Cytol.* V. 59. P. 121-132. 2015.
- NUNES, C. B. L.; ARRUDA, K. M.; PEREIRA, T.N. Apresentação da eficácia da vacina HPV distribuída pelo SUS a partir de 2014 com base nos estudos future i, future ii, e villa *et al.* *Acta Biom Bra.* V. 6. P. 1-9. 2015.
- SANTOS, A. C. S.; VARELA, C. D. S. Prevenção de câncer de colo de útero. *Rev Enf Cont.* V. 4. N. 2. P. 179-188. 2015.
- SANTOS, T. B. A.; SIQUEIRA, M. F. C.; PEREIRA, Q. L. Perfil das mulheres que realizaram o exame Papanicolaou em um município da região do médio Araguaia mato-grossense. *Rev Eletr da UNIVAR.* V. 1. N. 11. 2014.
- OLIVERO, L.; *et al.* Infecção por papilomavirus humano (HPV): aspectos gerais. *Rev Cient da Fac de Educ e Meio Amb.* V 7. N.1. P. 41-52. 2016.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Comprehensive cervical cancer control. A guide to essential practice. 2nd edition. 2014.

ÁREA DE SUBMISSÃO: VIGILÂNCIA E EPIDEMIOLOGIA EM SAÚDE – VE 8

## ANÁLISE DOS FATORES ASSOCIADOS À MORTALIDADE POR CÂNCER DO COLO DO ÚTERO EM RECIFE, PERNAMBUCO

N. G. M. BARROS<sup>1</sup>, P. G. M. DE MELO FILHO<sup>2</sup> e A. F. DE CALDAS JÚNIOR<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Secretaria de Saúde do Município do Recife, Secretaria Executiva de Vigilância à Saúde, Gerência de Vigilância Epidemiológica

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Sociais e Aplicadas, Departamento de Economia

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Clínica e Odontologia Preventiva

E-mail para contato: nataliagmb@gmail.com

*RESUMO – O câncer do colo do útero (CCU) é um relevante problema de saúde pública no Brasil, especialmente nas regiões menos desenvolvidas. Objetivo: Analisar a mortalidade por CCU e sua relação com os fatores socioeconômicos e demográficos no Recife, 2005 a 2010. Metodologia: estudo analítico de base de dados secundários, com registro de 123 óbitos por CCU como causa básica no Sistema de Informação sobre Mortalidade e de 24.775 mulheres vivas no Censo de 2010 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Os óbitos foram descritos segundo as variáveis socioeconômicas e demográficas, depois se realizou uma regressão logística múltipla para verificar a existência de associação estatisticamente significativa entre as variáveis explicativas como: faixa etária, raça/cor, nível de instrução, situação conjugal e Região Política-administrativa (RPA) e o óbito por CCU. Resultados: Os óbitos concentraram-se nas mulheres entre 40 a 59 anos de idade (47,9%), pretas ou pardas (75%), com ensino médio completo ou superior incompleto (49,59%) e sem companheiro (74,8%). Não houve concentração em nenhuma RPA. Com exceção desta variável, todas as demais abordadas no estudo apresentaram relação estatisticamente significativa com o óbito por CCU. Conclusão: a chance de uma mulher vir a morrer por CCU no Recife é maior com o avanço da idade, nas mulheres não brancas, que vivem sem companheiro e com baixa escolaridade, configurando diferenças na probabilidade de morte.*

*Palavras-chave: óbito; câncer cervical; fatores socioeconômicos e demográficos.*

*ABSTRACT – Cervical cancer (UCC) is a relevant public health problem in Brazil,*

*especially in less developed regions. Objective: To analyze mortality by CCU and its relationship with socioeconomic and demographic factors in Recife, from 2005 to 2010. Methodology: an analytical study of secondary databases, with a record of 123 deaths by CCU as a basic cause in the Mortality Information System and Of 24,775 women living in the 2010 Census of the Brazilian Institute of Geography and Statistics. Deaths were described according to socioeconomic and demographic variables, followed by a multiple logistic regression to verify the existence of a statistically significant association between the explanatory variables as: age, race / color, level of education, marital status and Political-administrative Region (RPA) and death by CCU. RESULTS: Deaths were concentrated in women between 40 and 59 years of age (47.9%), black or brown (75%), incomplete high school (49.59%) and no partner (74, 8%). There was no concentration in any RPA. With the exception of this variable, all the others addressed in the study presented a statistically significant relationship with CCU death. Conclusion: the chance of a woman dying by CCU in Recife is greater with the advancement of age, in nonwhite women, who live without a partner and with a low level of schooling, with differences in the probability of death.*

*Keywords: death; cervical cancer; socioeconomic and demographic factors.*

## 1. INTRODUÇÃO

Mudanças nos padrões demográficos, econômicos e no estilo de vida da população brasileira nas últimas décadas têm contribuído com a transição epidemiológica, na qual as Doenças e Agravos Não Transmissíveis (DANT) se destacam no cenário nacional. Dentre elas, as neoplasias vêm ocupando uma das primeiras posições entre as principais causas de óbito no Brasil e no mundo (PERNAMBUCO, 2013).

É possível observar a existência de um perfil da prevalência de determinados tipos de câncer em países em desenvolvimento que se assemelha ao perfil em países desenvolvidos, principalmente com relação aos cânceres de próstata, mama e intestino; entretanto, ainda persistem os cânceres relacionados às condições socioeconômicas menos favoráveis, como o câncer do colo do útero (CCU) e o do estômago. As taxas de incidência estimada e de mortalidade no Brasil para o CCU apresentam valores intermediários em relação aos países em desenvolvimento, porém são elevadas quando comparadas às de países desenvolvidos com programas de detecção precoces bem estruturados. Diferenças, também, observadas na ocorrência deste tipo de câncer nas regiões brasileiras (INCA, 2015).

As medidas de prevenção, diagnóstico e tratamento para o CCU encontram-se disponíveis nos serviços de saúde. Neste contexto, a ocorrência da doença pode estar associada a outros fatores de ordem econômica, social, geográfica e cultural da mulher na sociedade, bem como às dificuldades de acesso aos serviços de saúde para detecção e tratamento precoces, fundamentais para a redução da morbimortalidade (MENDONÇA et al., 2008; PERNAMBUCO, 2013).

Para tanto, as estatísticas de mortalidade podem ser um importante instrumento para essa análise, por ser um indicador utilizado para medir os padrões de evolução de doenças em diferentes populações e, por isso mesmo, têm sido cada vez mais utilizadas em estudos epidemiológicos, uma

vez que dados de incidência não estão comumente disponíveis. Por ser o CCU um relevante problema de saúde pública no Brasil, especialmente nas regiões menos desenvolvidas, particularmente, em Pernambuco e no Recife, e por dispor de estratégias de prevenção, diagnóstico e tratamento que não justificam as altas incidências de morbimortalidade, é importante ampliar estudos que analisem a sua associação com os fatores individuais relacionados à situação socioeconômica e demográfica da mulher.

Portanto, uma análise mais aprofundada da mortalidade por CCU no Recife, pode contribuir para formulação de políticas públicas mais qualificadas para o planejamento das ações de enfrentamento a este agravo, minimizando as iniquidades em saúde da população e, conseqüentemente, a incidência de mortes por essa neoplasia.

Assim, este estudo teve como objetivo geral analisar a relação entre os fatores socioeconômicos e demográficos e a mortalidade por câncer do colo do útero no município do Recife, no período de 2005 a 2010 e como objetivos específicos: caracterizar os óbitos e as mulheres vivas em função das variáveis socioeconômicas e demográficas; verificar se existe ou não relação estatisticamente significativa entre a mortalidade por CCU e as variáveis: faixa etária, raça/cor, situação conjugal, nível de instrução e Região Político-administrativa de residência. Por último, identificar a influência das variáveis socioeconômicas e demográficas na probabilidade da ocorrência do óbito por CCU.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado um estudo analítico de base de dados secundários. Compreendeu o município do Recife, capital de Pernambuco, dividido em seis Regiões Político-Administrativas (RPA): RPA 1 (Centro); 2 (Norte); 3 (Noroeste); 4 (Oeste); 5 (Sudoeste) e 6 (Sul) (RECIFE, 1997).

A população estudada foi de 24.775 mulheres vivas e a 123 óbitos residentes do Recife, cuja causa básica foi CCU, ocorridos entre 1º de janeiro de 2005 a 31 de julho de 2010. As informações sobre os óbitos foram obtidas da base de dados secundários do Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM), da Secretaria Executiva de Vigilância à Saúde (Sevs) do Recife e para as mulheres vivas, as informações foram obtidas do Censo de 2010 do IBGE.

A causa mortis por CCU foi considerada como variável dependente e as variáveis socioeconômicas e demográficas foram consideradas como independentes: faixa etária, raça/cor, estado civil, nível de instrução e RPA de residência, conforme Quadro 1.

Variável	Definição operacional	Categorização
Faixa etária	Considerada a idade registrada no SIM e no Censo de 2010, em anos.	19 a 39 40 a 59 ≥ 60
Raça/cor	Considerada a raça-cor do registrada no SIM e no Censo de 2010. As categorias preta e parda foram consideradas na categoria como “não brancas”.	Branças Não brancas
Nível de Instrução	Considerada a escolaridade registrada no SIM e o nível de instrução registrado no Censo de 2010. As categorias do banco do SIM foram compatibilizadas com variável “nível de instrução” do IBGE: as categorias “sem escolaridade” e fundamental (1ª a 4ª série) foram incluídas na categoria 1 (sem instrução e Fundamental Incompleto) e a categoria fundamental II (5 a 8ª série) foi incluída na categoria 2	Sem instrução e Fundamental Incompleto Fundamental completo e Médio Incompleto Médio completo e Superior Incompleto

	(Fundamental completo e Médio Incompleto).	Superior Completo
Situação conjugal	Considerada a situação conjugal registrada no SIM e o estado civil do Censo de 2010, para a obtenção de duas categorias. As mulheres casadas ou com união estável foram classificadas na categoria “com companheiro” e as registradas como viúvas, solteiras e desquitadas, separadas judicialmente ou divorciadas foram classificadas em “sem companheiro”.	Com companheiro Sem companheiro
RPA de residência	Considerada a RPA de residência, a partir do bairro e da área de ponderação, com base na validação do endereço registrado no SIM e no Censo de 2010.	RPA 1      RPA 4 RPA 2      RPA 5 RPA 3      RPA 6

Quadro 1 - Descrição das variáveis independentes socioeconômicas e demográficas.

Para a análise da associação entre as variáveis abordadas no estudo e a mortalidade por CCU, foram obtidas estimativas das variáveis através do modelo de regressão logística múltipla, para verificar a existência ou não de relação estatisticamente significativa entre a faixa etária, raça/cor, situação conjugal, nível de instrução, Região Político-administrativa de residência e a ocorrência de óbito por CCU, ao nível de significância de 5% e intervalo confiança de 95%. O cálculo do *Odds ratio* foi utilizado como medida de associação. Para o processamento e análise dos dados foi utilizado o software estatístico Statistics Data Analysis (Stata), versão 12.0.

O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), com o Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) de número 53141716.5.000.5208.

### 3. RESULTADOS

Foram analisadas 24.898 observações, sendo 24.775 mulheres vivas e 123 óbitos por CCU residentes do Recife, ocorridos no período de 1º de janeiro de 2005 a 31 de julho de 2010.

A descrição dos óbitos apontou que a idade mínima foi de 19 anos e a máxima de 88 anos, com média de 55,3 anos, mediana de 55 anos e desvio padrão de 15,3 anos. A faixa etária de 40 a 59 anos concentrou o maior número de óbitos, seguindo das mulheres com 60 anos ou mais e das mulheres entre 19 a 39 anos. Para as mulheres vivas, o maior número de observações foi na faixa etária de menor idade para as de maior idade, conforme mostra a Tabela 1.

Em relação a variável raça/cor, tanto para os óbitos quanto para as mulheres vivas, a maioria foi registrada como mulheres pretas e pardas e não foi declarada a vivência das mulheres com companheiro, sendo incluídas, nesta categoria, as solteiras, separadas judicialmente/divorciadas e as viúvas, conforme apresentado na Tabela 1.

Quanto ao nível de instrução, a maior frequência dos óbitos ocorreu em mulheres com ensino médio completo ou superior incompleto, seguida dos óbitos sem instrução ou com fundamental incompleto e fundamental completo e médio incompleto. Já, para as mulheres vivas, a maior ocorrência foi das que não possuíam instrução e fundamental incompleto, seguida das mulheres com ensino médio completo e superior incompleto, de acordo com a Tabela 1.

Não se observou predomínio na ocorrência dos óbitos em relação à RPA de residência. A RPA 6 apresentou a maior frequência dos óbitos, porém sem maior relevância em relação às demais, já que também possuía a maior proporção de residentes de mulheres vivas do Recife.

Tabela 1 - Distribuição dos óbitos por câncer do colo do útero e das mulheres vivas residentes, segundo variáveis socioeconômicas e demográficas. Recife, 2005 a 2010

Variável	Categoria	Óbitos		Mulheres Vivas	
		n (123)	% (100,0)	n (24.775)	% (100,0)
Faixa Etá	19 a 39 anos	18	14.63	11.742	47,39
	40 a 59 anos	59	47.97	8.608	34,74
	60 anos ou mais	46	37.40	4.425	17,86
Raça/co	Branças	30	24.39	10.538	42,53
	Não brancas	90	73.17	14.237	57,47
	Ignorada	3	2.44	0	0
Nível de instrução	Sem instrução e Fundamental Incompleto	30	24.39	8.552	34,52
	Fundamental completo e Médio Incompleto	24	19.51	3.739	15,09
	Médio completo e Superior Incompleto	61	49.59	8.317	33,57
	Superior Completo	8	6.50	4.167	16,82
Situação conjuga	Com companheiro	31	25.20	8.180	33,02
	Sem companheiro	92	74.80	16.595	66,98
RPA	RPA 1	13	10.57	1.523	6,15
	RPA 2	17	13.82	3.303	13,33
	RPA 3	17	13.82	4.031	16,27
	RPA 4	22	17.89	4.834	19,51
	RPA 5	21	17.07	4.369	17,63
	RPA 6	33	26.83	6.715	27,10

Fonte: Própria autora

Para verificar a associação entre os fatores socioeconômicos e demográficos e a mortalidade por CCU, foram obtidas estimativas através do modelo de regressão logística múltipla, que incluiu as variáveis dummies explicativas: “faixa etária2”, “faixa etária3”, “nível de instrução1”, “nível de instrução2”, “nível de instrução3”, “situação conjugal1”, “branca”, “RPA2”, “RPA3”, “RPA4”, “RPA5” e “RPA6”. Como variáveis basais foram consideradas: “faixa etária1”, “nível de instrução4”, “situação conjugal1” (sem companheiro), “branca” (não brancas) e “RPA1” (não residentes da RPA1), conforme a Tabela 2 apresenta.

Observou-se que a variável “nível de instrução1”, “RPA2”, “RPA3”, “RPA4”, “RPA5” e “RPA6” não apresentaram significância estatística ( $p$ -valor $>0.05$ ), porém não foram retiradas do modelo, uma vez que se entende que todas são importantes para a análise dos dados como explicação para o desfecho morte por CCU, de acordo com a Tabela 2.

Identificou-se que ser da raça/cor branca ou viver com companheiro era considerado fator de proteção. As mulheres brancas apresentaram aproximadamente 64% a menos de chance de vir a óbito por CCU do que as mulheres não brancas e as mulheres com companheiro 42% a menos do que as que viviam sem companheiro.

As variáveis referentes à faixa etária e ao nível de instrução apresentaram relação positiva com a ocorrência de óbito por CCU e foram consideradas fatores de risco. Portanto, possuir nível fundamental completo e médio incompleto ou médio completo e superior incompleto apresentou 198% e 322% a mais de chance de vir a morrer por CCU, respectivamente, do que as mulheres com nível superior completo. Bem como, estar entre 40 a 59 anos ou com 60 anos ou mais de idade possui

uma probabilidade maior de vir a óbito por CCU de 534% e 1082%, respectivamente, do que as mulheres entre 19 a 39 anos de idade, conforme disposto na Tabela 2.

Tabela 2 - Variáveis independentes do modelo não restrito, segundo coeficiente, p-valor e, *Odds ratio* e Intervalo de Confiança. Recife, 2005-2010

Variável	Coeficiente	p-valor	Odds ratio	Intervalo de Confiança (95%)	
				Inferior	Superior
Faixa etária <sup>2</sup>	1.85	0.00	6.34	3.71	10.84
Faixa etária <sup>3</sup>	2.47	0.00	11.82	6.73	20.78
Nível de instrução <sup>1</sup>	-0.03	0.94	0.97	0.44	2.15
Nível de instrução <sup>2</sup>	1.09	0.01	2.98	1.32	6.70
Nível de instrução <sup>3</sup>	1.44	0.00	4.22	2.00	8.90
Situação conjugal <sup>1</sup>	-0.54	0.01	0.58	0.38	0.88
Branca	-1.02	0.00	0.36	0.23	0.55
RPA <sup>2</sup>	-0.48	0.20	0.62	0.30	1.29
RPA <sup>3</sup>	-6.44	0.08	0.53	0.25	1.09
RPA <sup>4</sup>	-0.60	0.09	0.55	0.28	1.10
RPA <sup>5</sup>	-0.66	0.07	0.52	0.26	1.04
RPA <sup>6</sup>	-0.50	0.13	0.61	0.32	1.16

Fonte: Própria autora

Nota: Pseudo R<sup>2</sup> = 0.09/ Log verossimilhança = -703.26

#### 4. DISCUSSÃO

Em Recife, a análise apontou que quanto maior a idade, maior foi a chance de vir a óbito por CCU. No estudo de Mendonça et al. (2008), a faixa etária inferior a 60 anos, concentrou mais da metade de todos os óbitos por CCU. Sabe-se que boa parte das infecções por HPV em mulheres com menos de 30 anos regride espontaneamente, ao passo que acima dessa idade a persistência é mais frequente. Portanto, geralmente a doença começa a partir dos 30 anos e aumenta seu risco rapidamente até atingir as faixas etárias acima de 50 anos, possivelmente, também devido à exposição cumulativa no tempo aos demais fatores de risco (INCA, 2015).

A alta incidência da mortalidade por CCU pode indicar que o diagnóstico tem sido realizado em estágios mais avançados da doença, principalmente nas mulheres com mais idade, uma vez que o diagnóstico precoce pode alcançar 100% de cura. Essa informação pode sugerir que essas mulheres não foram contempladas pelos programas de rastreamento recomendados pelo MS, que preconiza a realização do exame preventivo para mulheres entre 25 e 64 anos de idade, ou seja, podem não terem sido captadas pelos serviços de saúde.

Os programas de grande escala para a detecção do CCU foram estruturados no passado no Brasil, geralmente vinculados a programas de planejamento familiar, direcionados prioritariamente à população feminina menor de 30 anos de idade, quando deveria ser prioritário o rastreamento em mulheres de faixas etárias superiores, cujo risco é muito maior (WUNSCH FILHO; MONCAU, 2002).

Os dados indicaram que a chance de as mulheres brancas virem a morrer por CCU foi menor do que as mulheres pardas ou pretas. Neste estudo, a raça/cor foi utilizada como uma variável de aproximação da situação socioeconômica e não como de explicação biológica, haja vista a

determinação genética explicar apenas uma parte mínima da morbimortalidade das populações (MENDONÇA et al., 2008, THULER; BERGMANN; CASADO, 2012).

Verificou-se que a variável referente às mulheres com o menor nível de instrução não foi significativa estatisticamente, o que pode ser explicado devido ao fato de que as pessoas menos instruídas também são àquelas que vivem em condições de vida mais precárias, em situações de pobreza, cujos determinantes sociais acarretam em outros problemas de saúde característicos do baixo desenvolvimento humano, como tuberculose, alcoolismo, desnutrição, Aids, entre outras doenças próprias da miséria e podem acabar morrendo antes por outras causas básicas, que não o CCU. Para essas mulheres, a expectativa de vida é baixa, ou seja, vivem menos, o que favorece a um menor tempo de exposição aos fatores cancerígenos e, possivelmente, a uma menor chance de ter CCU (INCA, 2012).

A incidência do CCU costuma ser mais frequente em mulheres de classes sociais mais baixas e com menor nível de escolaridade. Mulheres com baixo grau de instrução têm maior risco de desenvolver CCU, devido a um maior risco de diagnóstico tardio e, conseqüentemente, para o grande número de recidivas, metástases e óbitos encontrados (THULER; BERGMANN; CASADO, 2012).

Mulheres com nível de escolaridade mais baixo apresentam maior a chance de morrer por CCU, corroborando com Navarro et al. (2015), quando afirmam que o desconhecimento da doença, das causas e dos meios de prevenção tem estreita relação com a não adesão ao rastreamento. Pessoas mais instruídas têm mais acesso às informações, são mais esclarecidas e entendem a importância de realizar o exame preventivo rotineiramente. Sabendo-se que a não adesão periódica ao Papanicolaou determina que as mulheres sejam diagnosticadas em fase já avançada da doença, com pouca possibilidade de cura, impactando de modo significativo nas taxas de morbimortalidade.

Além disso, a escolaridade está associada à renda, o que também se pode pensar que pessoas mais favorecidas economicamente tendem a ter melhores condições de saúde, por disporem de mais acesso a serviços de saúde, de forma mais oportuna e de melhor qualidade e a serviços de saúde suplementar ao SUS, como a adesão aos planos de saúde privados. No Recife, entre 2000 e 2004, a maioria dos óbitos por CCU ocorreu em hospitais (85,1%), dos quais 90,2% pertenciam à rede assistencial do SUS, reforçando, desta forma, o fato de haver maior mortalidade em mulheres com mais baixa condição econômica, usuárias do Sistema (MENDONÇA et al., 2008).

Em relação a situação conjugal, o estudo apontou que as mulheres casadas ou em união estável apresentaram menos chance de morrer por CCU do que as mulheres que viviam sem companheiro. O achado levanta a hipótese de que as mulheres com companheiro estão menos expostas a infecção pelo HPV e outras doenças sexualmente transmissíveis, por acreditar que o companheiro seja o único parceiro sexual e considerando que a multiplicidade de parceiros é fator de risco. Outros estudos apontaram que as mulheres que tiveram um único parceiro apresentaram frequência inferior de lesões, quando comparadas com as que tiveram dois ou mais e que no grupo de mulheres que apresentaram casos confirmados de câncer, o número de parceiros também foi maior (LEAL et al., 2003, SILVA et al., 2006).

As variáveis referentes à RPA de residência não foram significantes, o que representa que não interferiram no desfecho e que outros fatores já analisados foram mais relevantes e melhor representaram os fatores socioeconômicos e demográficos aos quais as mulheres foram expostas, bem como suas associações com a mortalidade por CCU.

## 5. CONCLUSÃO

Os óbitos por CCU se concentraram de forma mais expressiva nas mulheres entre 40 a 59 anos de idade, pretas ou pardas, com ensino médio completo ou superior incompleto e sem companheiro. Já, em relação à RPA de residência, não houve predomínio na ocorrência dos óbitos.

As variáveis faixa etária, raça/cor, situação conjugal e nível de instrução apresentaram relação estatisticamente significativa com a mortalidade por CCU, com exceção da variável “nível de instrução 1” e da variável RPA.

Ser da raça/cor branca ou viver com companheiro foi considerado fator de proteção, enquanto que as variáveis referentes à faixa etária e nível de instrução foram consideradas fatores de risco para o óbito por CCU.

A probabilidade de uma mulher vir a morrer por CCU no Recife aumenta com o avanço da idade e é maior nas mulheres não brancas, que vivem sem companheiro e com baixa escolaridade.

## 6. REFERÊNCIAS

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (Brasil). Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Educação. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Educação;. – 2. ed. rev. e atual.– Rio de Janeiro: Inca, 2012. 129p. BRASIL, 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (Brasil). Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015. 122 p.: il. color.

LEAL, Elaine Azevedo Soares et al. Lesões precursoras do câncer de colo em mulheres adolescentes e adultas jovens do município de Rio Branco - Acre. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, Rio de Janeiro, v.25, n.2, p. 81-86, Mar. 2003.

MARTINS, Luís Felipe Leite; THULER, Luiz Claudio Santos; VALENTE, Joaquim Gonçalves. Cobertura do exame de Papanicolaou no Brasil e seus fatores determinantes: uma revisão sistemática da literatura. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, Rio de Janeiro, v.27, n.8, p. 485-492, Ago. 2005.

MENDONÇA, Vilma Guimarães de et al. Mortalidade por câncer do colo do útero: características sociodemográficas das mulheres residentes na cidade de Recife, Pernambuco. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, Rio de Janeiro, v.30, n.5, p. 248-255, Mai. 2008.

NAVARRO, Cibelli et al. Cobertura do rastreamento do câncer de colo de útero em região de alta incidência. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v.49, 17, 2015.

PERNAMBUCO. Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco. Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde. Diretoria Geral de Promoção, Monitoramento e Avaliação da Vigilância em Saúde.



**Neoplasias – O cenário em Pernambuco** / Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco. Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde. Diretoria Geral de Promoção, Monitoramento e Avaliação da Vigilância em Saúde. Pernambuco: Secretaria de Saúde, 2013. 41 p.: il. color. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

RECIFE, Lei Municipal nº 16.293, de três de fevereiro de 1997. Dispõe sobre as Regiões Político-Administrativas do Município do Recife e dá outras providências. Diário Oficial do Recife, Recife, PE, 04 fev. 1997.

SILVA, Terezinha Tenório da et al. Identificação de tipos de papilomavírus e de outros fatores de risco para neoplasia intra-epitelial cervical. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, Rio de Janeiro, v.28, n.5, p. 285-291, Mai. 2006.

THULER, Luiz Claudio Santos; BERGMANN, Anke, CASADO, Letícia. Perfil das Pacientes com Câncer do Colo do Útero no Brasil, 2000-2009: Estudo de Base Secundária. **Rev. Bras. Cancerol.** Rio de Janeiro, v.58, n.3, p.351-357, Jun. 2012.

WUNSCH FILHO, Victor; MONCAU, José Eduardo. Mortalidade por câncer no Brasil 1980-1995: padrões regionais e tendências temporais. **Rev. Assoc. Med. Bras.** São Paulo, v.48, n.3, p. 250-257, Set. 2002.

REALIZAÇÃO



APOIO

