



**3º Encontro Brasileiro
para Inovação Terapêutica**

**1º Workshop
Rede RISH**
Rede de Inovação em Insumos
para Saúde Humana

**II Workshop
Estabilidade de Fármacos
e Medicamentos**

21 e 22/10/2013
Campus UFPE

23 a 25/10/2013
Dorisol Recife
Grand Hotel

Interligando competências científicas, tecnológicas e industriais em espaços de saúde



ANAIS DO 3º ENCONTRO BRASILEIRO PARA INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

ISSN 2318-3926

RECIFE
2013



3º Encontro Brasileiro
para Inovação Terapêutica

1º Workshop
Rede RISH
Rede de Inovação em Insumos
para Saúde Humana

II Workshop
Estabilidade de Fármacos
e Medicamentos

21 e 22/10/2013
Campus UFPE

23 a 25/10/2013
Dorisol Recife
Grand Hotel

Interligando competências científicas, tecnológicas e industriais em espaços de saúde



3º ENCONTRO BRASILEIRO PARA INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Interligando competências científicas, tecnológicas e
industriais em espaços de saúde



Presidente do 3º EBIT
César Augusto Souza de Andrade

COMISSÃO ORGANIZADORA

Amanda Carla Quintas de M. Vieira
Breno Caldas de Araújo
Bruno Trajano Barbosa
Camila Bezerra Melo Figueirêdo
Diego Cravo
Douglas Carvalho Francisco Viana
Fernando Zanghelini
Graziella Silvestre Marques
Helena Lima da Silva Neta
Janilson José da Silva Júnior
Juliana Lúcia de A. de Vasconcelos
Juliana Pereira Aguiar
Leandro de Albuquerque Medeiros
Leidiane Carla Lira de Oliveira
Maira Galdino da Rocha Pitta
Magda Rhayanny Assunção Ferreira
Marcel Lucas de Almeida
Marcos Aurélio Moraes Galvão
Mardonny Bruno de O. Chagas
Maria Carolina de Araujo Melo
Maria Danielly Lima de Oliveira
Maria Luiza Carneiro Moura
Marina Galdino da Rocha Pitta
Michelly Cristiny Pereira
Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo
Natalie Emanuelle Ribeiro e Silva
Pablo Ramon Gualberto Cardoso
Rafael Ramos da Silva
Regina Souza Aires
Simone Santos Bezerra
Thiago André Ramos dos Santos
Tiago Rafael de Souza Nunes

Presidente do 1º Workshop da Rede RISH
Ivan da Rocha Pitta

COMISSÃO CIENTÍFICA

César Augusto Souza de Andrade
Ivan da Rocha Pitta
Karina Perrelli Randau
Luiz Alberto Lira Soares
Maria Danielly Lima de Oliveira
Maira Galdino da Rocha Pitta
Marina Galdino da Rocha Pitta
Michelly Cristiny Pereira
Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

PALAVRA DO PRESIDENTE

O Encontro Brasileiro para Inovação Terapêutica – EBIT foi criado com a finalidade de reunir estudantes, profissionais, gestores públicos e privados para discutirem assuntos implicados no processo da pesquisa, desenvolvimento e implantação de bens e serviços prioritários para a saúde, como fármacos, medicamentos e outros insumos estratégicos.

Em sua primeira edição, ocorrida em 2009, o EBIT reuniu pessoas de diferentes campos da ciência para discutirem o tema "Descortinado à interdisciplinaridade: acesso e formas de apropriação de inovações tecnológicas e seus impactos sociais". Em 2011, o EBIT se afirmou em sua segunda edição, ao superar o anterior em quantidade e diversidade de público, para discutirem o tema "Integrando desafios para construção de espaços para saúde". Nessa segunda edição, o encontro recebeu apoio do Ministério da Saúde, que escolheu o evento para realizar a primeira jornada para o desenvolvimento da economia da saúde em Pernambuco.

Para sua terceira edição, o EBIT pretende continuar a orientar o desenvolvimento de políticas públicas, conhecimentos e tecnologias que possam contribuir para o complexo industrial da saúde e o bem estar da população brasileira. O tema escolhido para nortear as discussões do evento desta vez foi "Interligando competências científicas, tecnológicas e industriais em espaços de saúde"

A organização do encontro é realizada por docentes e discentes do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da UFPE, em parceria com o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica – INCT_if. O evento ocorrerá de 22 a 25 de Outubro de 2013 no Dorisol Recife Grand Hotel, em Jaboatão dos Guararapes – PE. As atividades previstas para o 3º EBIT incluem: minicursos, mesas redondas, palestras, conferências e apresentações de trabalhos científicos, além de atividades culturais.

Prof. César Augusto Souza de Andrade
Presidente 3º EBIT

PROGRAMAÇÃO OFICIAL**DIA 21/10/2013 – Segunda-feira (Campus UFPE Recife)****8h – 18h****Minicursos****DIA 22/10/2013 – Terça-feira (Auditório do CCSA – Campus UFPE Recife)****9:00 – 9:30h****Abertura do 2º Workshop de Estabilidade de Fármacos e Medicamentos****9:30 – 10:20****A importância do estudo de estabilidade no P,D e I de fármacos e Medicamentos**

Prof. Jose Lamartine Soares Sobrinho – UFPE

10:20 – 11:10**Desenvolvimento de Métodos analíticos aplicados no estudo de estabilidade: CLAE – DAD**

Profª. Larissa Rolim - UNIVASF

11:10 – 12:00**Desenvolvimento de métodos analíticos aplicados no estudo de estabilidade: LC - MS**

Prof. Danilo Bedor - UFPE

12:00 - 14h**Intervalo para almoço****14:00 – 15:00****Desenvolvimento de métodos Indicativos de estabilidade: uma visão acadêmica**

Prof. Leiz Veras - BIOTECH-UFPI

15:00 – 16:00**Análise térmica como ferramenta no estudo de estabilidade de fármacos e medicamentos – Parte I**

Prof. Jivaldo Matos – USP

16:00 – 17:00**Análise térmica como ferramenta no estudo de estabilidade de fármacos e medicamentos – Parte II**

Prof. Adriano Antunes – UFS

DIA 23/10/2013 – Quarta-feira (Dorisol Recife Grand Hotel)**8 – 8:30h****Credenciamento****8:30 – 9:30h****Café da manhã de boas vindas****9:30 – 11h****Diálogos entre saúde e desenvolvimento:
Rede de Inovação em Insumos para Saúde Humana – RISH**
Ivan da Rocha Pitta – Presidente do INCT_if
Geiziane Porto – INGTEC-USP
César Augusto de Souza de Andrade – PPGIT-UFPE**14 – 18h****Espaço reservado para o Ministério da Saúde
Hórus: uma nova ferramenta de Inovação Tecnológica para a Gestão da Assistência Farmacêutica no SUS**
Joyce Nunes dos Santos
Karolina Marçal
Departamento da Assistência Farmacêutica – DAF/Ministério da Saúde**18 - 19h****Cerimônia de Abertura do 3º EBIT
Formação de mestres e doutores: alcançaremos a transdisciplinaridade?**
Gisela Alves – UFPE**19 - 22h****Coquetel Cultural****DIA 24/10/2013 – Quinta-feira (Dorisol Recife Grand Hotel)****8-10h****Mesa 1
A importância das redes colaborativas
acadêmicas na consolidação de competências
científicas, tecnológicas e industriais em espaços
de saúde**
Breno Fontes – UFPE
Virginia Leal – UFPE
Silvana Nair Leite – UFSC
Tatiane Almeida de Menezes – UFPE**Mesa 2
Produtos naturais e bioativos**
João Carlos Palazzo de Mello – UEM
Tania Mari Bellé Bresolin – UNIVALI
Tania Maria Sarmiento da Silva – UFRPE
Luiz Alberto Lira Soares – UFPE

10 – 10:15h		Coffee Break		
10:30-12:30h	<p align="center">Mesa 3</p> <p align="center">Métodos computacionais em inovação terapêutica</p> <p align="center">Marcelo Zaldini – UFPE Carlos Henrique Madeiros Castelletti - IPA Valdir de Queiroz Balbino – UFPE</p>		<p align="center">Mesa 4</p> <p align="center">Síntese e planejamento de fármacos</p> <p align="center">Flávio Emery - USP Grace Gosmann – UFRS Francisco Jaime Mendonça Junior – UEPB Ivan da Rocha Pita – UFPE</p>	
	12:30 - 14h Intervalo para almoço			
13- 14h Sessão de Pôster				
14-16h	<p align="center">Mesa 5</p> <p align="center">Avaliação farmacológica de produtos naturais</p> <p align="center">Lucindo José Quintans Junior – UFS Leonardo Rigoldi Bonjardim - UFS Gerlane Guerra - UFRN Luiz Alberto Lira Soares – UFPE</p>		<p align="center">Mesa 6</p> <p align="center">Biotecnologia farmacêutica</p> <p align="center">Eryvaldo Socrates Tabosa do Egito - UFRN Cláudio Gabriel Rodrigues - UFPE Nereide Stela Santos Magalhaes - UFPE Antonio Carlos de Freitas – UFPE</p>	
	16 - 16:15h Coffee Break			
16:15 - 17:30h	<p align="center">Mesa 7</p> <p align="center">Tecnologia farmacêutica e controle de qualidade</p> <p align="center">Armando Silva da Cunha Jr – UFMG Mônica Felts de la Roca Soares - UFPE Adriano Antunes de Souza Araujo – UFS José Lamartine Sobrinho – UFPE</p>		<p align="center">Mesa 8</p> <p align="center">Farmacocinética e toxicologia</p> <p align="center">Teresa Cristina Tavares Dalla Costa – UFRGS Bibiana Verlindo de Araújo - UFRGS Cláudio Gabriel Rodrigues – UFPE</p>	
	DIA 25/10/2013 – Sexta-feira (Dorisol Recife Grand Hotel)			
8 - 9:30h	<p align="center">Mesa 9</p> <p align="center">Patentes e Inovação Científica</p> <p align="center">Henry Suzuki - Diretor da Axonal Mário Gonçalves - Coordenador da área de Propriedade Intelectual da Whirlpool e Coordenador do Grupo de PI da ANPEI Celeste Emerick - Coordenadora da GESTEC/FIOCRUZ Armando Mendes - examinador de patentes do INPI/PB</p>		<p align="center">Mesa 10</p> <p align="center">Assistência farmacêutica</p> <p align="center">Mauro Silveira de Castro – UFRGS Marta Maria de França Fonteles – UFC Divaldo Pereira de Lyra Júnior – UFS Tatiane Almeida de Menezes – UFPE</p>	
	9:30 - 09:45h Coffee Break			
9:45 - 11h	<p align="center">Mesa 11</p> <p align="center">Gestão da educação e do trabalho em saúde</p> <p align="center">Mareni Farias Rocha – UFSC/UNASUS Tatiane Almeida de Menezes – UFPE Josiane Machiavelli - NUTES/UFPE Breno Caldas de Araújo - PPGIT/UFPE</p>		<p align="center">Mesa 12</p> <p align="center">Mecanismos de ação de fármacos</p> <p align="center">Luciana Pizzatti Barboza – INCA/RJ Sandra Helena Polisselli Farsky - USP Roger Chammas – USP Moacyr Jesus Barreto de Melo Rego – UFPE</p>	

11 - 12:30h	<p align="center">Mesa 13</p> <p align="center">Economia solidária das plantas medicinais</p> <p align="center">Vanessa Fernandes Vieira – UFC Fátima Agra – UFPB José de Arimateia Rocha Filho – SES-PE Douglas Carvalho Francisco Viana – UFPE Tiago Rafael de Sousa Nunes – UFPE</p>	<p align="center">Mesa 14</p> <p align="center">Genética e inovação terapêutica</p> <p align="center">Rafael Guimarães Maria Teresa Cartaxo Muniz – UIPE Antonio Carlos de Freitas – UFPE Maira Pitta – UFPE</p>
12:30-13:30h Intervalo para almoço		
13:30-15:30 Sessão de Pôster		
15:30 -17h	<p align="center">Mesa 15</p> <p align="center">Nanotecnologia farmacêutica</p> <p align="center">Sílvia Stanisçuaski Guterres – UFRGS Elisângela Mendonça - UEPB Adriana Raffin Pohlmann – UFRGS César Augusto Souza de Andrade – UFPE</p>	<p align="center">Mesa 16</p> <p align="center">Habitats de inovação e parques tecnológicos</p> <p align="center">Aline Figlioli – USP Jonathan Sapsed - Principal Research Fellow do CENTRIM/UK Alexandre Dias – USP</p>
17:15 - 19h	<p align="center">Diálogos entre saúde e desenvolvimento: a triplice hélice (governo, empresa e universidade)</p> <p align="center">Marcelino Granja – Secretário de Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco Markus Schneider – CEO da planta de vacinas da NOVARTIS Brasil Anísio Brasileiro de Freitas Dourado – Reitor da UFPE César Augusto Souza de Andrade – UFPE</p>	
19 – 22h Encerramento		

SUMÁRIO

Apresentação -----	09
Química Medicinal e Produtos Naturais -----	10
Tecnologia Farmacêutica e Biofarmácia -----	114
Controle de Qualidade de Insumos Farmacêuticos e Medicamentos -----	197
Biotecnologia Farmacêutica -----	226
Análises Toxicológicas, Farmacologia e Farmacogenômica -----	260
Alvos Terapêuticos e Biomarcadores -----	306
Assistência Farmacêutica e Avaliação da Qualidade em Saúde -----	361
Ciência, Tecnologia e Inovação em Saúde -----	364
Educação e Ensino em Saúde -----	439
Outros -----	445
Resumos premiados -----	529

APRESENTAÇÃO

Caro Congressista,

Neste 3º Encontro Brasileiro para Inovação Terapêutica trouxe como novidades a categoria de resumos expandidos e apresentações orais de trabalhos premiados.

Os trabalhos científicos foram avaliados por profissionais com elevada capacidade técnico-científica e experiência prática segundo os critérios de relevância, originalidade, clareza, qualidade dos métodos utilizados, coerência e qualidade dos resultados e conclusão, além de: qualidade e rigor metodológico; qualidade e clareza da redação do texto; e evidência científica gerada.

A produção científica que consta nestes Anais é um rico material para fomentar melhorias em seus locais de trabalho. Agradecemos e parabenizamos aos autores de todos os trabalhos encaminhados e desejamos um ótimo Congresso!

Boa leitura!

**Comissão Científica
3º EBIT**



3º Encontro Brasileiro
para Inovação Terapêutica

1 Workshop
Rede RISH
Rede de Inovação em Insumos
para Saúde Humana

II Workshop
Estabilidade de Fármacos
e Medicamentos

21 e 22/10/2013
Campus UFPE

23 a 25/10/2013
Dorisol Recife
Grand Hotel

Interligando competências científicas, tecnológicas e industriais em espaços de saúde

QUÍMICA MEDICINAL E PRODUTOS NATURAIS



ANÁLISE DO PERFIL FITOQUÍMICO DE *Senna angustifolia* VAHL (FABACEAE) POR CROMATOGRÁFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

¹W.F. LEÃO, ¹S. L. SILVA, ¹M.R.A. FERREIRA, ¹K.P. RANDAU, ¹L.A.L. SOARES

¹Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

Introdução: *Senna angustifolia* pertencente à família Fabaceae, está entre uma das espécies mais utilizadas pela população brasileira. É um pequeno arbusto que atinge 1 m de altura, conhecido como sene-de-tinnevelly ou sena-indiana e, se distribui em regiões tropicais e subtropicais do mundo. A presença de derivados fenólicos, principalmente compostos antraquinônicos é marcante nesta espécie. Neste contexto, foi realizada uma análise do perfil fitoquímico dos frutos de *S. angustifolia* a fim de identificar os principais metabólitos encontrados na espécie. **Métodos:** O perfil fitoquímico foi analisado por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), aplicando-se alíquotas (20 µL) do extrato metanólico em cromatoplaças (gel de sílica, F₂₅₄) empregando-se diversas fases móveis e reveladores adequados. **Resultados e Discussão:** A presença de polifenóis, antraquinonas e flavonoides, foram evidentes para a espécie, estando em concordância com dados da literatura para espécies do mesmo gênero. Também foram evidenciados terpenos, monoterpênicos e sesquiterpenos, açúcares (polissacarídeos) e cumarinas. Ainda de acordo com o perfil fitoquímico não foi verificada a presença de taninos e alcaloides. **Conclusão:** Os resultados obtidos neste trabalho contribuíram no processo de construção do perfil fitoquímico, identificando as principais classes de metabólitos secundários presentes nos frutos de *Senna angustifolia*, proporcionando uma fonte de informação atualizada da espécie.

Apoio: FACEPE, ANVISA

Palavras-chave: *Senna angustifolia*, Frutos, CCD, Perfil fitoquímico.



**ANALYSIS OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF *Crataevatapia* BARK
LECTIN AGAINST *Leishmania amazonensis*.**

**¹J.V. SANTANA; ²C.D.C. SILVA; ¹P.M.G. PAIVA; ¹L.C.B.B. COELHO;
²R.C.B.Q. FIGUEIREDO; ¹M.T.S. CORREIA; ¹M.G.C. CUNHA; ¹A.R. BORGES**

¹Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco/UFPE, Recife/PE.
jessica_viana20@hotmail.com

²Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ. Recife/PE.

Introduction: Cutaneous leishmaniasis, caused by *Leishmania amazonensis*, is an important diseases that affect about 12 million people around the world. Pentavalentantimonials are still the first choice drugs for treatment, despite their cardiac and renal toxicities. For these reasons, the search for new drugs against this illness is still needed. The lectinCrataBL has been previously shown to exhibit a number of interesting biological properties.**Methodology:**In the present study, we evaluated the effects of the CrataBLlectin on growth and ultrastructure of *L. amazonensis*. Parasites treated were followed daily. **Results and discussion:** The concentration that inhibits in 50% the promastigote growth was determined by regression analysis, andexhibited an inhibitory effect on promastigote growth in a dose- and time-dependent way, with IC₅₀ of 108,9µg/mL. Forultrastructural analysis, cellswere processed as routine for transmissionelectron microscopy.The incubation with IC₅₀ value did not cause considerable modifications on the parasite morphology. Whereas, cells treated with 2xIC₅₀ presented remarkable morphological changes such as mitochondrial swelling, accumulation of large electron-dense lipid droplets in the cytoplasm and rupture of plasma membrane with loss of cytoplasm content. These morphological changes were compatible with loss of cell viability and cell death.**Conclusion:** Our results showed that CrataBLlectin was biologically active against *L. amazonensis*.

Financiallysupported: CAPES; FACEPE

Keywords: *Leishmania amazonensis*, CrataBLlectin, *Crataevatapia*, Cutaneous leishmaniose.



ANATOMIA FOLIAR DE *Averrhoa carambola* L. (CARAMBOLEIRA)

¹A.L. VASCONCELOS, ¹A.V. SANTOS, B.M. NUNES, ¹L.A.L. SOARES, ¹K.P. RANDAU

¹Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Pernambuco.
alexluceav@hotmail.com

RESUMO

Pertencente à família Oxalidaceae, a caramboleira (*Averrhoa carambola* L.) é amplamente conhecida devido ao valor comercial de seus frutos além do uso popular de suas folhas no tratamento da hipertensão, anemia e diabetes. Observando-se a necessidade de estudos que auxiliem correta identificação desta espécie, o presente estudo tem o propósito de realizar a sua caracterização botânica. Cortes transversais e paradérmicos foram obtidos das folhas e corados com safranina e azul de astra.

INTRODUÇÃO

Constituída por sete gêneros e cerca de 950 espécies, a família Oxalidaceae encontra-se distribuída em regiões tropicais e subtropicais. Das duas espécies que constitui o gênero *Averrhoa*, a espécie *Averrhoa carambola* L. é amplamente conhecida devido ao valor comercial de seus frutos além de seu uso terapêutico (Avinash et al, 2012). A caramboleira, árvore frutífera originária da Índia, foi introduzida inicialmente no Brasil, no Estado de Pernambuco, no ano de 1817 trazida da França (Jorge, 2006). Esta espécie pode atingir até dez metros de altura, sem, contudo, apresentar copa muito fechada. Apresenta caule nodoso e tortuoso e seus ramos são numerosos e flexíveis. Os frutos possuem sabor agridoce e são ricos em vitamina C e em ácido oxálico (HUGLES, 1971). Suas folhas são usadas tradicionalmente na medicina popular com ação sedativa, anti-hipertensiva, antianêmica e antidiabética (Pio Correa, 1931; Gonçalves, 1998). Além disso, alguns estudos apontam potencial farmacológico com atividades antiulcerogênica, anti-inflamatória e bactericida (Goncalves, 2006; Sripanidkulchai, 2002).

OBJETIVOS

Diante disso, esse trabalho tem o objetivo de realizar a caracterização botânica de *Averrhoa carambola* L.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de folha de *Averrhoa carambola* foram coletadas na cidade do Recife (PE), para realização de cortes anatômicos para análise de suas características anatômicas. Foram

utilizados, portanto, dois a três indivíduos, dos quais foram obtidas secções transversais e paradérmicas. Estas foram submetidas ao processo de dupla coloração com safranina e azul de Astra e montadas em glicerina em lâminas semipermanentes (KRAUS, 1997). As análises foram realizadas em imagens obtidas através de microscópio óptico acoplado com câmera digital.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em vista paradérmica, observa-se epiderme constituída por células de paredes pouco espessas e poligonais, bem justapostas, em ambas as faces. O limbo é hipoestomático, com a presença estômatos do tipo paracítico distribuídos aleatoriamente. É possível observar a incidência de tricomas do tipo tector, simples, uniseriado, distribuídos em ambas as faces, porém com maior frequência relativa de distribuição na face abaxial. O corte transversal dos folíolos revela um mesófilo com organização dorsiventral recoberto por cutícula espessa. A epiderme é constituída por uma camada de células de contorno angular e justapostas, apresentando um maior volume na face adaxial em relação as da face abaxial. O parênquima paliçádico é constituído de células alongadas e relativamente estreitas, compostas de várias camadas sobrepostas e pouco definidas. O lacunoso é constituído de várias camadas de células irregulares, elípticas com diversos espaços intercelulares. A nervura central, ao nível do terço médio, apresenta secção plano convexa, sendo as duas faces da epiderme recobertas por cutícula espessa e irregular. Inserido no parênquima fundamental, encontra-se o feixe vascular colateral, em arco aberto, com fibras perivasculares circundando externamente o xilema e floema. Também é possível verificar a presença de inclusões do tipo drusas, associadas às células do parênquima fundamental nas proximidades dos vasos xilemáticos e da face adaxial. As características anatômicas encontradas nesta espécie coletada no estado de Pernambuco, corroboram os estudos de Jorge *et al.* (2006) ao analisar espécies do Estado de São Paulo, apontando algumas diferenças estruturais na organização do parênquima paliçádico e a presença mais intensa de inclusões prismáticas nas proximidades dos vasos lenhosos.

CONCLUSÕES

Diante do apresentado, observa-se a importância de estudos que contribuam com correta identificação botânica desta promissora espécie exótica, sendo este parâmetro essencial no controle qualidade da material prima vegetal a ser utilizada.

REFERÊNCIAS

- GONÇALVES, M. I. A.; MARTINS, D. T. O. Plantas medicinais usadas pela população do município de Santo Antônio de Leverger, Mato Grosso, Brasil. *Rev. Bras. Farm.*, Rio de Janeiro, v. 7, n. 3/4, p. 56-61, 1998.
- PIO CORREA, M. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1931. v. 2, p. 33.
- GONCALVES, S.T.; BARONI, S.; BERSANI-AMADO, F.A.; MELO G.; CORTES, D.A.G.; BERSANI-AMADO, C.A.; CUMAN, R.K.N. Preliminary Studies on Gastric

Antiulcerogenic Effects of *Averrhoa carambola* L. in Rats. Acta Farm. Bonaerense. 2006; 25(2):245-7.

SRIPANIDKULCHAI, B.; TATTAWASART, U.; LAUPATTARAKASEM, P.; WONGPANICH, V. Anti-inflammatory and Bactericidal Properties of elected Indigenous Medicinal Plants Used for Dysuria. Thai J. Pharm. Sci. 2002; 26 (1- 2):33- 38.

AVINASH, P.; SWAPNEEL, K.; DARSHANA, P.; ANITA P. A Comprehensive Review of An Important Medicinal Plant – *Averrhoa carambola* L. Pharmacognosy Communications. 2 (2): 13-17. 2012

KRAUS, J.E. & ARDUIN, M. 1997. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Editora da Universidade Rural, Rio de Janeiro.



APLICAÇÃO DE PLANEJAMENTO FATORIAL PARA PADRONIZAÇÃO DA SOLUÇÃO EXTRATIVA DE HIDROALCOÓLICA DE *Kalanchoe brasiliensis* Camb.

¹M.R.A. FERREIRA, ²L.L. MATOS, ²J.M. FERNANDES, ²S.M.Z. LANGASSNER, ¹L.A.L. SOARES

¹Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco. magda_nani@hotmail.com

²Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte

RESUMO

Kalanchoe brasiliensis Camb., conhecida popularmente como coirama, tem sido empregada no tratamento de úlcera gástrica e processos inflamatórios. Contra estas afecções, a folha é a parte mais utilizada por conter polissacarídeos, flavonoides e ácido ascórbico. O objetivo deste trabalho foi aplicar um planejamento fatorial para padronizar a solução extrativa de *K. brasiliensis*, avaliando a influência da concentração de álcool etílico e a proporção droga:solvente sobre a resposta do método. O método baseado na complexação de flavonoides-AlCl₃ foi utilizado para quantificar o teor de flavonoides totais na solução extrativa. As condições eleitas por determinarem uma maior resposta para a produção da solução extrativa foram: concentração do etanol 50% e a proporção droga: solvente de 1:1.

INTRODUÇÃO

Kalanchoe brasiliensis Camb., é uma espécie da família Crassulaceae, com ocorrência comum em regiões tropicais como o Brasil e África (ADENIKE; ERETAN, 2004). No Brasil, esta espécie ocorre desde a Bahia até São Paulo, predominantemente na zona litorânea. É popularmente conhecida como saião, coirama branca e folha grossa (LISBOA; FERREIRA; SILVA, 2006), sendo bastante utilizada na medicina tradicional.

Considerando o desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos, visando a obtenção de fitoterápicos com qualidade, é necessária a padronização de todo o processo. A padronização pode ser definida como o conjunto de medidas a ser aplicado no ciclo de transformação das matérias-primas com a finalidade do alcance da homogeneidade no lote e da manutenção desta entre os diversos lotes do mesmo produto fitoterápico (FARIAS, 2004).

Uma etapa importante na padronização de um medicamento de origem vegetal é a operação de extração. Normalmente são empregadas misturas de solventes, tais como:

etanol, metanol ou acetona com água, com o objetivo de aumentar o rendimento na extração de substâncias de interesse, baseando-se, principalmente, na sua solubilidade e estabilidade (VOIGT, 2006). Entretanto, quando não se sabe qual o grupo de substâncias é responsável pela atividade biológica, a escolha do solvente pode basear-se em estudos etnofarmacológicos e clínicos. Neste contexto, a investigação e quantificação de efeitos de fatores que possam atuar sobre os parâmetros extrativos permitem maximizar a qualidade e minimizar a variabilidade durante os processos (SOARES, 2003).

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi aplicar um planejamento fatorial a fim de padronizar a solução extrativa de *K. brasiliensis*, avaliando a influência da concentração de álcool etílico e a proporção droga:solvente sobre a resposta do método.

MATERIAIS E MÉTODOS

A matéria prima vegetal (folhas sem talos) foi processada por turbólise com álcool etílico 50% (v/v), na proporção 1:1. Este processo foi realizado em liquidificador industrial, e teve seu tempo controlado até total cisalhamento da matéria-prima vegetal. A solução extrativa foi filtrada à vácuo e em seguida envasada em frasco âmbar e mantida sob refrigeração até o momento das análises.

O teor de flavonoides totais foi determinado após diluição direta, utilizando como condições de reação, 2 mL de cloreto de alumínio (AlCl_3) a 5% e leitura de absorvância após 15 minutos de complexação, empregando a solução sem adição do (AlCl_3) como solução de compensação.

A influência da concentração de álcool etílico e a proporção droga:solvente sobre o teor de flavonoides totais em soluções extrativas das folhas de *K. brasiliensis*, foi estudada através de um desenho experimental do tipo 2^2 , adicionado de 3 pontos centrais e 4 pontos estrelas. Cada ponto foi realizado em triplicata. As variáveis naturais foram a proporção droga:solvente e a concentração de álcool etílico. A variável dependente estudada (resposta) foi a absorvância estabelecida após adição de solução de AlCl_3 . Os dados foram analisados estatisticamente através de ANOVA e análises dos efeitos (test-*t* e gráficos de paretos). Em seguida, um modelo matemático de segunda ordem foi ajustado aos resultados através do método dos mínimos quadrados com o auxílio do programa STATISTICA 6.0 (StatSoft, USA). A equação obtida foi usada para gerar superfície de resposta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O modelo matemático que explica a superfície de resposta gerada é expresso pela equação: $Y = 0,784 + 0,170 * P - 0,034 * P^2 + 0,131 * Et - 0,053 * Et^2 - 0,014 * P * Et$; onde: P = proporção droga:solvente; Et = concentração de etanol.

A análise estatística através de ANOVA, evidencia que ambos os fatores concentração de etanol e proporção droga:solvente exercem uma influência significativa sobre a variável resposta (Tabela 1). De acordo com os resultados obtidos, os termos

lineares concentração de etanol e proporção de droga:solvente foram importantes, mas a maior influência sobre a resposta do método foi conferida a variável proporção droga:solvente. Não foi constatada interação os fatores.

Tabela 1. ANOVA da avaliação da concentração do solvente e proporção droga:solvente sobre a resposta do método para a solução extrativa de *K. brasiliensis*.

Fonte de variação	F	p
Droga:Solvente (linear)	25,72463	0,001444
Droga:Solvente (quadrático)	0,92149	0,36906
Conc. Etanol (linear)	15,42519	0,005694
Conc. Etanol (quadrático)	2,22573	0,179358
Interação (T X A)	0,08143	0,783633

*Significativo para $\alpha = 0,05$.

Através do cálculo dos efeitos dos fatores e gráfico de paretos (Tabela 2), é possível estabelecer o tipo de contribuição de cada termo do modelo matemático. Considerando os termos significativos, apenas os termos lineares (concentração de etanol e proporção droga:solvente) são positivos. Portanto, com o aumento da proporção droga:solvente ocorre um aumento da absorvância lida. O mesmo ocorre para o fator concentração de solvente, sendo que em menor proporção.

Tabela 2. Análise dos efeitos dos fatores sobre a resposta do método para a solução extrativa.

	t (SE)
Média	0,784000*
Planta (linear)	0,339346*
Planta (quadrático)	-0,0688750
Etanol (linear)	0,26774*
Etanol (quadrático)	-0,107042
Interação (T X A)	-0,027000

CONCLUSÕES

Dessa forma, as condições eleitas por determinarem uma maior resposta para a produção da solução extrativa foram a concentração do etanol 50% e a proporção droga:solvente sendo 1:1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADENIKE, K.; ERETAN, O. B. Purification and partial characterization of a lectin from the fresh leaves of *Kalanchoe crenata* (Andr.) Haw. **Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 2, p. 229-233, 2004.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E.; STEHMANN, J. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, 2004, cap. 12, p. 263-286.

LISBOA, M. S.; FERREIRA, S. M.; SILVA, M. S. Uso de plantas medicinais para

tartar úlceras e gastrites pela comunidade do povoado vila capim, Município de Arapiraca-Al, Nordeste do Brasil. **Setientibus Série Ciências Biológicas** (Etnobiologia), v. 6, p. 13-20, 2006.

SOARES, L. A. L.; BASSANI, V. L.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; PETROVICK, P. R. Total flavonoid determination for the quality control of aqueous extracts from *Phyllanthus niruri* L. **Acta Pharmaceutica Bonaerense**, v. 22, n. 2, p. 203-207, 2003.

VOIGT, R. **Pharmazeutische Technologie**. 10. überarb. Aufl., Berlin: Ullstein Mosby, 2006.



ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO E FASES OBTIDAS POR PARTIÇÃO DE *SCHINOPSIS BRASILIENSIS* (ANACARDIACEAE)

¹S.R.G. LIMA-SARAIVA, ²J.C. SILVA, ²L.A.R.O. MACÊDO, ²A.C.S. DANTAS, ³A.G.M.PACHECO, ²L.M.A. GOMES, ²G.R. SOUZA, ²R.G.O.OLIVEIRA-JÚNIOR, ²H.C.C. SARAIVA, ¹E.L.C. AMORIM, ²J.R.G.S. ALMEIDA

¹ Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco. sarahrgl@hotmail.com

² Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Medicinais, Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF);

³ Laboratório de Fitoquímica, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)

Introdução: *Schinopsis brasiliensis* é uma árvore pertencente à família Anacardiaceae popularmente conhecida como baraúna, têm sido utilizada na medicina popular como anti-séptico natural no tratamento de feridas e micoses. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana do extrato etanólico bruto de *S.brasiliensis* (Sb-EtOH) e frações obtidas por partição com solventes em ordem crescente de polaridade: hexano (Sb-Hex), clorofórmio (Sb-CHCl₃) e acetato de etila (Sb-AcOEt) mediante exposição a nove cepas bacterianas, distribuídas em Gram-negativas e Gram-positivas. **Métodos:** atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo através da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). Os ensaios foram realizados em triplicata. **Resultados:** com relação à CIM, Sb-EtOH e as frações Sb-AcOEt e Sb-CHCl₃ inibiram o crescimento bacteriano em todos os microrganismos testados, em concentrações que variaram entre 12,5 e 0,39 mg/mL. Entretanto, a fração Sb-Hex não demonstrou ação bacteriostática e bactericida contra os microrganismos *E. coli*, *E. fecalis*, *P. aeruginosa* e *S. entérica*. **Conclusão:** Sb-EtOH e as frações Sb-AcOEt e Sb-CHCl₃ apresentam atividade antibacteriana, principalmente relacionada à inibição do crescimento. Além disso, a fração Sb-AcOEt demonstrou maior atividade frente às cepas, provavelmente por ter maior concentração de compostos com atividade antibacteriana, tais como taninos e flavonoides.

Apoio: CNPq, FACEPE.

Palavras-chave: Atividade antibacteriana, *Schinopsis brasiliensis*, Anacardiaceae.



ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS BRUTOS DE *Psidium guajava* L. FRENTE A LEVEDURAS DE *Candida* spp. ISOLADAS DA CAVIDADE BUCAL DE TRANSPLANTADOS RENAIIS

¹M.R.A. FERREIRA, ²R.R. SANTIAGO, ³M.G.I. FARIA, ⁴E.P. MILAN, ⁵G.M. CHAVES, ⁶J.C.P. MELO, ³T.I.E. SVIDZINSKI, ¹L.A.L. SOARES

¹Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco. magda_nani@hotmail.com

²Laboratório de Sistemas Dispersos, Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte

³Laboratório de Micologia, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

⁴Hospital Giselda Trigueiro, Departamento de Infectologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

⁵Laboratório de Micologia Médica e Molecular, Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

⁶Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá.

RESUMO

Em pacientes com o sistema imune comprometido, a candidíase bucal manifesta-se principalmente devido ao tratamento com imunossupressores. Os produtos naturais atuam como novos agentes antifúngicos, inserindo-se a *P. guajava*, espécie que possui relatos em relação à atividade antimicrobiana. O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antifúngica de extratos brutos (EB) frente a leveduras isoladas da cavidade bucal de pacientes transplantados renais. Os EBs liofilizados foram avaliados frente a 91 isolados clínicos e a CIM foi determinada segundo o CLSI com adaptações, sendo também determinadas a CIM₅₀ e CIM₉₀. Os resultados sugerem que melhor atividade foi observada para o EB obtido a partir da mistura acetona:água (7:3), frente aos isolados clínicos de *C. não albicans*.

INTRODUÇÃO

Candidíase bucal é uma infecção oportunista que tem início com a proliferação das leveduras comensais endógenas que habitam a cavidade bucal. O tecido bucal é a principal porta de entrada para vários micro organismos, incluindo *Candida* spp. Em indivíduos saudáveis, as defesas imunológicas limitam a proliferação de micro organismos patogênicos; porém, sob determinadas condições, podem assumir a forma patogênica, principalmente em indivíduos imunossuprimidos (KADIR et al., 2007; SHIP et al., 2007).

O imunossupressor deprime a célula, significando maior risco de infecção bucal e associação a outras complicações. Em imunossuprimidos, como pacientes transplantados, os patógenos bucais são mais propensos a destruição local e as infecções oportunistas aparecem, devido à incapacidade do sistema imune em suprimir e destruir tais patógenos (PARISI; GLICK, 2003; LOPEZ-PINTOR et al., 2010).

O aumento do número de infecções fúngicas criou uma necessidade por novos agentes antifúngicos, uma vez que, diversas drogas utilizadas (fluconazol, cetoconazol, nistatina, anfotericina-B e 5-fluorocitosina) podem interferir em alguns fatores de virulência, além de muitas destas moléculas apresentarem limitações (estrito espectro de ação e toxicidade) (ARAÚJO et al., 2005).

Neste contexto, produtos de origem vegetal atuam como uma importante e promissora fonte para a descoberta de novos agentes antifúngicos (ISHIDA et al., 2006). Uma vez que, estes produtos têm sido usados tradicionalmente no controle de diversas doenças, por serem fontes de compostos ativos que possuem múltiplas propriedades terapêuticas, além de fazerem parte de modelos de síntese de vários produtos farmacêuticos (COS et al., 2006).

OBJETIVOS

Nesse sentido, objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de extratos vegetais de *P. guajava*, espécie vegetal de importância terapêutica e econômica para região Nordeste do Brasil, frente a isolados clínicos provenientes da cavidade bucal de pacientes transplantados renais.

MATERIAIS E MÉTODOS

As folhas de *P. guajava* (goiabeira) foram coletadas e identificadas no Herbário UFRN (Universidade Federal do Rio Grande do Norte), sob número de tombamento 8214. As soluções extrativas foram obtidas por turbólise (20 min), na proporção 10% (p/v), utilizando como solventes água e a mistura acetona:água (7:3, v/v). Em seguida, as soluções foram filtradas e aquelas que continham a mistura foram concentradas em rotaevaporador para eliminação do solvente orgânico. Por fim, os extratos foram congelados com e submetidos à liofilização para obtenção dos Extratos Brutos (EB).

Para avaliação da atividade antifúngica *in vitro* foram utilizados isolados clínicos oriundos da cavidade bucal de pacientes transplantados renais, coletados nas regiões de Maringá – PR e Natal – RN.

Os testes de susceptibilidade de *Candida* spp. foram realizados de acordo com o método de microdiluição em caldo, preconizado pelo CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute), com adaptações para produtos naturais (CLSI, 2003; DALBEN DOTA et al., 2010; DAMKE et al., 2011).

As concentrações dos EBs variaram de 1,95 a 1000 µg/mL. Para cada isolado foram inclusos controle negativo (apenas RPMI) e controle positivo (RPMI com

inóculo). As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 h. As leituras foram realizadas após o período de incubação, observando-se o crescimento nas respectivas diluições através de comparação visual por reflexão em espelho.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi considerada a menor concentração de extrato bruto capaz de inibir 100% do crescimento de cada cepa, tomando como referência o respectivo controle positivo. Além disso, os resultados obtidos das CIMs foram analisados de acordo com: o intervalo de valores que representam o maior e o menor limite das CIMs; e, a CIM₅₀ e CIM₉₀.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Candida albicans é considerada o comensal evidenciado com maior frequência na microbiota normal da boca, atingindo até 70% do total de isolamentos (QUEIROZ-TELLES et al., 2002; DAMKE et al., 2011). Entretanto, espécies consideradas patogênicas como *C. krusei* e *C. tropicalis*, entre outras, têm sido detectadas em casos de candidíase bucal, principalmente naqueles relacionados à imunossupressão (LYNCH, 1994).

O emprego de isolados clínicos provenientes de pacientes predispostos ao desenvolvimento de infecções fúngicas, tem sido uma das principais estratégias para a investigação de potenciais novos agentes antifúngicos (ALMEIDA et al., 2009; DALBEN-DOTA et al., 2010).

O EB aquoso apresentou CIM na faixa de concentração de 3,9 a 1000 $\mu\text{g/mL}$, quando observado os isolados de *C. albicans*. Quanto aos isolados de *Candida* não *albicans*, apresentou menores valores de CIM, na faixa entre 3,9-250 $\mu\text{g/mL}$ para o EB do tipo acetona:água (7:3); em entre 3,9 a 500 $\mu\text{g/mL}$ para o EB do tipo aquoso.

Os valores de CIM₉₀ foram iguais entre os isolados, entretanto diferentes para os tipos de extrato, sendo igual a 250 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato do tipo acetona:água (7:3) e 500 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato aquoso; já em relação a CIM₅₀ o menor valor observado foi em relação ao extrato acetona:água (7:3), igual a 31,25 $\mu\text{g/mL}$.

Duarte e colaboradores (2005) propuseram uma classificação para a atividade inibitória de extratos vegetais com base na CIM: CIM < 500 $\mu\text{g/mL}$ representa forte inibição, CIM entre 600 e 1500 $\mu\text{g/mL}$ inibição moderada e CIM > 1500 $\mu\text{g/mL}$ inibição fraca.

De acordo com esta classificação e com os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ obtidos para os isolados clínicos de *C. albicans* e *C. não albicans*, os extratos brutos das três espécies vegetais deste estudo demonstraram uma forte atividade inibitória.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que melhor atividade foi observada para o extrato bruto de goiabeira obtido a partir da mistura acetona:água (7:3), e que esta atividade se torna mais pronunciada frente aos isolados clínicos de *C. não albicans*.

Assim, mais estudos são necessários para isolar o(s) princípio(s) ativo(s) e purificar frações ou componentes da espécie *P. guajava*, seguidos de novos testes de susceptibilidade, a fim de buscar novas alternativas de drogas antifúngicas disponíveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, L. M.; SOUZA, E. A.; BIANCHIN, D. B.; SVIDZINSKI, T. I. In vitro response of cutaneous mycosis fungal agents to the most widely used systemic antifungals in dermatology. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 84, n. 3, p. 249-55, 2009.
- ARAÚJO, I. B.; DAMASCENO, B. P. L. G.; DE MEDEIROS, T. M. D.; SOARES, L. A. L.; DO EGITO, E. S. T. Decrease in Fungizone™ toxicity induced by the use of Lipofundin™ as a diluent: an *in vitro* study. **Current Drug Delivery**, v. 2, n. 2, p. 199-205, 2005.
- Clinical Laboratory Standard Institute: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeasts: approved standard M27-A2. CLSI, Wayne, PA, USA; 2003.
- COS, P.; VLIETINCK, A. J.; BERGHE, D. V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 290–302, 2006.
- DALBEN-DOTA, K. F.; FARIA, M. G.; BRUSCHI, M. L.; PELLOSO, S. M.; LOPES-CONSOLARO, M.E.; SVIDZINSKI, T. I. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from vaginal exudates. **Journal Alternative and Complementary Medicine**, v. 16, n. 3, p. 285-90, 2010.
- DAMKE, E.; TSUZUKI, J. K.; CORTEZ, D. A. G.; FERREIRA, I. C. P.; BERTONI, T. A.; BATISTA, M. R.; DONATI, L.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. In vivo activity of *Sapindus saponaria* against azole-susceptible and -resistant human vaginal *Candida* species. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, p. 35, 2011.
- DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, M.; SARTORATO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELINA, C. Anti-Candida Activity Of Brazilian Medicinal Plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305-311, 2005.
- ISHIDA, K.; MELLO, J. C. P.; CORTEZ, D. A. G.; DIAS FILHO, B. P.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, p. 942–49, 2006.
- KADIR, T.; GÜMRÜ, B.; UYGUN-CAN, B. Phospholipase activity of *Candida albicans* isolates from patients with denture stomatitis: the influence of chlorhexidine

gluconate on phospholipase production. **Archives of Oral Biology**, v.52, n. 7, p. 691-696, 2007.

LOPEZ-PINTOR, R. M.; HERNANDEZ, G.; DE ARRIBA, L.; DE ANDRES, A. Comparison of oral lesion prevalence in renal transplant patients under immunosuppressive therapy and healthy controls. **Oral Diseases**, v. 16, p. 9–95, 2010.

LYNCH, D. P. Oral candidiasis: history, classification and clinical presentation. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 78, p. 189-193, 1994.

PARISI, E.; GLICK, M. Immune suppression and considerations for dental care. **Dental Clinics of North America**, n. 47, p. 709–731, 2003.

QUEIROZ-TELLES, F.; SILVA, N.; CARVALHO, M. M.; ALCÂNTARA, A. P.; DA MATTA, D.; BARBERINO, M. G.; BARTCZAK, S.; COLOMBO, A. L. Evaluation of efficacy and safety of itraconazole oral solution for the treatment of oropharyngeal candidiasis in AIDS patients. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 5, p. 60-66, 2002.

SHIP, J. A.; VISSINK, A.; CHALLACOMBE, S. J. Use of prophylactic antifungals in the immunocompromised host. **Oral Surgery Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 103, n. 1, p. S6.e-1-S6.e14, 2007.



ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO FRUTO DE *CAESALPINIA PYRAMIDALIS* TULL. FRENTE A CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* MRSA MULTIRRESISTENTES

¹C.F.S. SIMÕES, ¹I. V. ALMEIDA, ¹D.C.A. BATISTA, ¹A.M. SARAIVA, ²H. S. XAVIER, ¹N. CAETANO

¹ Laboratório de Análises Microbiológicas, Depto. de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco. charles.fernandes.s.s@gmail.com

² Laboratório de Farmacognosia, Depto. de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco.

Introdução: O estudo dos *Staphylococcus aureus* deve-se a seus fatores de resistência, que acabam culminando em processos infecciosos e em graves problemas para saúde. A *Caesalpinia pyramidalis* Tull. é uma árvore endêmica no sertão Nordeste, popularmente conhecida por “Catingueira” usada para tratar infecções. Objetivou-se avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos metanólico e acetato de etila do fruto de *C. pyramidalis* (CFM e CFA). **Metodologia:** Os CFM e CFA foram secos por rota-
evaporação e em seguida solubilizados em DMSO a 50%. Os ensaios de ambos realizaram-se pela técnica de poços/difusão em agar (PDA), nas concentrações de 10 e 5 mg/poço, e por determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI), nas concentrações de 0,031 a 2 mg/mL. As cepas ensaiadas foram 19, sendo 2 ATCC, 2 MSSA e 15 multirresistentes. O antibiótico padrão para as técnicas foi a tetraciclina 30 µg/poço para PDA e 0,062 a 64 µg/mL para CMI. **Resultados:** Os halos nas concentrações de 10 e 5 mg/poço, e CMI obtidos para CFM foram respectivamente, de 20 mm/18 mm e 2000 µg/mL, 23 mm/20 mm e 2000 µg/mL e para CFA de 14 mm/12 mm e 0,125 µg/mL, 18 mm/(-) mm e 0,25 µg/mL, frente as cepas AM594 e AM103, respectivamente. Para o padrão os halos foram da ordem 11 mm frente a AM594 e 28 mm frente a AM103. **Conclusões:** Os resultados nos revelam boas atividades frente às cepas multirresistentes de *S. aureus*, o que justifica prosseguir com maiores estudos para o fracionamento e/ou obtenção dos ativos isolados.

Apoio: UFPE.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, *Caesalpinia pyramidalis*, Fruto, Atividade antimicrobiana.



ATIVIDADE CITOTOXICA E LEISHMANICIDA DE DERIVADOS DE TIOSSEMICARBAZONA

¹A. C. SILVA, ¹T. A. R. SANTOS, ²D. R. M. MOREIRA, ²A. C. L. LEITE, ¹V. R. A. PEREIRA

¹Laboratório de Imunogenética, Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.
aline.caroline.bm@gmail.com

²Laboratório de Síntese de Fármacos, Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Pernambuco

RESUMO

A leishmaniose é uma infecção causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. Atualmente não existe vacina disponível para infecções por *Leishmania* e os tratamentos convencionais são tóxicos para os pacientes. Por esse motivo, o desenvolvimento de novas drogas leishmanicidas é uma necessidade urgente. No presente trabalho foi avaliada a citotoxicidade em macrófagos peritoniais e a atividade sobre *Leishmania amazonensis* de novos derivados de tiossemicarbazonas. A partir dos valores de CC_{50} em macrófagos e IC_{50} nos parasitas foi determinada a seletividade dos compostos. Os dados mostram que todos os compostos inibiram o crescimento de formas promastigotas e amastigotas além de apresentarem baixa citotoxicidade em macrófagos peritoniais.

INTRODUÇÃO

As Leishmanioses são causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, que possuem um amplo espectro de formas clínicas: cutânea, mucocutânea e visceral. São transmitidas por flebotomíneos e estão presentes em cerca de 88 países, com cerca de 1 a 2 milhões de novos casos registrados a cada ano (WHO, 2010). A *L. amazonensis*, alvo do presente trabalho, é uma das espécies causadoras da forma cutânea da doença. Dentre as medidas tomadas como controle para o combate da doença estão: controle de vetores e animais reservatórios, diagnóstico precoce e tratamento adequado dos casos humanos. O tratamento atual é feito com Glucantime, utilizado há mais 70 anos, e vem sendo relatados casos de resistência dos parasitas e toxicidade, havendo a necessidade da descoberta de novos princípios ativos. Dentro deste contexto estão inseridos os derivados de tiossemicarbazonas, que apresentam um amplo perfil farmacológico e constituem importante classe de compostos sintéticos cujas propriedades têm sido bastante estudadas (GREENBAUM et al., 2004; HASHIMOTO, 2008). As tiossemicarbazonas são conhecidas por sua atividade contra tripanossomatídeos, tendo como alvo a enzima cruzaina, que desempenha importantes funções, como virulência, manutenção da viabilidade e a modulação da resposta imune,

constituindo assim um possível alvo para drogas no tratamento das leishmanioses (MOTTRAM et al., 2004). Tendo em vista que ainda não existem compostos que atuem com mais seletividade sobre o parasita causador da leishmaniose, estudos sobre novos agentes terapêuticos continuam a ser bastante relevantes sob o ponto de vista da saúde pública. Neste trabalho avaliamos a atividade leishmanicida e a citotoxicidade de novos compostos derivados da estrutura da tiossemicarbazona.

OBJETIVOS

Avaliar a citotoxicidade e macrófagos murinos de novos compostos derivados da estrutura de tiossemicarbazona, determinando a CC_{50} (concentração capaz de inibir 50% da cultura).

Avaliar a atividade leishmanicida contra as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis* de novos compostos derivados da estrutura de tiossemicarbazona, determinando a IC_{50} (concentração capaz de inibir 50% o crescimento dos parasitas).

MATERIAIS E MÉTODOS

Os compostos testados, provenientes do Laboratório de Síntese de Fármacos (LABSINFA) da UFPE, foram solubilizados em DMSO e posteriormente no meio de cultura adequado para cada ensaio. Macrófagos peritoneais murinos foram coletados de camundongos BALB/c machos para utilização nos ensaios de citotoxicidade e para obtenção de amastigotas intracelulares. Para os ensaios de citotoxicidade, os macrófagos foram cultivados em placa de 96 poços, em meio RPMI completo, e na presença de diferentes concentrações dos compostos (1-100 $\mu\text{g/mL}$), por 48h, em estufa de CO_2 , a 37°C . Após a incubação, foi adicionado MTT (5mg/mL em PBS), seguido de nova incubação, por 3h. Foi acrescentado DMSO para dissolução dos cristais de formazan e a absorbância foi lida a 540nm. A partir dos valores de inibição da cultura, foi calculada CC_{50} . Promastigotas de *L. amazonensis*, mantidas em meio Schneider's completo, foram incubadas com os compostos testes (0,19 -100 $\mu\text{g/mL}$), por 96h, a 27°C . Após isso, foi realizada a contagem em câmara de Neubauer. A partir dos valores de inibição do crescimento dos parasitas, foi calculada IC_{50} . Os compostos com melhores valores de CC_{50} e IC_{50} foram avaliados frente a amastigotas intracelulares. Macrófagos foram aderidos em lamínulas de vidro, infectados por 5h, lavados e tratados por 24h nas concentrações de 6,25, 12,5 e 25 $\mu\text{g/mL}$ dos compostos. As lamínulas foram coletadas e coradas com kit Panótico rápido e coladas em lâminas. As amastigotas foram contadas e foi determinada a IC_{50} . A Anfotericina B foi utilizada como controle positivo nos ensaios. Para a determinação dos valores de CC_{50} e IC_{50} foi utilizado o programas GraphPad Prism 5. A partir desses valores, foi determinado o índice de seletividade (ISe) dos compostos pelos parasitas pela razão CC_{50}/IC_{50} .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao todo foram testados 13 compostos derivados da estrutura das tiossemicarbazonas. Foi observada variação na atividade frente aos macrófagos. Todos os compostos avaliados apresentaram maior toxicidade aos parasitas quando

comparados aos macrófagos murinos, tendo valores de IC₅₀ menores que os valores de CC₅₀, e ISe sempre maiores que 1. Alguns compostos não apresentaram toxicidade aos macrófagos em nenhuma das concentrações testadas, sendo considerada CC₅₀ >100 µg/mL. Os valores de CC₅₀ variaram entre 123,7 e 333,2 µM para a TS27 e TS02, respectivamente. Todos os compostos foram capazes de inibir o crescimento das formas promastigotas, com valores de IC₅₀ entre 3,5 e 87,5 µM (Tabela 1). A presença de metóxil (TS09) e dicloro (TS15) reduziram os valores de IC₅₀, enquanto que os compostos com a substituição por flúor (TS10), difenil (TS22) e fenil (TS02) mostraram-se menos eficaz contra o parasita.

Tabela 1 - Efeito das Tiossemicarbazonas sobre o crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* e macrófagos peritoniais.

COMPOSTOS	µM		
	CC ₅₀	IC ₅₀	ISe _{PRO}
TS01	163,1	6,0	27,13
TS02	>333,2	12,5	ND
TS09	155,5	3,5	44,96
TS10	154,4	87,5	1,76
TS11	>312,4	4,9	ND
TS12	>274,7	4,8	ND
TS15	>284	3,6	ND
TS16	>292,2	13,5	ND
TS22	>276,1	17,7	ND
TS23	143,6	11,1	12,91
TS27	123,7	4,7	26,06
TS28	>258,4	5,0	ND
TS29	>289,7	10,2	ND
Anfotericina B	8,1	1,1	7,5

ND: Não determinado porque as concentrações utilizadas para o ensaio não apresentaram toxicidade

Como a forma amastigota é a que está presente no hospedeiro vertebrado, ensaios sobre essa forma foram realizados. Sete compostos que apresentaram menos toxicidade e elevada atividade contra promastigotas foram selecionados para ensaios em amastigotas. Os compostos avaliados apresentaram menores valores de IC₅₀ em promastigotas que em amastigotas intracelulares, demonstrando assim maior efetividade

contra a primeira. Os valores de IC₅₀ para as amastigotas variaram entre 18,3 μ M e 37 μ M (Tabela 2). Os compostos que possuem halogênios como substituintes foram os que se apresentaram mais efetivos contra o parasita. A Anfotericina B, droga de referência que foi utilizada nos ensaios como controle positivo, apresentou-se bastante efetiva contra a cepa de *Leishmania amazonensis* utilizada nos ensaios.

Tabela 2 - Efeito das Tiossemicarbazonas sobre formas amastigotas de *L. amazonensis* e macrófagos peritoniais.

COMPOSTOS	μ M		
	CC ₅₀	IC ₅₀	ISe _{AMA}
TS01	163,1	33,0	3,64
TS02	>333,2	37,8	ND
TS09	155,5	34,3	3,95
TS10	154,4	25,1	4,67
TS11	>312,4	40,3	ND
TS12	>274,7	18,3	ND
TS15	>284	34,8	ND
Anfotericina B	8,1	0,23	34,09

ND: Não determinado porque as concentrações utilizadas para o ensaio não apresentaram toxicidade

CONCLUSÕES

- Os índices de seletividade encontrados para os compostos analisados demonstraram a baixa toxicidade para macrófagos peritoniais, com elevada seletividade para o parasita;
- Todos os compostos analisados apresentaram atividade contra promastigotas de *L. amazonensis*, inibindo o crescimento da cultura *in vitro*;
- Todos os compostos analisados reduziram o índice e o percentual de infecção de amastigotas intracelulares de *L. amazonensis in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GREENBAUM, D. C et al. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Parasitocidal Thiosemicarbazone Cysteine Protease Inhibitors against *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, and *Trypanosoma cruzi*. **Journal of medicinal chemistry**, Washington, v.47, p. 3212-3219, 2004.

- HASHIMOTO, Y. Thalidomide as a Multi-Template for Development of Biologically Active Compounds. **Archiv der pharmazie**, Weinheim, v. 341, p. 536–547, 2008.

- MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H.; ALEXANDER, J. Cysteine peptidases as virulence factors of Leishmania. **Current Opinion in Microbiology**, New York, v. 7, p.375 - 381, 2004.

- WHO. **Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases**. Geneva, 2010.



AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICOS DO FRUTO E CASCA DE *Libidibia ferrea* Martius (JUCÁ)

¹A.O. ARRUDA, ¹M.A.M. GALVÃO, ^{1,2}M.R.A. FERREIRA, ^{1,2}K.P. RANDAU, ^{1,2}L.A.L. SOARES

¹Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

²Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

RESUMO

Para obtenção de medicamentos fitoterápicos seguros e eficazes, é primordial que seja realizado o acompanhamento de todas as etapas de desenvolvimento e produção, desde a coleta do material até a disponibilidade do produto final. Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar os parâmetros de qualidade físico-químicos do fruto e casca de *Libidibia ferrea*. Dessa forma, os ensaios foram realizados de acordo com os métodos gerais em Farmacognosia, preconizados pela Farmacopeia Brasileira 5. Os resultados classificaram os materiais como pó moderadamente grosso; o teor de cinzas totais foi de 0,1003 (casca) e 0,155 (fruto); o percentual de matéria estranha não ultrapassou 1%; teor de umidade igual a 11,25% (casca) e 14% (fruto); teor de extrativo foi aproximadamente 1%; pH < 5,0 e IE < 100.

INTRODUÇÃO

As espécies vegetais constituem uma importante fonte de princípios ativos utilizados para a produção de medicamentos. Nesse contexto, tanto os investimentos na pesquisa e produção de fitoterápicos quanto o emprego terapêutico de espécies vegetais vêm crescendo cada vez mais com o passar dos anos (OMS, 2000).

Devido à necessidade de se produzir um medicamento fitoterápico seguro e eficaz, faz-se necessário a análise de alguns aspectos da matéria prima vegetal. Para isso, foram estabelecidos parâmetros físico-químicos a serem analisados para garantir a qualidade da matéria prima vegetal. No entanto, ainda há uma escassez de monografias e estudos a respeito dessas especificações de qualidade para matérias primas de diversas espécies vegetais, como é o caso da *Libidibia ferrea* Martius.

Libidibia ferrea Martius (Fabaceae), é popularmente conhecida como jucá ou pau-ferro, sendo comumente encontrada no Nordeste brasileiro (MAIA, 2004; PIO, 1984). É utilizada na medicina popular, pois apresenta diversas propriedades

farmacológicas, algumas já descritas na literatura. Dentre as atividades descritas estão: cicatrizante, antidiarreica, tratamento de diabetes e prevenção do câncer, atribuídas à casca (FRASSON; BITTENCOURT; HEINZMANN, 2003; CAVALHEIRO et al., 2009; VASCONCELOS et al., 2011). Apesar de ser muito utilizada pela população ainda não possui especificações de qualidade descritas em compêndios oficiais, fazendo-se necessário a realização de testes físico-químicos para a comprovação da qualidade desta matéria prima vegetal.

OBJETIVOS

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar os parâmetros de qualidade físico-químicos do fruto e casca de *Libidibia ferrea*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção e Preparação do Material Vegetal

A matéria prima vegetal foi coletada no Instituto Agronômico de Pesquisa Agropecuária (IPA) da cidade de Caruaru-PE e a exsicata depositada no herbário do IPA. Após a coleta e estocagem, o material vegetal foi levado para secagem em estufa e posteriormente moído em moinho de facas.

Caracterização físico-química

Para a caracterização do controle de qualidade físico-químico foram empregados Métodos Gerais em Farmacognosia preconizados pela Farmacopeia Brasileira 5 (FB5, 2010): determinação de material estranho (realizado por quarteamento); determinação do tamanho de partícula, através de análise granulométrica, utilizando tamises com abertura de malha entre 850 e 90 μm , e, os dados obtidos foram analisados por métodos gráficos como o histograma de distribuição e a curvas de retenção e passagem para determinação do diâmetro médio das partículas; determinação de perda por dessecação (utilizando o método gravimétrico e método de balança de infravermelho); determinação do teor de cinzas totais; teste de afrogenicidade; determinação do teor de extrativos, e análise de pH após obtenção da solução extrativa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A determinação de matéria estranha determina a presença de contaminantes como insetos e impurezas. A casca e o fruto apresentaram um percentual de $0,25\% \pm 0,0014$ e $0,08\% \pm 0,00394$, respectivamente.

A distribuição granulométrica é um fator determinante na homogeneidade das partículas pulverizadas e reprodutibilidade do estudo. A casca e o fruto moído apresentou granulometria de 565,0 e 565,7 μm respectivamente, e foram classificadas como pós moderadamente grosso.

A perda por dessecação expressa o percentual de umidade residual na matéria prima vegetal. O fruto apresentou percentual de 14% e a casca $11,25\% \pm 0,191$, não ultrapassando o limite estabelecido (8-14%) pela Farmacopeia Brasileira 5 (FB5, 2010).

O teor de cinzas totais estabelece a quantidade de impurezas inorgânicas não voláteis presentes na matéria prima vegetal. Os resultados foram de $5,16\% \pm 0,00157$ (fruto) e $3,34\% \pm 0,0032$ (casca). Ambos se mostraram dentro dos limites estabelecidos na Farmacopeia Brasileira para outras espécies vegetais.

O teste de afrogenicidade indica a presença de saponinas no material, e através dele é possível realizar uma análise semi-quantitativa pela espuma. Entretanto, foi determinada a ausência de saponinas, tanto no fruto quanto na casca, uma vez que o índice de espuma obtido foi menor que 100.

O teor de extrativos indica a presença de compostos hidrossolúveis presentes no material vegetal, como aminoácidos, açúcares, heterosídeos flavonoídicos e mucilagens (BARNI et al., 2009). Os valores obtidos foram de $1,37\% \pm 0,053$ e $0,856\% \pm 0,016$, para o fruto e casca, respectivamente. Após a obtenção da solução extrativa para análise descrita anteriormente, foram mensurados os valores de pH das mesmas, apresentando valores médios de 3,3 e 4,79, para o fruto e a casca respectivamente.

CONCLUSÃO

Através do estudo foram avaliados os parâmetros físico-químicos que devem ser considerados para confirmar a qualidade e autenticidade do fruto e casca de *Libidibia ferrea*. É importante destacar a necessidade do estabelecimento de normas para o controle da qualidade da espécie, a fim de que seja utilizada com segurança para a finalidade proposta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAVALHEIRO, M. G.; FARIAS, D. F.; FERNANDES, G. S.; NUNES, E. P.; CAVALCANTI, F. S.; VASCONCELOS, I. M.; MELO, V. M. M.; CARVALHO, A. F. U. Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 586-591, 2009.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5ª. ed. Brasília: Anvisa, 2010.

FRASSON, A. P. Z.; BITTENCOURT, C. F.; HEINZMANN, B. M. Caracterização físico-química e biológica do caule de *Caesalpinia ferrea* Mart. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, V.13, n.1, p. 35-39, 2003.

MAIA, G. N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo: D&Z Computação Gráfica, Leitura & Arte, 2004.

OMS. Organização Mundial da Saúde, **Regulamentação dos medicamentos**: um

esboço mundial. Washington: OPAS; 62. 2000.

PIO, C. M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, p. 490-492, 1984.

VASCONCELOS, C. F. B., MARANHÃO, H. M. L., BATISTA, T.M., CARNEIRO, E. M., FERREIRA, F., COSTA, J., SOARES, L.A.L., SÁ, M. D. C., SOUZA, T.P., WANDERLEY, A. G. Hypoglycaemic activity and molecular mechanisms of *Caesalpinia ferrea* Martius bark extract on streptozotocin induced diabetes in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 1533-1541, 2011.



AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SECAGEM DE FOLHAS DE *Passiflora Edulis* Sims, EM SECADOR CONVECTIVO DE LEITO FIXO, SOBRE O RENDIMENTO DE FLAVONÓIDES TOTAIS

¹A.R. OLIVEIRA, ¹T.G.J. SILVA, ²J.V.M. RODRIGUES, ²B.F. FÉLIX, ²J.R.T.L. MARTINS, ^{*}C.O. PACHÚ

¹Laboratório de Planejamento em Química Medicinal, Departamento de Ciência Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco. arsenio3000@hotmail.com

²Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba

RESUMO

Avaliou-se a secagem de folhas de *Passiflora edulis* Sims, espécie pertencente a RENISUS. O objetivo foi demonstrar o efeito da secagem sobre o rendimento de flavonoides contidos nas folhas desta planta. Foram desenvolvidos estudos de secagem e extração de flavonóides, sendo suas determinações importantes do ponto de vista da obtenção de produtos fitoterápicos de qualidade. As secagens foram realizadas seguindo planejamento experimental, variando tempo e temperatura de secagem, e tendo com resposta o rendimento de flavonóides totais. Os resultados obtidos evidenciaram que as variáveis estudadas influenciaram nas respostas com significância estatística. Concluiu-se que a temperatura e o tempo mostram influência sobre o rendimento de flavonóides sendo recomendada a realização de estudos semelhantes para as diversas espécies de plantas utilizadas com fins medicinais.

INTRODUÇÃO

Segundo a Legislação Brasileira, fitoterápicos são medicamentos obtidos empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais. Estão caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade ^[1,2].

Frente ao crescente uso de plantas com fins terapêuticos, nota-se uma preocupação com a qualidade da matéria-prima, tendo em vista que podem ocorrer variações em parâmetros essenciais. Diante disto, é muito importante conhecer a origem geográfica, as condições de cultivo, o estágio do desenvolvimento, a colheita, a secagem e o armazenamento do produto ^[3].

A secagem é uma antiga operação unitária bastante utilizada no processamento de plantas medicinais, tendo em vista a necessária redução do teor de água logo após a colheita, inibindo atividades enzimáticas e microbianas, facilitando no armazenamento e transporte ^[1,3].

Entretanto, se mal conduzida, a secagem poderá prejudicar a qualidade da matéria-prima vegetal. Para impedir isso deve-se considerar os limites de temperatura, a velocidade do ar e o tempo em que o material estará exposto ao processo, sendo estes pontos críticos e com total influência sobre os resultados finais do produto a ser seco ^[4]. Isso leva a uma preocupação dos profissionais que atuam na indústria em minimizar estes efeitos nocivos a matéria-prima vegetal, sendo necessários, estudos científicos

para determinar o melhor método entre as diversas condições de secagem.

Por se tratar de uma espécie cultivada no Semiárido Nordestino e pertencente a RENISUS, a *Passiflora edulis* Sims (espécie de maracujá mais cultivada no Brasil e no mundo) apresenta a facilidade de ter como marcador químico os flavonóides (de fácil quantificação) e por isso foi escolhida para a realização deste estudo.

OBJETIVO

Realizar um estudo do processo de secagem, em secador convectivo de leito fixo, de folhas da *Passiflora edulis* Sims e seus efeitos na extração e no rendimento de flavonóides totais, de modo a se determinar as melhores condições de operação, visando o desenvolvimento de tecnologias adequadas para o processamento das plantas medicinais e a obtenção de produtos fitoterápicos.

MATERIAIS E METODOS

As amostras de *Passiflora edulis* Sims, identificada com N° 901 pelo Herbário Arruda Câmara – UEPB, foram coletadas em Lagoa Seca – PB no período da manhã. As coletas se procederam nos dias de realização das secagens, sendo escolhida como massa inicial para cada amostra 50g de folhas frescas.

Os ensaios de secagem foram realizados seguindo planejamento experimental, utilizando matriz $2^2 + 3$ repetições do ponto central, tendo como variáveis controladas, tempo e temperatura de secagem, e variável de resposta, rendimento de flavonóides totais.

As secagens foram desenvolvidas em secador convectivo de leito fixo, onde as folhas eram acondicionadas em tamizes permitindo a vazão do ar aquecido. Após o tempo de processamento estabelecido, foi determinada a massa final de cada amostra.

As folhas secas foram pesadas e transferidas para recipientes fechados nos quais adicionou-se etanol 70%, na proporção de volume (mL) igual a 8 vezes o peso da amostra. Aguardou o período de 10 dias com proteção da luz e em seguida os extratos hidroalcoólicos foram filtrados.

Nesses extratos foi efetuada a quantificação da fração total de flavonóides. Este doseamento foi realizado através de espectrofotometria UV-Vis na frequência de 425nm utilizando $AlCl_3$ e obteve-se a curva de calibração com padrões de quercetina sendo encontrada a equação da curva $y=0,0635x+0,004$ com $R^2=0,9996$.

Para o doseamento das amostras tomou-se 14,3mL do extrato e diluiu para 25mL com água. Desta solução foram retirados 10mL e aferido o volume para 25mL com etanol 40%. Desta última solução foram transferidas duas alíquotas de 2,5mL para balões volumétricos 25mL. Um teve seu volume completado com etanol 40% e foi lido como branco e ao outro acrescentou-se 2mL de $AlCl_3$ 0,5% e o volume foi completado com etanol 40%. As amostras foram lidas 30 min. após a adição $AlCl_3$ [5].

A análise dos dados foi feita utilizando o *Software Statistica 7.0*.

RESULTADOS

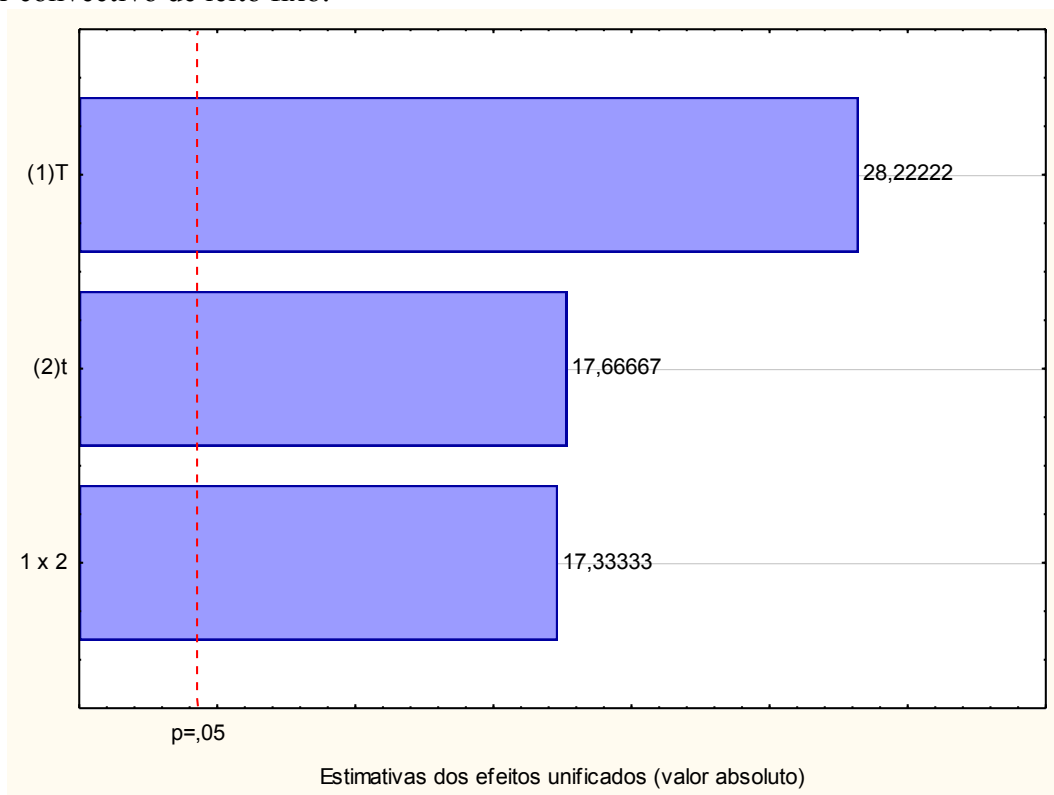
Após processadas as amostras de folhas de *Passiflora edulis* Sims foram pesadas sendo encontrado uma maior redução da massa para as amostras que passaram por processo nos limites superiores de tempo e temperatura, com uma redução de 50,94% em relação a massa inicial. Este resultado mostra-se de acordo com Martinazzo *et al.*

(2010) em estudo de secagem de folhas de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, onde concluiu que o tempo de secagem reduziu de forma mais expressiva com o aumento da temperatura [6].

O extrato obtido com a amostra processada com maior tempo e temperatura de secagem apresentou-se 117,7 vezes mais concentrado que o extrato produzido com a planta *in natura*, com uma concentração de flavonóides totais igual a 174,49 $\mu\text{g/mL}$. Este valor foi superior ao encontrado para os demais extratos.

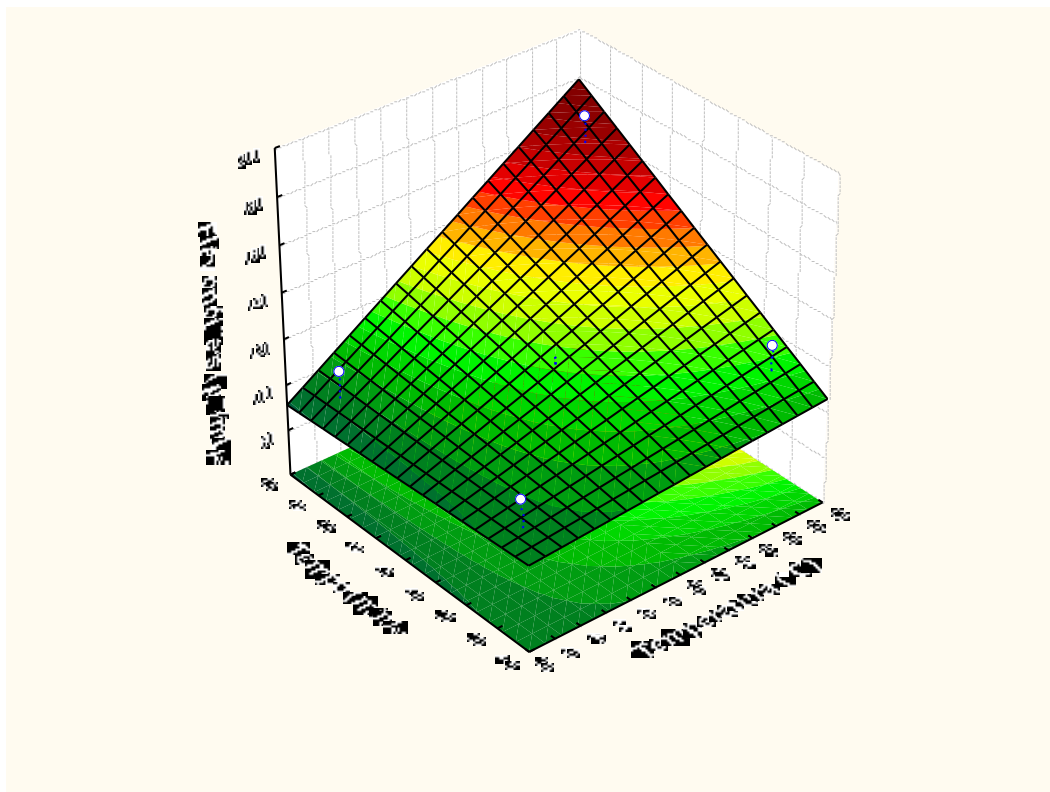
A significância dos efeitos ao nível de confiança de 95% ($p < 0,05$) pode ser melhor visualizada pelo gráfico de Pareto representado na Figura 01. Constata-se que a temperatura e o tempo de secagem são significativos na modelagem em secador convectivo de leito fixo. Outro fator importante é a existência de interação entre as duas variáveis com o mesmo intervalo de confiança.

Figura 01 – Gráfico de Pareto, indicando os valores dos efeitos padronizados em secador convectivo de leito fixo.



Esta análise pode ser confirmada pela superfície de resposta (Figura 02), que mostra o nível ótimo para cada variável, apresentando um valor mais alto de resposta para o experimento desenvolvido com limites superiores das variáveis de entrada e maior quantificação de flavonóides totais. (Figura 02).

Figura 2 – Influência da temperatura (°C) e do tempo (min.) sobre o teor de flavonóides totais, em secador convectivo de leito fixo.



O aumento no teor de flavonóides observado, atende ao objetivo do trabalho que é de proporcionar uma melhora na extração de princípios ativos de plantas medicinais no tocante a flavonóides, composto analisado.

CONCLUSÃO

No presente estudo foi comprovado que a temperatura e o tempo de secagem mostram grandes influências sobre o rendimento de substâncias presentes na composição das folhas de *Passiflora edulis* Sims. Com a elevação da temperatura e do tempo que as folhas foram submetidas, obteve-se maior concentração dos flavonóides e maior redução da massa da amostra processada.

Recomendam-se cuidados especiais no controle da temperatura do processo de secagem das plantas medicinais, pois a maioria dos princípios ativos, entre eles os flavonóides, são termossensíveis, sendo necessário estudos mais detalhados, visando assegurar o rendimento e a composição química adequadas dos extratos vegetais, como também a preservação das atividades biológicas após processamento.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Iniciação Científica CNPq/UEPB pela bolsa disponibilizada, e ao Laboratório de Transferência em Meios Porosos e Sistemas Particulados da Unidade Acadêmica de Engenharia Química – UFCG por ter permitido o uso do secador convectivo de leito fixo nele existente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] FIALHO, G. J. D. *et al.* Efeito da Secagem da *Menta x piperita* L. (Hortelã-pimenta) sobre o rendimento de flavonóides e polifenóis totais. *BioFar.* 06(2): 60 – 73, 2011.
- [2] VIEIRA, S.C.H. *et al.* Levantamento de fitoterápicos manipulados em farmácias magistrais de Dourados - MS. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 20(1):28-34, 2010.
- [3] PIMENTEL, F. A. *et al.* Influência da secagem sobre o rendimento e composição química dos compostos voláteis das raízes de *Piper piscatorum* Tres. & Yunck. (Piperaceae). *Química Nova* 35(4): 715 – 718, 2012.
- [4] PRATES, M. de O. *et al.* Controle da Temperatura e Velocidade do Ar de Secagem em um Secador de Plantas Mediciniais. *Revista Engenharia na Agricultura.* 19(2): 101 – 111, 2011.
- [5] PACHÚ, C. O. Processamento de plantas medicinais para obtenção de extratos secos e líquidos. Campina Grande: Universidade Federal de Campina Grande. **Tese** (Doutorado em Engenharia de Processos). 2007.
- [6] MARTINAZZO, A. P. *et al.* Modelagem matemática e parâmetros qualitativos da secagem de folhas de capim-limão [*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf]. *Rev. Bras. Pl. Med.* 12(4): 488 – 498, 2010.



AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE COMPOSTOS TIAZÓIS ACETILPIRIDINICOS SOBRE CÉLULAS DA LINHAGEM HT29 E ESPLENÓCITOS

¹T. A. R. SANTOS, ¹A. C. SILVA, ²E. B. SILVA, ²A. C. L. LEITE, ¹V. R. A. PEREIRA

¹Laboratório de Imunogenética, Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.
thiago.andre@cpqam.fiocruz.br

²Laboratório de Síntese de Fármacos, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco

RESUMO

O câncer continua sendo uma das principais causas de morte em todo o mundo, tendo sido a causa de 7,6 milhões de mortes em 2008, o que representa 13% de todas as mortes. A química medicinal tem contribuído desde a criação dos primeiros medicamentos desenvolvidos para o câncer, e continua trazendo novas alternativas e potenciais candidatos a fármacos antitumorais. O desenvolvimento de pequenas moléculas com atividade biológica é importante, pois proporciona novas alternativas ao tratamento do câncer. Neste trabalho, foram avaliados novos compostos tiazóis acetilpiridínicos frente à linhagem tumoral HT29 e células de esplenócitos. Os compostos analisados apresentaram inibição da linhagem tumoral, sendo que um deles mostrou-se mais tóxico para esta linhagem tumoral que para os esplenócitos.

INTRODUÇÃO

O câncer continua sendo uma das principais causas de morte em todo o mundo, tendo sido a causa de 7,6 milhões de mortes em 2008, o que representa 13% de todas as mortes (WHO, 2013). As estimativas para o Brasil, válidas para o ano de 2013, apontam para a ocorrência de aproximadamente 518.510 novos casos de câncer. Os tipos mais incidentes são os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, mama, colo do útero, cólon e reto, estômago e glândula tireoide. Mesmo com grandes esforços por parte de órgãos públicos e privados, o caráter generalizado, severo e muitas vezes letal do câncer persiste, com apenas melhorias elementares no tratamento (KAMB et al., 2007). A química medicinal tem contribuído desde a criação dos primeiros medicamentos desenvolvidos para o câncer, e continua trazendo novas alternativas e potenciais candidatos a fármacos antitumorais. Dentro dessa perspectiva, diversos grupamentos químicos tem chamado a atenção pelo amplo espectro de atividades biológicas associadas. Essas moléculas são potenciais compostos base para a criação de novas moléculas biologicamente ativas, mesmo que suas atividades biológicas incluam efeitos favoráveis e desfavoráveis (HASHIMOTO, 2008). Tiazóis são frequentemente

encontrados em vários compostos com potente atividade biológica, como sulfatiazol (antimicrobiano), ritonavir (antiviral), além de ser um motivo estrutural comumente encontrado em agentes anticâncer, como bleomicina, tiazofurina e desatinib (KASHYAP et al., 2011; SCHADE et al., 2008; ZHENG et al., 2013). O desenvolvimento de pequenas moléculas com atividade biológica, além do aprimoramento de outros meios de tratamento, é importante, pois proporciona novas alternativas ao tratamento do câncer.

OBJETIVOS

Avaliar a atividade antitumoral de novos compostos tiazóis acetilpiridínicos sobre a linhagem tumoral HT29 *in vitro*, determinando a concentração citotóxica para 50% da cultura (CC_{50HT29}).

Avaliar a atividade citotóxica de novos compostos tiazóis acetilpiridínicos sobre esplenócitos murinos, determinando a concentração citotóxica para 50% da cultura (CC_{50ESP}).

MATERIAIS E MÉTODOS

Os compostos avaliados foram obtidos através de colaboração com o Laboratório de Síntese de Fármacos (LABSINFA) do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os compostos tiazóis acetilpiridínicos avaliados neste trabalho foram codificados como AT1, AT2, AT3, AT4, AT6 e AT9. Os esplenócitos murinos foram obtidos de camundongos BALB/c machos. A linhagem HT29 é proveniente de um adenocarcinoma colorretal humano. As células HT29 foram cultivadas em meio DMEM completo, a 37 °C, com 5% de CO₂. Para o ensaio de citotoxicidade, os esplenócitos foram incubados com os compostos (100, 50, 25, 10, 5 e 1 µg/ml), ou com meio de cultura apenas e com timidina tritiada (³H-timidina) (1 µCi/poço) durante 24 h em estufa de CO₂ a 37°C. Após a incubação foi realizada coleta em papel de fibra de vidro e a incorporação de timidina tritiada pelas células foi determinada através de contador beta de cintilação. A partir da inibição da proliferação dos esplenócitos, comparando-se ao controle sem tratamento, foi determinada a CC_{50ESP}. Para avaliação do efeito citotóxico dos compostos sobre as células tumorais foi empregado o ensaio de MTT, onde as células foram incubadas em placas de cultura de 96 poços em estufa a 5% de CO₂, 37°C, 24h. Diferentes concentrações dos compostos (100, 50, 25, 10, 5 e 1 µg/ml) foram adicionadas, sendo incubadas durante 72h. Também foram utilizados poços controles, apenas com meio de cultura. Após esse período, foi adicionado MTT (5 mg/mL, em PBS), incubando-se por 2h, sendo acrescentado DMSO para a dissolução dos cristais formazan, seguido da leitura da absorbância a 540nm, sendo determinada a CC_{50HT29}. Os valores de CC₅₀ foram determinados por análise de regressão pelo software GraphPad Prism.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 mostra a estrutura dos compostos e seus radicais substituintes. Os resultados de CC_{50} variaram bastante entre os compostos analisados, para ambos os tipos de células utilizados. Os valores de CC_{50ESP} variaram entre 19,21 μM e 51,77 μM (Tabela 1). O composto AT1, que constitui a molécula original, não substituída, apresentou-se como o mais tóxico para esplenócitos, com o menor valor de CC_{50ESP} , de 19,21 μM . Já o composto AT2, que possui substituição por NO_2 , foi o que apresentou menor toxicidade sobre os esplenócitos, com valor de CC_{50ESP} de 51,77 μM . Nos ensaios com a linhagem tumoral HT29 também foi observada variações quanto à atividade dos compostos. Os valores variaram entre 25,22 μM e 108,25 μM (Tabela 1). O composto AT3, com substituição por metoxil, foi o que se apresentou menos efetivo contra as células tumorais, com valor de CC_{50HT29} de 108,25 μM . Já o composto AT9, que possui flúor em sua substituição, pode ser considerado o mais efetivo, pois seu valor de CC_{50HT29} , de 25,22 μM , foi menor que o apresentado para os esplenócitos. Um menor valor de CC_{50} para a linhagem tumoral que para células saudáveis é desejável, visto que pode refletir numa menor toxicidade para modelos *in vivo* (HAMBLEY, 2009).

Figura 1- Estrutura básica dos tiazóis acetilpiridínicos e suas substituições.

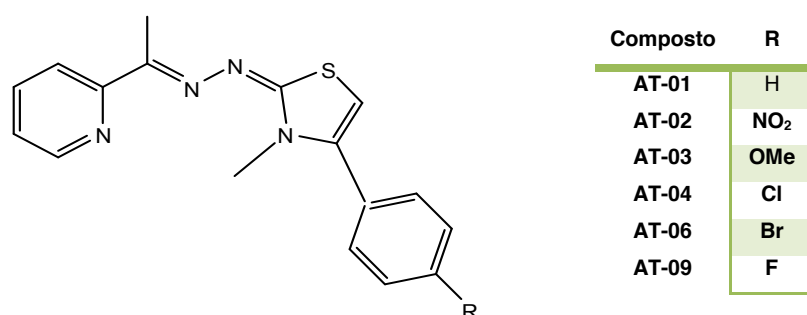


Tabela 1 – Valores de CC_{50} dos Tiazóis acetilpiridínicos sobre esplenócitos murinos e sobre a linhagem tumoral HT29

Tiazóis acetilpiridínicos	CC_{50ESP} (μM)	CC_{50HT29} (μM)
AT1	19,21	57,83
AT2	51,77	65,62
AT3	21,33	108,25
AT4	28,29	78,87
AT6	37,55	51,29
AT9	34,87	25,22

CONCLUSÕES

Os compostos tiazóis acetilpiridínicos apresentaram toxicidade variada sobre células esplênicas e sobre a linhagem tumoral HT29;

O composto AT9 apresentou boa atividade antitumoral, com menor valor de CC_{50} para a linhagem tumoral testada que para as células esplênicas, o que poderia refletir numa menor toxicidade para modelos *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- HAMBLEY, T. W. Is anticancer drug development heading in the right direction? **Cancer research**, v. 69, n. 4, p. 1259–62, fev. 2009.
- HASHIMOTO Y. Thalidomide as a multi-template for development of biologically active compounds. **Archiv der pharmazie**. Weinheim, v. 341, p.536-547, 2008.
- KAMB, A.; WEE, S.; LENGAUER, C. Why is cancer drug discovery so difficult? **NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY**, v. 6, n. February, p. 115–120, 2007.
- KASHYAP, S. J. et al. Thiazoles: having diverse biological activities. *Med Chem Res* (2012) 21:2123–2132.
- SCHADE, A. E. *et al.* Dasatinib, a small-molecule protein tyrosine kinase inhibitor, inhibits T-cell activation and proliferation. **Blood**, v. 111, n. 3, p. 1366–77, 1 fev. 2008.
- ZHENG, S. *et al.* Discovery of a Series of Thiazole Derivatives as Novel Inhibitors of Metastatic Cancer Cell Migration and Invasion. **ACS medicinal chemistry letters**, v. 4, n. 2, p. 191–196, 14 fev. 2013.
- WHO. Cancer [NMH fact sheet], Geneva, 2013. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> >. Acesso em: 03 out 2013.



CARACTERIZAÇÃO DO DERIVADO TIAZACRIDÍNICO LPSF/AA-8 ATRAVÉS DA TÉCNICA DE LC-MS

¹J. F. BRANCO JÚNIOR, ²M. G. R. PITTA, ¹I. R. PITTA, ¹M. R. GALDINO-PITTA

¹Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino, Universidade Federal de Pernambuco. jeannjr@hotmail.com

²Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino, Universidade Federal de Pernambuco.

RESUMO

Os derivados acridínicos são moléculas antineoplásicas classificadas como intercalantes do DNA devido a formação de ligações cruzadas entre os pares de base, o que dificulta o afastamento da dupla hélice e acarreta na inibição da divisão celular. Cada derivado acridínico possui um substituinte estrutural diferente, conferindo-lhes uma atividade citotóxica singular. Com isso, muitos estudos estão sendo realizados para desvendar a relação estrutura-atividade destes fármacos, visando diminuir os efeitos colaterais e aumentar a eficácia do tratamento do câncer. Com base nisto, o presente estudo caracterizou estruturalmente o derivado LPSF/AA-8 utilizando as técnicas de Espectrometria de Massa e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, obtendo assim o +MS, o +MS2 e o cromatograma da molécula.

INTRODUÇÃO

O câncer consiste em um grupo de doenças nas quais há a perda do controle da proliferação e redução da diferenciação celular, podendo afetar qualquer linhagem de células e atingir tecidos e órgãos distantes do ponto de origem. De acordo com o INCA, estima-se que haja aproximadamente 518.510 novos casos no período 2012/2013, podendo ser considerado um problema de saúde pública¹. O tratamento para este grupo de doenças pode ser feito através de radioterapia, quimioterapia ou cirurgia, sendo a quimioterapia a forma mais eficaz de se tratar as neoplasias malignas². Entretanto, apesar dos quimioterápicos disponíveis no mercado apresentarem boa atividade antineoplásica, estes são muito tóxicos, causando inúmeros efeitos colaterais. Desta forma, se faz necessário o desenvolvimento de novos fármacos anticâncer que sejam mais específicos, seguros e eficazes³.

A utilização de derivados acridínicos pode representar uma nova abordagem terapêutica devido a sua baixa toxicidade e alta eficiência. Estudo realizado por GALDINO-PITTA et al, 2013 comprovou que o intercalante de DNA 3-Acridin-9-imetil-5-(4-metanosulfonil-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/AA-8) apresentou

uma atividade citotóxica acima de 64% em relação a linhagem HCT-8 (carcinoma de colo), sendo considerada de atividade moderada⁴. Desta forma, caracterizar estruturalmente o produto através da utilização das técnicas de Cromatografia Líquida de alta Eficiência (CLAE) e Espectrometria de Massa (MS) se torna essencial para entender a relação estrutura-atividade do fármaco e comprovar a pureza da amostra.

OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo caracterizar e elucidar estruturalmente a molécula derivada da acridina, LPSF/AA-8, através da utilização das técnicas de espectrometria de massa (EM) e Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

MATERIAIS E MÉTODOS

Para caracterização do derivado acridínico 3-Acridin-9-ilmetil-5-(4-metanosulfonil-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-8), realizada na Central Analítica do Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT SG), foi utilizada a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC LC-20AT) acoplada ao Espectrômetro de Massa (ESI-MS(n) HCTultra). Para análise foi pesada uma alíquota de 0,34mg da amostra na balança analítica (shimadzu AUW 220D) sendo preparada uma solução estoque à $10,54 \cdot 10^{-4}$ M, utilizando acetonitrila grau LC-MS Chrosmasolv (Sigma Aldrich) como solvente. Uma nova diluição foi realizada obtendo-se uma concentração de $10,43 \cdot 10^{-6}$ M. Esta solução foi transferida para o vaio com conseguinte injeção no LC-MS. A fase móvel "A" foi composta por acetonitrila grau LC-MS Chrosmasolv, sendo a fase móvel B constituída por uma solução de metanol/0,1% de ácido fórmico. O volume de injeção foi de 20µL, utilizando um fluxo de injeção de 0.2 mL/min e temperatura do forno de 35°C. A corrida foi realizada em 6 min distribuídos da seguinte forma: 0.0 min-5 min 60% de B e 5 min-6 min 80% de B. A análise por espectrometria de massa transcorreu no modo positivo, utilizando-se gás 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 - 600 m/z. O gás nitrogênio foi utilizado como gás nebulizador à uma pressão de 10 psi.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da realização da CLAE foram observados dois picos no cromatograma, onde o primeiro corresponde ao produto LPSF/AA-8, com tempo de retenção de 2.7 min, e o segundo pico corresponde a um composto com relação *m/z* de 383, com tempo de retenção de 3.3 min. Em relação ao espectro de massas foi possível identificar o padrão de fragmentação do LPSF/AA-8 através do +MS2, onde os seguintes picos *m/z* foram detectados: o (M+H) 474.9 relativo ao íon molecular LPSF/AA-8 (PM=474); o 234.5, contendo a porção acridínica da molécula com CH₂ e o 395.7, referente a porção acridínica e tiazolidínica inteira, com a perda apenas do substituinte benzilidênico - SO₂CH₃.

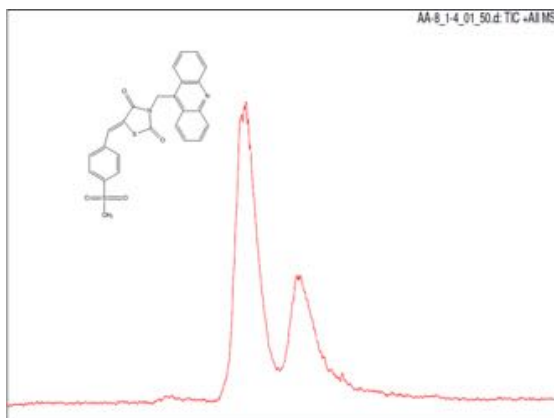


Figura 1: Cromatogram do LPSF/AA-8. O primeiro pico corresponde ao produto LPSF/AA-8 de $m/z = 474.9$ com tempo de retenção de 2.7 min e o segundo pico corresponde ao produto de $m/z = 383$ com tempo de retenção de 3.3 min..

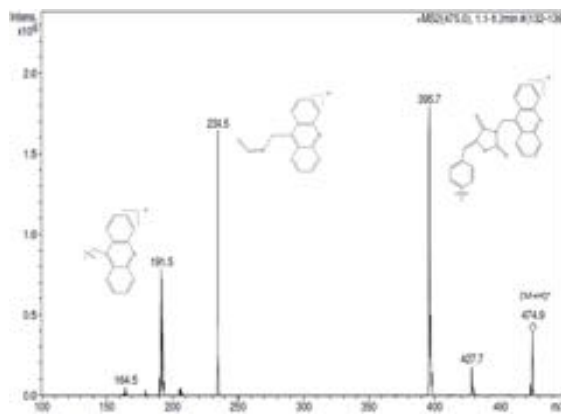


Figura 2: Espectro de Massas por IES (modo positivo) do LPSF/AA8 (M = 474). Identificação dos Fragmentos de massa 191.5, 234.5 e 395.7.

CONCLUSÕES

Com a utilização da técnica de espectrometria de massa foi possível identificar e comprovar a estrutura química do composto LPSF/AA-8 através do seu padrão de fragmentação no modo +MS2, além de identificar o grau de pureza da amostra por meio da técnica de Cromatografia Líquida de Alta eficiência.

AGRADECIMENTOS

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT-if), ao Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF) e ao Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT SG).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Instituto Nacional do Cancer. Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012>>. Acesso em: 09 out. 2013.
2. Almeida, V. L.; Leitão, A.; Reina, L. C. B.; Montanari, C. A.; Donnici, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**. v28, p.118-129, 2005.
3. Barros, F. W. A.; Silva, T. G.; Galdino-Pitta, M. R.; Bezerra, D. P.; Costa-Lotufo, L. V.; Moraes, M. O.; Pessoa, C.; Moura, M. A. F. B.; Abreu, F. C.; Lima, M. C. A.; Galdino, S. L.; Pitta, I. R.; Goulart, M. O. F. Synthesis and cytotoxic activity of new acridine-thiazolidine derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v20, p.3533–3539, 2012.
4. 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**. v28, p.2421-2429, 2013.



**CARACTERIZAÇÃO FARMACOBOTÂNICA DA FOLHA E CAULE DE
Caesalpinia echinata Lam. (FABACEAE)**

**¹C.M.B. SILVA, ¹M.G.M.MACÊDO, ¹R.S.SILVA, ¹M.B.NASCIMENTO,
¹K.P.RANAU**

¹Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêutica, UFPE.
camilabarros.farma@gmail.com

Introdução: *Caesalpinia echinata* Lam., conhecida popularmente como pau-brasil, é uma árvore da família Fabaceae. Dados da literatura relatam que a planta possui propriedades medicinais, sendo o lenho adstringente, odontálgico e tônico. Outras espécies de *Caesalpinia* têm sido descritas por apresentarem ações medicinais. Realizou-se a caracterização botânica das folhas e caule de *Caesalpinia echinata*.

Métodos: Cortes semipermanentes de secções paradérmicos e transversais foram realizados a mão livre das folhas e do caule de *C. echinata* adquirida em Recife. Foram corados com safranina 1% e as imagens capturadas por microscópio óptico, acoplado a câmara digital.

Resultados e Discussão: Em secção paradérmica, a epiderme apresentou-se com formatos poligonais irregulares e estômatos do tipo anomocítico, apenas na face abaxial. Observou-se, em secção transversal da folha, tricomas tectores multicelulares, mesófilo dorsiventral e feixes vasculares colaterais envoltos por bainha esclerenquimática. A nervura central apresentou-se biconvexa e levemente proeminente na face abaxial. Na secção transversal do caule foram observadas todas as estruturas de crescimento primário. E a presença do parênquima medular um tecido de reserva.

Conclusão: As estruturas anatômicas observadas servem para caracterização de *Caesalpinia echinata* e parâmetros para a diferenciação das demais espécies do gênero *Caesalpinia*.

Palavras-chave: *Caesalpinia echinata*, Farmacobotânica, Pau-brasil.



CARACTERIZAÇÃO FARMACOBOTÂNICA DO PECÍOLO E DAS FOLHAS DE *Momordica charantia* L.

¹R.D. SÁ, ^{1,2}L.A.L. SOARES, ^{1,2}K.P. RANDAU

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFPE. dsa.rafaela@gmail.com

²Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, CCB, UFPE

RESUMO

Momordica charantia L. é uma trepadeira pertencente à família Cucurbitaceae e conhecida no Brasil principalmente por melão-de-São-Caetano. Na medicina popular, é empregada no controle da glicemia e no tratamento de lesões cutâneas. Esta pesquisa teve por objetivo analisar os caracteres anatômicos do pecíolo e das folhas dessa espécie, a fim de contribuir para o controle de qualidade farmacognóstico do vegetal. Foi evidenciada a presença de tricomas tectores e glandulares unisseriados e pluricelulares e tricomas glandulares pedunculares no pecíolo e na folha. O pecíolo apresenta-se poligonal, com feixes bicolaterais e drusas no tecido parenquimático. As folhas são dorsiventrais, com feixe bicolateral e também apresentando drusas no parênquima.

INTRODUÇÃO

Cucurbitaceae é considerada uma das principais famílias de plantas utilizadas para a produção de alimentos, fibras e fitoterápicos (MONTES-HERNANDEZ; EGUIARTE, 2002; CARDOSO, 2003). *Momordica charantia* L. é um dos seus principais representantes, conhecida popularmente por melão-de-São-Caetano. Trata-se de uma trepadeira originária da Ásia e África, que se adaptou facilmente ao clima tropical do Brasil (ALZUGARAY; ALZUGARAY, 1983). É uma planta daninha, comumente encontrada cobrindo cercas e em terrenos baldios (LORENZI, 2000). As folhas são recortadas e as flores têm coloração amarela. O fruto é uma cápsula carnosa, que se abre em três partes quando maduro, deixando à mostra suas sementes que apresentam massa vermelha (LIMA et al., 2006).

A espécie é usada tradicionalmente na medicina caseira em vários países para o tratamento de doenças das mucosas e da pele, como antidiabético e anti-hiperglicêmico (LIMA et al., 2006), e também como carminativo, emenagogo, no tratamento de cólicas, e como antiviral, anti-helmíntico e antimicrobiano (GROVER; YADAV, 2004).

Vários estudos farmacológicos realizados com *M. charantia* comprovam importantes atividades, como hipoglicemiante (SHIH et al., 2009), antimicrobiana (BRACA et al., 2008) e larvicida (LING et al., 2009).

Devido ao seu amplo uso e interesse medicinal, *M. charantia* é uma das 71 espécies vegetais presentes na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), divulgada pelo Governo Brasileiro em 2009 (BRASIL, 2009).

Considerando que o conhecimento das características microscópicas são fundamentais para a padronização de plantas utilizadas como medicamentos, esse trabalho foi desenvolvido com o objetivo de realizar a caracterização anatômica do pecíolo e lâmina foliar de *M. charantia*.

OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo descrever os principais caracteres anatômicos do pecíolo e lâmina foliar de *M. charantia*, a fim de subsidiar sua identificação e contribuir para o controle de qualidade da espécie.

MATERIAIS E MÉTODOS

O material vegetal foi coletado na Cidade Universitária, em Recife-PE, Brasil.

Foram realizados cortes em secções transversais na região mediana do pecíolo e lâmina foliar de material fresco, à mão livre, usando lâmina comum de barbear e, como material de suporte, medula do pecíolo de embaúba (*Cecropia* sp.). As secções foram clarificadas com solução de hipoclorito de sódio a 50% e coradas com safranina e azul de astra (JOHANSEN, 1940).

Posteriormente, foram confeccionadas lâminas histológicas semipermanentes contendo as secções transversais do material botânico, seguindo procedimentos usuais em anatomia vegetal (JOHANSEN, 1940; SASS, 1951).

As descrições das estruturas anatômicas e dos tricomas foram baseadas em Metcalfe e Chalk (1972).

As imagens digitais foram capturadas por microscópio óptico (*Alltione*) acoplado com câmera digital pelo programa *Toup View Image*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

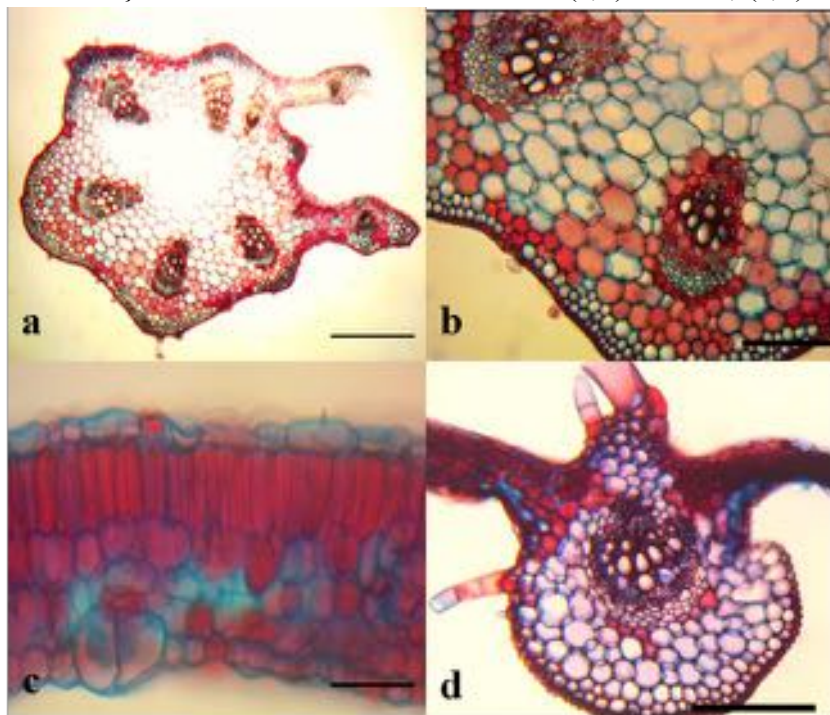
Em secção transversal, o pecíolo apresenta-se poligonal, com duas abas laterais (Fig 1a). A epiderme é uniestratificada, revestida por cutícula delgada. Os tricomas estão localizados em toda a extensão do pecíolo, sendo tectores e glandulares unisseriados e pluricelulares e tricomas glandulares pedunculares (Fig 1a). O colênquima angular encontra-se em posição subepidérmica, disposto de maneira descontínua, sendo formado por um número maior de camadas nas áreas mais proeminentes do pecíolo (Fig 1b). Coutinho et al. (2009) encontraram colênquima anelar. O parênquima fundamental é constituído de células arredondadas contendo numerosas drusas (Fig 1b). Os feixes vasculares são bicolaterais e encontram-se

dispostos em círculo (Fig 1b). Também são observados feixes vasculares bicolaterais nas duas abas laterais.

Em corte transversal da lâmina foliar, a epiderme apresenta-se uniestratificada, recoberta por fina camada de cutícula (Fig 1c). Observa-se tricomas tectores e glandulares dos mesmos tipos descritos para o pecíolo. Esses tipos de tricomas são os esperados para a família, segundo Metcalfe e Chalk (1950).

O mesofilo possui organização do tipo dorsiventral, constituído por uma camada de parênquima paliádico e três a quatro camadas de parênquima lacunoso (Fig 1c). Na região da nervura central, observa-se um feixe vascular bicolateral (Fig 1d). Coutinho et al. (2009) afirmam que na nervura pode haver de um a três feixes vasculares. O colênquima angular situa-se abaixo da epiderme, formado por três a quatro camadas na face adaxial e apenas uma camada na face abaxial (Fig 1d). No parênquima são encontradas drusas (Fig 1d).

Figura 1 – Secções transversais de *M. charantia*. (a,b) Pecíolo; (c,d) Folha.



Barras: a=500 μm ; b,d=100 μm ; c=50 μm .

CONCLUSÃO

O estudo microscópico do pecíolo e das folhas de *Momordica charantia* mostra características anatômicas importantes que podem ser utilizadas na caracterização farmacognóstica da espécie, dessa forma contribuindo para o seu controle de qualidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALZUGARAY, D.; ALZUGARAY, C. **Plantas que curam**. São Paulo: Ed. Três, 1983.

BRACA, A.; SICILIANO, T.; D'ARRIGO, M.; GERMANO, M. P. Chemical composition and antimicrobial activity of *Momordica charantia* seed essential oil. **Fitoterapia**, v.79, n. 2, p.123-125, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Plantas de interesse ao SUS**. 2009. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=30277&janela=1>. Acesso em: 15 maio 2012.

CARDOSO, A. I. I. Produção e qualidade de sementes de abobrinha “Piramoita” em resposta à quantidade de pólen. **Bragantia**, v. 62, n. 1, p. 47-52, 2003.

COUTINHO, D. F. et al. Estudo farmacobotânico das folhas de *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae). **Visão Acadêmica**, v. 10, n. 1, p. 7-17, 2009.

GROVER, J. K.; YADAV, S. P. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, n. 1, p. 123-132, 2004.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mcgraw-Hill, 1940.

LIMA, J. L. S. et al. **Plantas medicinais de uso comum no Nordeste do Brasil**. Campina Grande, 2006. 81p.

LING, B. et al. Antifeedant and antioviposition activities of *Momordica charantia* leaf ethanol extract against *Liriomyza sativae*. **Ying Yong Sheng Tai Xue Bao**, v. 20, n. 4, p. 836-842, 2009.

LORENZI, H. 2000. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 3º ed., 2000. 640p.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**. Oxford: Clarendon Press, 1950.

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, 1972.

MONTES-HERNANDEZ, S.; EGUIARTE, L. E. Genetic structure and indirect estimates of gene flow in three taxa of *Cucurbita* (Cucurbitaceae) in western Mexico. **American Journal of Botany**, v. 89, n. 7, p. 1156-1163, 2002.

SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. Ames: Iowa State College Press, 2° ed., 1951.

SHIH, C. C. et al. *Momordica charantia* extract on insulin resistance and the skeletal muscle GLUT4 protein in fructose-fed rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, n. 1, p. 82-90, 2009.



CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E FITOQUÍMICA DA CASCA DE *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex.Hayne

¹S.L. SILVA, ^{1,2}M.R.A.FERREIRA, ²G.S. DIMECH, ²E.C.P.A. XIMENES,
^{1,2}L.A.L. SOARES

¹Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.sarah.luannee@gmail.com

²Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

RESUMO

O interesse mundial por plantas medicinais cresceu nos últimos anos, sendo observado maior interesse pelo estudo das matérias primas de origem vegetal. Nesse sentido, este trabalho visou estabelecer parâmetros para caracterização das da espécie *H. stigonocarpa*. Para as análises físico-químicas foram adotadas metodologias farmacopeicas, na fitoquímica foram utilizados sistemas de solvente e reagentes gerais para identificação dos principais metabólitos por CCD. Os resultados obtidos foram: perda por dessecação = 11,31%; pó moderadamente grosso (425µm); teor de extrativos = 16,56%; e, cinzas totais = 9,25%. Em relação à análise fitoquímica evidenciou-se a presença de taninos condensados e flavonoides. Esses resultados contribuíram para o processo de identificação e padronização da espécie.

INTRODUÇÃO

Uma das fontes mais importantes para o tratamento de diversas doenças são os produtos derivados de plantas, especialmente em países em desenvolvimento. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2000), cerca de 70-80% da população mundial usam medicina alternativa (CHAN, 2003). Fatores como condições econômicas e a diversificada flora no Brasil têm tornado crescente o número de pessoas que fazem uso terapêutico de extratos de plantas no país (MACÊDO et al., 2008).

A espécie *Hymenaea stigonocarpa* (Caesalpinaceae), conhecida popularmente como jatobá, jutaí, jutaí-açu e jutaí-bravo, é encontrada em grande parte da América do Sul, incluindo o Brasil, desde o Piauí ao norte do Paraná (LORENZI, 2008). Segundo Panizza (1997) a espécie apresenta indicação medicinal, produzindo óleo essencial, taninos, materiais resinosos e pécnicos, amido e açúcares, sendo as cascas e folhas utilizadas no tratamento de diarreias, cólicas intestinais, cistite, tosses, bronquite e asma.

Neste sentido a caracterização das propriedades físico-químicas e do perfil fitoquímico representa um passo imprescindível para o desenvolvimento de um produto que atenda as prerrogativas legais exigidas pelos órgãos governamentais garantindo tanto sua eficácia terapêutica quanto sua segurança.

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização físico-química e fitoquímica das cascas de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex.Hayne.

MATERIAIS E MÉTODOS

A droga vegetal foi coletada em Camocim de São Félix (PE) e identificada no Instituto Agrônomo de Pernambuco sob nº 83653. O material foi seco em estufa durante 7 dias em 40-45°C. Após secagem as cascas foram trituradas em forrageira.

Para a caracterização físico-química o material foi submetido aos seguintes testes: perda por dessecação (método gravimétrico); matéria estranha; análise granulométrica; cinzas totais e teor de extrativos. Os procedimentos foram realizados de acordo com a Farmacopeia Brasileira V(FB5, 2010).

Para análise granulométrica foram utilizados diferentes tamises com aberturas das malhas de 850, 600, 425, 250, 150 e 90 µm. Os dados obtidos, foram analisados por métodos gráficos, como o histograma de distribuição e a curvas de retenção e passagem para determinação do diâmetro médio das partículas.

Na prospecção fitoquímica o extrato foi obtido por decocção durante 5 minutos, a 10% (p/v), utilizando metanol como solvente. Foram aplicadas alíquotas (15µL) do extrato metanólico em placas cromatográficas de gel de sílica F₂₅₄. Para detecção dos principais metabólitos, foram utilizados diversos sistemas de solventes e reveladores adequados, baseando-se em dados da literatura (XAVIER, 1988; WAGNER; BLADT, 1996). Para a pesquisa de saponinas, realizou-se o teste de afrogenicidade, onde as soluções extrativas foram submetidas a forte agitação por cerca de 30 segundos seguido da adição de ácido diluído, segundo Marques (2012) se confirma a presença de saponósidos se a espuma for abundante e persistente por mais de 15 minutos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de matéria estranha apresentou valor de 0,35%, dentro do limite estabelecido (máximo de 2%, m/m) pela FB5 (2010). A perda por dessecação, teste que determina o percentual de umidade residual da droga vegetal, apresentou valor igual a 11,31% ± 0,137, dentro dos limites preconizados (8 a 14%) pela Farmacopeia. Como não ultrapassa o limite máximo, é possível inferir que houve eficiência durante o processo de secagem e assegura a boa conservação microbiológica do material vegetal.

A distribuição granulométrica de partículas é um fator importante para homogeneidade e reprodutibilidade dos processos extrativos (VOIGT, 2006). Os resultados obtidos demonstram que as partículas do material encontram-se distribuídas entre os tamises 600 e 850 µm, representando 57,47% do material. Já o tamanho médio

de partículas foi determinado através da obtenção das curvas de retenção e passagem, sendo igual a 425 µm, classificando o pó como moderadamente grosso (FB5, 2010).

O teor de extrativos obtido foi de 16,56% ± 0,045, indicando a presença de compostos hidrossolúveis (aminoácidos, açúcares, heterosídeos flavonoídicos e mucilagens) no material vegetal (BARNI et al., 2009).

O valor correspondente ao teor de cinzas totais foi 9,25% ± 0,017, este ensaio por sua vez avalia a presença de contaminantes, representando o material inorgânico, como materiais estranhos, terra e areia (SIMÕES et al., 2007).

O perfil fitoquímico revelou uma marcante presença de proantocianidinas e leucoantocianidinas, como também foi notada a presença de flavonoides. Além disso, não foi observada para a espécie a presença de alcaloides, antraquinonas, cumarinas, derivados cinâmicos, mono e sesquiterpenos, triterpenos e esteroides. Por fim, o teste de afrogenicidade foi negativo para a presença de saponosídeos.

CONCLUSÕES

Com base na caracterização físico-química da espécie foi possível evidenciar que a matéria prima encontra-se dentro dos parâmetros exigidos pela Farmacopeia Brasileira, tomando como base monografias de outras matérias primas vegetais já existentes. Além disso, o ensaio fitoquímico evidenciou a presença de proantocianidinas, leucoantocianidinas e flavonoides. Tais resultados apresentam sua devida importância, pois contribuíram para a identificação e padronização dos parâmetros de qualidade da espécie.

AGRADECIMENTOS

Estrutura: Laboratório de Farmacognosia - UFPE

Apoio financeiro: FACEPE

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARNI, S.T.; CECHINEL FILHO, V.; COUTO, A.G. Caracterização química e tecnológica das olhas, caules e planta inteira da *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., Convolvulaceae, como matéria prima farmacêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n. 4, p. 865-70, 2009.

CHAN, K. Some aspects of toxic contaminants in herbal medicines. **Chemosphere**, v.52, p. 1361-1371, 2003.

MARQUES, G. S.; LYRA, M. A. M.; PEIXOTO, M. S.; MONTEIRO, R. P. M.; LEÃO, W. F.; XAVIER, H. S.; SOARES, L. A. L.; ROLIM NETO, J. P. Caracterização fitoquímica e físico-química das folhas de *Bauhinia forficata* Link coletada em duas regiões brasileiras. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 1, p. 57-62, 2012.

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. G. M.; SILVA, M. B. R.; COELHO, L. C. B. B. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagastakuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotessubfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A 146, p. 486-498, 2008.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5. Ed. Brasília: ANVISA, 2010.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 2008. 352 p..

OMS. Organização Mundial da Saúde, **Regulamentação dos medicamentos**: um esboço mundial. Washington: OPAS; 62. 2000.

PANIZZA, S. Plantas que curam: cheiro de mato. 17 ed. São Paulo: **IBRASA**, p. 152-155, 1997.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PALAZZO DE MELLO, J. C.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6^a ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC, 2007.

VOIGT, R. **Pharmazeutische Technologie**. 10. überarb. Aufl., Berlin: UllsteinMosby, 2006.

WAGNER, H., BLADT, S. **Plant drug analysis**: A thin layer chromatography atlas. 2. ed. Munich: Springer, 1996.

XAVIER, H. S. ***Lavandulastoechas L. (Lamiaceae): Etude Botanique, Chimique et Pharmacodynamique***. 1988. 250 f. – Université de Montpellier – I, Montpellier, 1988.



COMPREENDENDO O FENÔMENO DA JUDICIALIZAÇÃO DA ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA: UM ESTUDO DE CASO

¹K.K.S. MARÇAL, ²M.C. RIOS, ²P.F. CASTRO,
²D.P. LYRA JR., ³J.L.A.C. ARAÚJO JR.

¹Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos, Ministério da Saúde.
karolinamarcal@gmail.com

²Laboratório de Ensino e Pesquisa em Farmácia Social – LEPFS, Departamento de Farmácia,
Universidade Federal de Sergipe. lepfs.ufs@gmail.com

³Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Universidade Federal de Pernambuco.

O papel do judiciário tem cada vez mais destaque na saúde pública, quanto ao fornecimento de medicamentos. Se por um lado, o cumprimento do mandato judicial legitima o direito constitucional à saúde, por outro lado, expõe a necessidade de planejar a gestão do orçamento do Sistema Único de Saúde (SUS). Assim, a presente pesquisa visou compreender o fenômeno da judicialização da Assistência Farmacêutica em um Estado do Nordeste do Brasil. O estudo utilizou abordagem quantitativa e qualitativa, respectivamente. Na primeira foram descritas as características do fenômeno e realizadas entrevistas para melhor compreender a questão. Foram estudados 655 processos judiciais do Estado de Pernambuco, em 2009 e 2010. Em sua maioria (51,1%), as prescrições eram originárias dos hospitais da região. A defensoria pública foi o principal representante jurídico e praticamente todas as decisões tiveram tutela antecipada (99,1%). Os agentes antineoplásicos foram o subgrupo terapêutico de medicamentos mais solicitados. Na abordagem qualitativa foi possível aprofundar o entendimento sobre os fatores que influenciam a judicialização da Assistência Farmacêutica e as consequências do fenômeno. Por fim, evidenciou-se a necessidade de centrar ações em relação ao tratamento de oncologia, bem como avaliar a inclusão de profissionais técnicos, como o farmacêutico, para sensibilizar os prescritores e assessorar as decisões dos entes jurídicos a considerar as normas e a regulamentação do SUS.

Apoio: FAPITEC.

Palavras-chave: Assistência Farmacêutica, Direito a saúde, Decisões Judiciais.



CONTROLE DE QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICO DAS FOLHAS DE *Persea americana* Mill (ABACATE)

¹A.G. BONFIM, ^{1,2}M.R.A. FERREIRA, ^{1,2}L.A.L. SOARES

¹Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

²Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

RESUMO

Folhas da espécie *Persea americana* Mill, popularmente conhecida como abacate, apresenta um amplo potencial terapêutico no tratamento de distúrbios estomacais, como anti-inflamatório analgésico, e antidiabético. As folhas coletadas em Olinda foram submetidas à caracterização físico-química: análise granulométrica; determinação de material estranho $0,13\% \pm 0,004$; perda por dessecação $14\% \pm 0,00341$; teor de cinzas $3,81 \pm 0,0030$ e teor extrativo $0,20 \pm 0,013$ para o estabelecimento de especificações para o seu controle de qualidade, de acordo com os ensaios preconizados pela Farmacopeia Brasileira. De acordo com esses ensaios, garante que o processo de identificação e padronização para as folhas de *Persea americana* Mill estão de acordo com as normas da Farmacopeia Brasileira 5 Ed.

INTRODUÇÃO

Reconhecendo que os fitoterápicos são uma opção terapêutica eficiente e estratégica para o sistema de saúde, o Ministério da Saúde, deu início às discussões para a elaboração e implementação de uma Política Nacional de Plantas medicinais e Medicamentos Fitoterápicos. A iniciativa tem como objetivo a utilização de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS). Entretanto, para que os fitoterápicos e plantas medicinais sejam utilizados com segurança, é necessário estabelecer parâmetros de qualidade (BRASIL, 2006; PELISSARI, 2008).

Uma vez que tais especificações são escassas para algumas espécies, se fazem necessários estudos para garantir a autenticidade destas matérias primas vegetais. Esses estudos englobam etapas como cultivo, identificação botânica e testes físico-químicos. Nesse contexto, insere-se a espécie *Persea americana* Mill (Lauraceae), árvore frutífera de grande porte, nativa da América central, também encontrada na América do sul, sendo popularmente conhecida no Brasil, como abacate (DING et al., 2007;

GALINDO-TOVAR; OGATA-AGUILAR; ARZATE-FERNANDÉZ, 2008; CHEN et al. 2009; HOMARZA; ALCARAZ, 2009).

Sua casca, fruto e folhas são usados na medicina tradicional para o tratamento de distúrbios estomacais (DERMARDEROSIAN; BEUTLER, 2002; DING et al., 2007). Além disso, estudos farmacológicos realizados com a solução extrativa de suas folhas confirmam as propriedades anti-inflamatória, analgésica e antidiabética (ADEYEMI; OKPO; OGUNTI, 2002; LIMA et al., 2012).

OBJETIVOS

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi realizar o controle de qualidade físico-químico das folhas de *Persea americana* Mill (abacate).

MATERIAIS E MÉTODOS

As folhas de *P.americana* Mill foram coletadas em Olinda-PE e levadas ao IPA, a excisata depositada no herbário sob número de tombamento 52805. Após a coleta e estocagem, o material vegetal foi levado para secagem em estufa de circulação de ar (durante 7 dias, a 45°C) e moído em moinho de facas.

Para a caracterização do controle de qualidade físico-químico foram empregados Métodos Gerais em Farmacognosia preconizados pela Farmacopeia Brasileira 5 (FB5, 2010): determinação de material estranho (realizado por quarteamento); determinação do tamanho de partícula, através de análise granulométrica, utilizando tamises com abertura de malha entre 850 e 90 µm, e, os dados obtidos foram analisados por métodos gráficos como o histograma de distribuição e a curvas de retenção e passagem para determinação do diâmetro médio das partículas; determinação de perda por dessecação (utilizando o método gravimétrico e método de balança de infravermelho); determinação do teor de cinzas totais; e determinação do teor de extrativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a determinação do material estranho a droga vegetal deve estar isenta de fungos, insetos, e outros materiais contaminantes. Apresenta um percentual de $0,13\% \pm 0,004$. A perda por dessecação expressa o percentual de umidade residual da droga vegetal. Os valores obtidos na análise das folhas secas de *P. americana* se encontram dentro dos limites estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira V, que admite valores de umidade entre 8 e 14%. O método gravimétrico mostrou valor médio de umidade igual a $14\% \pm 0,00341$ enquanto que o método em balança de infravermelho apresentou valor médio de $11,49\% \pm 0,2090$.

A distribuição granulométrica das partículas de matérias primas vegetal pulverizadas constitui um fator determinante na homogeneidade e reprodutibilidade dos processos extrativos (VOIGT, 2006). A análise gráfica através do histograma de distribuição demonstrou que a matéria prima vegetal fica retida em maior quantidade no tamis que apresenta abertura de malha igual a 600 µm; já a análise realizada utilizando

curvas de retenção e passagem, mostrou que as partículas apresentam tamanho médio igual a 400 µm.

O teor de extrativos indica a presença de compostos hidrossolúveis presentes no material vegetal, como aminoácidos, açúcares, heterosídeos flavonoídicos e mucilagens (BARNI et al., 2009). O ensaio realizado com as folhas permitiu inferir que o teor de extrativos médio obtido é de $0,20 \pm 0,013$.

Os resultados da determinação de cinzas totais na amostra foram $3,81 \pm 0,0030$, conforme os limites estabelecidos em monografias de diversas drogas vegetais descritas na Farmacopeia Brasileira, indicando que as mesmas não possuem excesso de terra e/ou areia, por justamente ser uma árvore de grande porte e sendo utilizadas suas folhas, dificilmente será encontrado terra ou areia e o teor de cinzas totais corresponde aos sais minerais ou impurezas contidas na amostra.

CONCLUSÕES

Podemos observar com este trabalho que a droga vegetal *P. americana* adquirida está dentro dos parâmetros de qualidade, através de determinados estudos físico-químicos adequados. E o estabelecimento desses parâmetros é importante para que a espécie seja utilizada de forma segura.

AGRADECIMENTOS

FACEPE

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEYEMI, O.O.; OKPO, S.O.; OGUNTI O.O. Analgesic and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of leaves of *Persea americana* Mill Lauraceae.

Fitoterapia, v. 73, p. 375-380, 2002.

BARNI, S. T.; CECHINEL, F. V.; COUTO, A. G. Caracterização química e tecnológica das folhas, caules e planta inteira da *Ipomoea pescaprae* (L.) R. Br., Convolvulaceae, como matéria prima farmacêutica. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 19, n. 4, p. 865-870, 2009.

CHEN, H.; PETER, L. M.; VANESSA, E. T. M.; ASHWORTH, M. C.; CLEGG, M. T. Tracing the Geographic Origins of Major Avocado Cultivars. **Journal Heredity**, v. 100, n. 1, p. 56-65, 2009.

DERMARDEROSIAN, A.; BEUTLER, J. A. **Avocado**. In: DerMarderosian, A.; Beutler, J.A.; Eds. The review of natural products: the most complete source of natural product information. St. Louis: Lippincott Co., 2002. p. 63-64.

DING, H.; YOUNG-WON, C.; KINGHORN, A. D.; D'AMBROSIO, S. M.; Chemopreventive characteristics of avocado fruit. **Seminars Cancer Biology**, v. 17, p. 386-394, 2007.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5 ed. Brasília: Anvisa, 2010.

GALINDO-TOVAR, M.E.; OGATA-AGUILAR, N.; ARZATE-FERNÁNDEZ, A.M.; Some aspects of avocado (*Persea americana* Mill.) diversity and domestication in Mesoamerica. **Genet Resources and Crop Evolution**, v. 55, p. 441-450, 2008.

HORMAZA, J. I.; ALCARAZ, M. L. Selection of potential pollinizers for 'Hass' avocado based on flowering time and male-female overlapping. **Sci Horticulturae**, v. 121, p. 267-271, 2009.

LIMA, C. R.; VASCONCELOS, C. F. B.; COSTA-SILVA, J. H. et al. Anti-diabetic activity of extract from *Persea americana* Mill. leaf via the activation of protein kinase B (PKB/Akt) in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, p. 517-525, 2012.

PELISSARI, G. P. Estudo farmacognóstico e avaliação das atividades antibacteriana e imunomoduladora de *Melanpodium divaricatum* (Ruch, In Pers.) DC (Asteraceae) [dissertação]. Araraquara (SP). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2008.

VOIGT, R. **Pharmazeutische Technologie**. 10. überarb. Aufl., Stuttgart: Wissenschaftliche, 2006.



DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO BRUTO SECO DA *EUGENIA UNIFLORA* L. FRENTE A MICRORGANISMOS DA CAVIDADE ORAL

¹C.S.B. AGUILERA, ¹M.R.C.G. MOURA, ²R.P. CORDEIRO

¹Discente Faculdade ASCES. cindysba@hotmail.com

²Docente Faculdade ASCES

Introdução: A cavidade bucal humana de um indivíduo adulto hospeda cerca de 700 espécies bacterianas distintas, a maioria destas espécies são comensais, mas um subgrupo consiste de patógenos oportunistas que podem causar doenças bucais, outros ainda podem estar envolvidos em doenças sistêmicas, afim de encontrar outras alternativas de tratamento avaliou-se a atividade antimicrobiana do extrato bruto seco (EBS) da *Eugenia uniflora* Linn (Pitangueira) frente a microrganismos presentes na cavidade oral.

Metodologia: O EBS foi preparado com as folhas da planta. A partir desse extrato foram feitas sucessivas diluições e pela técnica de poços foi determinado a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato frente os microorganismos: *Streptococcus sanguis*, *Staphylococcus aureus*, e *Candida albicans*. O digluconato de clorexidina 2% foi utilizado como controle positivo.

Resultado e Discussão: Todas as linhagens testadas foram sensíveis ao EBS da *Eugenia uniflora* Linn. A CIM sobre o *Staphylococcus aureus*, e *Cândida albicans* foi de 3,12mg/mL, enquanto sobre o *Streptococcus sanguis* foi um pouco menor 1,56mg/mL. Os halos de inibição formados pelo EBS tiveram tamanho bastante próximo aos formados pelo digluconato de clorexidina 2%. **Conclusão:** O extrato bruto seco da *Eugenia uniflora* Linn apresentou relevante atividade antimicrobiana sobre os microrganismos testados, evidenciando que produtos a base dessa planta podem vim a ser uma alternativa para a prevenção e tratamento de doenças bucais.

Apoio: Programa de Iniciação Científica da Faculdade ASCES.

Palavras-chave: Extrato; Bacteriologia; Fitoterapia.



DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO E AVALIAÇÃO DA ESPALHABILIDADE DE FORMULAÇÕES DE GÉIS PÓS-DEPILATÓRIOS.

¹T.R.R. TIMÓTEO, ¹V.M. SILVA, ¹C.H.T.P. SILVA, ²D. I. A. F. ARAÚJO.

¹ Faculdade ASCES. taysatimoteo@hotmail.com

² Universidade Federal da Paraíba, UFPB.

Introdução Os géis são preparações semissólidas compostas geralmente por polímeros que se intumescem na presença de solventes e que através de longas cadeias moleculares ficam em constante atrito umas com as outras, oferecendo uma sensação de viscosidade em quem os utiliza. Os géis apresentam fácil espalhamento, não são gordurosos e podem veicular princípios ativos hidrossolúveis e lipossolúveis. Produtos empregados principalmente no período pós-depilatório, precisam apresentar características próprias, principalmente aquelas atreladas à parte reológica e consequentemente a espalhabilidade, para que não ocorra irritabilidade. **Métodos:** Foram produzidas quatro formulações em triplicatas de géis com polímeros de carbopol [G1 (1,0%), G2 (1,3%)] e natrosol [G3 (1,5%), G4 (2,0%)] e avaliou-se a espalhabilidade dos mesmos segundo a metodologia proposta por Knorst e para a análise estatística foi utilizado o teste “*t*” de student. **Resultados e Discussão:** A formulação G1, a base de carbopol (1,0%), apresentou melhores números absolutos, porém estatisticamente expressou equivalência às demais formulações desenvolvidas. **Conclusão:** Concluimos que as formulações desenvolvidas em triplicata, independente de ser base carbopol ou natrosol, apresentaram um ótimo perfil de espalhabilidade, contudo, os géis a base de carbopol apresentou melhores resultados de espalhabilidade, além de apresentar características organolépticas satisfatórias, superiores aos formulados com polímeros de natrosol.

Palavras-chave: Espalhabilidade, Géis, Pós-depilatórios.



EFEITO ANTI-HIPERTENSIVO DO EXTRATO SECO DE *Schinus terebinthifolius*, Raddi.

¹A.V. ARAÚJO, ¹J.D. SANTOS, ¹V.B. VALENÇA, ¹C.P. DA COSTA, ¹A.G.S. LIMA, ¹T. PEIXOTO-SOBRINHO, ¹A.G. WANDERLEY

¹Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Pré-clínica de Produtos Bioativos, Depto. de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco

RESUMO

A hipertensão arterial está associada ao estresse oxidativo. O tratamento com antioxidantes reverte algumas alterações vasculares em ratos hipertensos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito anti-hipertensivo do extrato seco de *S. terebinthifolius* (ESSt), que é rico em polifenóis. Foi realizada a análise fitoquímica do extrato. Ratos Wistar machos hipertensos 2R-1C foram tratados com o ESSt (400 mg/kg, v.o.) por 28 dias consecutivos. A pressão arterial dos animais foi acompanhada semanalmente. Na análise fitoquímica, foram encontradas grandes quantidades de compostos fenólicos. O tratamento reduziu a pressão arterial dos animais. Portanto, os resultados sugerem que o tratamento com o ESSt apresenta efeito anti-hipertensivo, que pode ser atribuído à presença de compostos fenólicos.

INTRODUÇÃO

Apesar dos grandes avanços no diagnóstico e na terapêutica, as doenças cardiovasculares ainda constituem a principal causa de morte em todo o mundo (WHO, 2008, Brasil, 2004). Um dos principais fatores de risco para doenças cardiovasculares é a Hipertensão Arterial (Peixoto et al., 2005), definida como a elevação crônica da pressão arterial. De fato, vários estudos epidemiológicos e ensaios clínicos já demonstraram uma drástica redução da morbimortalidade por doenças cardiovasculares com o tratamento da hipertensão arterial (Veterans Administration Cooperative Study Group on Antihypertensive Agents, 1997).

No entanto, apesar dos avanços na terapia anti-hipertensiva, uma porcentagem importante dos pacientes não apresenta controle dos níveis pressóricos (Nelson et al., 2011). Desta maneira, o entendimento dos mecanismos envolvidos na hipertensão, assim como o estudo de novas estratégias anti-hipertensivas, é de extrema importância.

Evidências epidemiológicas sugerem a existência de uma correlação negativa entre o consumo de alimentos ricos em polifenóis e a incidência de doenças cardiovasculares (Miyagi et al., 1997; Nakachi et al., 2000). Estes polifenóis podem ser

produzidos por plantas como metabólitos intermediários e possuem a função de proteção contra agentes patogênicos e radiação ultravioleta (Beckman, 2000). A principal hipótese é de que a atividade antioxidante dos polifenóis protege os vasos sanguíneos do estresse oxidativo que leva às alterações vasculares envolvidas na hipertensão.

Dado o impacto social e econômico das doenças cardiovasculares e as evidências de que substâncias antioxidantes de plantas podem ter efeito sobre a pressão arterial, pareceu-nos interessante estudar o efeito anti-hipertensivo do extrato seco de *Schinus terebinthifolius*.

OBJETIVOS

- Estimar o teor de fenóis totais, taninos e flavonóides presentes no extrato seco da casca de *S. terebinthifolius* (ESSt);
- Analisar os principais marcadores fitoquímicos do ESSt por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Avaliar o efeito anti-hipertensivo do tratamento (28 dias) com o ESSt em ratos hipertensos 2R-1C.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal

Foi utilizada a casca do tronco de *S. terebinthifolius* coletada no município de Cabo de Santo Agostinho-PE, entre março e abril de 2012. A extração foi realizada por maceração, utilizando-se etanol como agente extrator.

Estudo fitoquímico

Foram realizadas a quantificação do conteúdo fenólico total e de taninos (Amorim et al., 2008), a determinação do teor de taninos condensados (Burns, 1971; Morrison et al., 1995; e o cálculo dos flavonóides totais (Peixoto Sobrinho et al., 2008). Os principais marcadores fitoquímicos do ESSt foram analisados por CLAE-DAD.

Estudos in vivo

Foram utilizados ratos Wistar, *Rattus norvegicus* var. albinus (180-200g), do Biotério do Depto. de Fisiologia e Farmacologia da UFPE. Os animais receberam água e dieta (Labina®) *ad libitum* e foram mantidos sob condições padrão (ciclo 12h claro/escuro, 22 ± 2 °C). Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA) da UFPE (nº 055205/2011-13).

Quatro semanas após a cirurgia para indução da hipertensão, os animais foram divididos em três grupos: G1: Sham, tratados com água; G2: 2R-1C, tratados com água; G3: 2R-1C, tratados com o ESSt 400 mg/kg. Todos foram tratados por quatro semanas.

A pressão arterial dos animais (pressões sistólica, média e diastólica) de todos os grupos foi acompanhada pela técnica de pletismografia de cauda uma vez por semana.

Análise Estatística

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M). As análises foram realizadas pelo programa Prisma. A diferença entre os grupos foi verificada através de ANOVA seguida, quando necessário, pelo teste de Newman-Keuls. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi sempre $\geq 5\%$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os níveis de fenóis totais foram: $320 \pm 9,48$ mg EAT/g; taninos hidrolisáveis, $319,74 \pm 9,48$ mg EAT/g; taninos condensados, $358,13 \pm 3,48$ mg EC/g e flavonoides, $2,72 \pm 0,15$ mg ER/g. Foram identificados catequina, epicatequina, ácido gálico e ácido elágico. Estes resultados corroboram com outros trabalhos da literatura (Araújo, 2002; Lima et al., 2006; Lima et al., 2009).

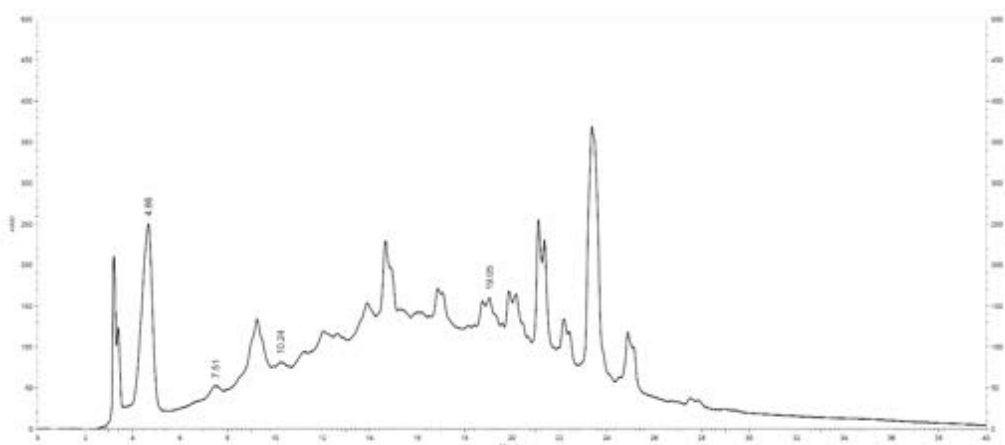


Figura 1. Cromatograma de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) detectado a 270 nm. Picos: (Rt = 4,66), catequina (7,51), epicatequina (10,24) e ácido gálico (Rt = 19,05) ácido elágico.

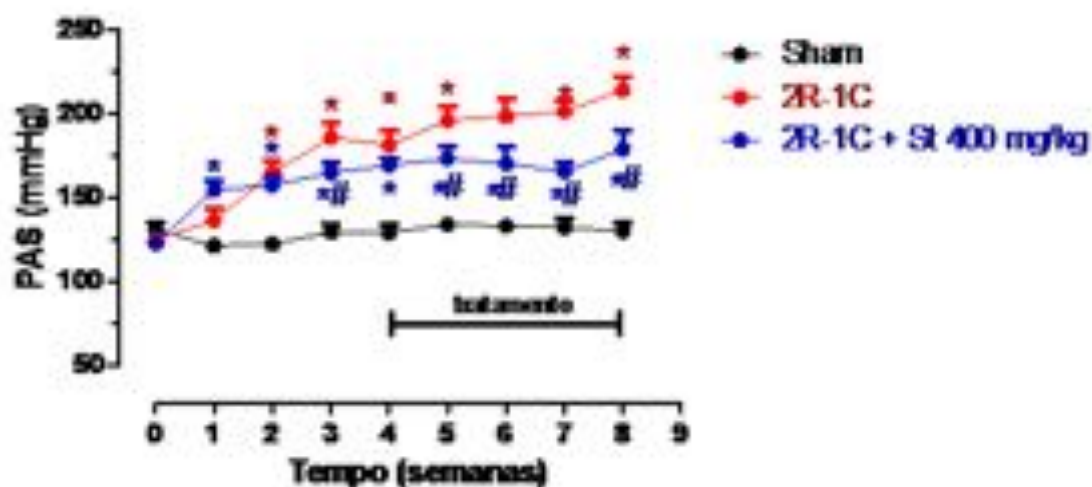


Figura 2. Pressão arterial sistólica (PAS) de ratos Sham (n=3), 2R-1C (n=7) e 2R-1C tratados com ESSt na dose de 400 mg/kg (n=6). Cada ponto representa a média \pm e.p.m. de diferentes animais. *diferença estatística em relação ao controle, $p < 0,05$; # diferença estatística em relação ao grupo 2R-1C (ANOVA, seguida de Newmann-Keuls).

Evidências epidemiológicas sugerem a existência de uma correlação negativa entre o consumo de alimentos ricos em polifenóis e a incidência de doenças cardiovasculares (Miyagi et al., 1997; Nakachi et al., 2000). A principal hipótese é a de que a atividade antioxidante dos polifenóis pode proteger os vasos sanguíneos das consequências do estresse oxidativo, associado a muitos, senão todos, os fatores de risco para doenças cardiovasculares (Stoclet et al., 2004). De fato, o tratamento com agentes antioxidantes é capaz de reverter algumas alterações vasculares ou até mesmo o aumento da pressão arterial em ratos hipertensos (Heitzer et al., 1999; Laursen et al., 1997).

Várias plantas são ricas em componentes polifenólicos que podem apresentar atividade antioxidante. Dentre elas, destaca-se *Schinus terebinthifolius*, Raddi. O emprego de diferentes partes de *S. terebinthifolius* tem sido relatado na medicina tradicional de vários países. Velázquez et al. (2003) mostraram que o extrato de *S. terebinthifolius* apresenta atividade antioxidante. NO nosso estudo, o tratamento com o ESSt na dose de 400 mg/kg foi capaz de reduzir a pressão arterial dos animais hipertensos 2R-1C (Figura 2).

CONCLUSÕES

Portanto, os resultados sugerem que o tratamento por via oral durante 28 dias com o ESSt na dose de 400 mg/kg apresenta efeito anti-hipertensivo e reverte a disfunção endotelial de ratos hipertensos 2R-1C. Estes efeitos podem ser atribuídos à grande quantidade de fenóis presente no extrato.

AGRADECIMENTOS

Apoio financeiro: FACEPE e CNPq.

REFERÊNCIAS

Amorim ELC, Nascimento JE, Monteiro JM, Peixoto Sobrinho TJS, Araújo TAS, Albuquerque UP. A simple and accurate procedure for the determination of tannin e flavonoid levels e some applications in ethnobotany e ethnopharmacology. *Functional Ecosystems and Communities* 2(1): 88-94, 2008.

Araújo EL. Aroeira da praia – Estudo farmacognóstico e da atividade biológica de *Schinus terebinthifolius*, Raddi (Anacardiaceae). Dissertação de Mestrado do Departamento de Ciências Farmacêuticas / UFPE, Recife, 2002.

Beckman CH. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57:101-10, 2000.

BRASIL 2004, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informações de saúde. Disponível em <<http://www.ripsa.org.br/fichasIDB/record.php?node=C.4&lang=pt&version=ed4>>, acesso em 07 de setembro de 2012

Burns RE. Method for estimation of tannin in grain sorghum. *Agronomy Journal* 63: 511-512, 1971.

Heitzer T, Wenzel U, Hink U, Krollner D, Skatchkov M, Stahl RA, MacHarzina R, Brasen JH, Meinertz T, Munzel T. Increased NAD(P)H oxidase-mediated O₂⁻ production in renovascular hypertension: evidence for an involvement of protein kinase C. *Kidney International* 55:252-260, 1999.

Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine induced hypertension. *Circulation* 95:588 –593, 1997.

Lima LB, Vasconcelos CFB, Maranhão HML, Leite VR, Ferreira PA, Andrade BA, Araújo EL, Xavier HS, Lafayette SSL, Wanderley AG. Acute and subacute toxicity of *Schinus terebinthifolius* bark extract. *Journal of Ethnopharmacology* 126:468-473, 2009.

Lima MRF, Luna JS, Santos AF, Andrade MCC, Sant'ana AEG, Genet JP, Márquez B, Neuville L, Moreau N. Anti-bacterial of some Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 105:137-147, 2006.

Miyagi Y, Miwa K, Inoue H. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by flavonoids in red wine and grape juice. *American Journal of Cardiology* 80:1627- 1631, 1997.

Morrison IM, Asiedu EA, Stuchbury T, Powell A.A. Determination of lignin and tannin contents of *Cowpea* seed coats. *Annals of Botany* 76(3):287-290, 1995.

Nakachi K, Matsuyama S, Miyake S, Suganuma M, Imai K. Preventive effects of drinking green tea on cancer and cardiovascular disease: epidemiological evidence for multiple targeting prevention. *BioFactors* 13:49–54, 2000.

Nelson SAE, Dresser GK, Vandervoort MK, Wong CJ, Feagan BG, Mahon JL, Feldman RD. Barriers to Blood Pressure Control: A STITCH Substudy. *The Journal of Clinical Hypertension*, 13:73-80, 2011.

Peixoto MM, Santos-Junior AF, Santos CAA, Caetité-Junior, E. Avaliação da qualidade de comprimidos de captopril dispensados em Feira de Santana-BA. *Brazilian Journal of Pharmacy* 47: 69-73, 2005.

Peixoto Sobrinho TJS, Silva CHTP, Nascimento JE, Monteiro JM, Albuquerque UP, Amorim ELC. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 44(4): 683-689, 2008.

Stoclet J-C, Chataigneau T, Ndiaye M, Oak M-H, El Bedoui J, Chataigneau M, Schini-Kerth VB. Vascular protection by dietary polyphenols. *European Journal of Pharmacology* 500:299– 313, 2004.

Velázquez E, Tournier HA, Buschiazzo PM, Saavedra GR, Schinella G. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. *Fitoterapia* 74:91-97, 2003.

Veterans Administration Cooperative Study Group on Antihypertensive Agents. Effects of treatment on morbidity in hypertension: results in patients with diastolic blood pressure averaging 115 through 129 mmHg. *Journal of the American Medical Association* 202:1028-34, 1997.

WHO, World health statistics 2008. Disponível em <<http://apps.who.int/ghodata/?vid=10012>>, acesso em 17 de setembro de 2012.



**EFEITO ANTITUMORAL *IN VIVO* E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
IMUNESTIMULANTE DA *REMIREA MARITIMA* AUBL (CYPERACEA)**

**G.A.A. DÓRIA¹; P.P. MENEZES¹; B.S. VASCONCELOS¹; RAISSA MELO
HENRIQUES²; ANA PAULA N. PRATA³; RICARDO LUIZ C. A. JÚNIOR⁴; LUCINDO
JOSÉ QUINTANS-JÚNIOR²; DANIEL P. BEZERRA⁵; ADRIANO A. S. ARAÚJO¹**

¹Laboratório de Ensaios Farmacológico e Toxicológico, Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Sergipe, gracedoria@hotmail.com

² Laboratório de Farmacologia Pré-Clinica, Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe,

³Laboratório de Taxonomia, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Sergipe,

⁴ Instituto de Pesquisa e Tecnológica, Universidade Tiradentes

⁵ Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Salvador, Bahia,

Introdução: As plantas medicinais têm sido uma rica fonte para obtenção de moléculas com atividade antitumoral. *Remirea maritima* Aubl. (Cyperaceae) é conhecida como "pinheirinho-da-praia" e vem sendo utilizada pela população para o tratamento de diversas doenças. O objetivo deste estudo foi avaliar efeitos antitumorais *in vivo* e imunomodulador do extrato hidroalcoólico da *R. maritima* (HE40) utilizando modelos experimentais. **Métodos:** O extrato foi preparado a partir da decocção de 15 g do pó da planta em 300 mL de EtOH/H₂O 40% v/v durante 30 minutos de aquecimento, seguido por filtração à pressão reduzida, extração do solvente e liofilização. A atividade antitumoral *in vivo* foi avaliada em camundongos inoculados com células de sarcoma 180. Os animais foram tratados com HE40 (25 e 50 mg/kg, i.p., 7 dias consecutivos). O efeito imunomodulador foi realizado através de mensuração de anticorpos específicos para ovoalbumina por ELISA. Três grupos foram imunizados (dose única, s.c.) com ovoalbumina (2 mg/kg) e ovoalbumina mais HE40 (25 mg/kg e 50 mg/kg). **Resultados e Discussão:** A taxa de inibição do tumor foi de 57,1-62,5%. Houve aumento significativo no peso do baço dos animais tratados com HE40, o que sugere atividade imunoestimulante. HE40 aumentou significativamente a quantidade de Ig_{total} específico para ovoalbumina no soro de animais tratados com HE40, em comparação com o controle (p<0,05). Observou-se aumento de megacariócitos em análises histológica de baço o que corrobora que o HE40 age como imunoestimulador. **Conclusão:** Os estudos iniciais sugerem que o HE40 apresenta potencial efeito antitumoral, observado *in vivo*, além de atividade imunoestimulante.

Apoio financeiro: CNPq, FAPITEC/SE.

Palavras-chave: *Remirea maritima*, efeito antitumoral, atividade imunoestimulante.



EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS DAS RAÍZES DA *LANTANA RADULA* E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE SEUS FENILETANÓIDES GLICOSÍDICOS

¹M. REGO BARROS-JUNIOR, ⁴M. L. C. M. GONÇALVES, ¹R. R. MARINHO, ¹J. DE S. SANTOS, ¹C. A. DOS SANTOS, ²J. G. DE SENA-FILHO, ³R. P. M. FERNANDES AND ¹S. M. THOMAZZI

¹ Laboratório de Farmacologia da Inflamação, Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, Brasil. E-mail: marconijrr@gmail.com

² Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Tabuleiros Costeiros, Av. Beira Mar 3250, Aracaju, SE, Brasil.

³ Laboratório de Bioquímica, Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, Brasil.

⁴ Laboratório de Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, PE, Brasil.

RESUMO

A *Lantana radula* Swartz (Verbeneceae) é rica em feniletanóides glicosídicos e muitas espécies deste gênero possuem atividades anti-inflamatória e antioxidante. Observou-se que *L. radula* AP-20SS reduziu o edema de pata e o influxo de leucócitos para área afetada. Inibiu o radical NO nas concentrações de 3, 10, 30 e 100 µg/mL e foi capaz de prevenir a peroxidação lipídica induzida por Fe⁺² ou Fe⁺² + H₂O₂ nas concentrações de 1 a 100 µg/mL. Os compostos (radulosídeo, samiosídeo e isonuomiosídeo) inibiram o radical NO (em torno de 13%, *P* < 0,05) e a peroxidação lipídica nos mesmos dois ensaios (57-99%, *P* < 0,001). Este estudo sugere que o efeito anti-inflamatório do AP-20SS pode estar relacionado à atividade antioxidante através da atividade *scavenger* de radicais livres de seus feniletanóides.

INTRODUÇÃO

Inflamação é uma resposta de proteção iniciada após danos físico e químico ou infecções por microrganismos e podem constituir papel central na fisiopatologia de diversas doenças. O processo inflamatório se relaciona com o processo oxidativo principalmente porque compartilham vias similares que os mantém [1,2].

Antioxidantes pertencem a um grupo de moléculas úteis que garantem a homeostase celular. Sua ação neutralizante das espécies reativas do oxigênio e nitrogênio previne contra doenças, pois consegue evitar as ações danosas destes radicais livres, entre elas a perda da seletividade da membrana celular, oxidação dos lipídios, inativação de proteínas, distúrbios na estrutura do DNA e em última instância a morte

da célula. Tais processos levam a doenças como as cardiovasculares, neurodegenerativas e ao câncer [3,4].

A classe dos feniletanóides é uma importante fonte de substâncias com esta atividade antioxidante. Estes compostos são frequentes em plantas da família Verbenaceae, podendo-se destacar o gênero neotropical *Lantana*, que contém aproximadamente 150 espécies, muitas delas ocorrendo no Brasil. Muitas espécies deste gênero são utilizadas na medicina tradicional [5] e suas atividades antibacteriana, antiproliferativa, anti-inflamatória, analgésica, sedativa e antioxidante têm sido demonstradas [6-7].

Recentemente foi demonstrado o perfil químico da *Lantana radula* Swartz e observou-se que esta é rica em feniletanóides e ligninas glicosídicos [8]. Os feniletanóides glicosídicos são compostos derivados do metabolismo secundário e foi demonstrado possuírem uma vasta quantidade de propriedades biológicas, incluindo os efeitos anti-inflamatório e antioxidante [9-10]. Sendo assim, é evidente a importância das plantas na regulação do estresse oxidativo e no combate a doenças.

OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar as atividades anti-inflamatória e antioxidante do extrato polar de raízes da *L. radula* originado da fase aquosa previamente purificada pelo MPLC sobre resina de HP-20SS (AP-20SS), como também a atividade antioxidante de seus feniletanóides glicosídicos (radulosídeo, samiosídeo e isonuomiosídeo A).

MATERIAIS E MÉTODOS

A *Lantana radula* foi coletada em Timbaúba, em 01.2006, identificada pela Dr. Rita de Cassia Pereira. Voucher do espécime da *L. radula* foi depositado no Herbarium Dárdano de A. Lima (nº 70004), na Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA). As raízes secas e pulverizadas (5,5 kg) da *L. radula* foram extraídas com 95% de EtOH na temperatura ambiente. O EtOH foi evaporado a 40°C sobre pressão reduzida, fornecendo 454g de extrato bruto. 250g deste extrato foi dissolvido em H₂O e particionado com hexano, CH₂Cl₂ e AcEtO. A fase aquosa foi submetida pelo MPLC e resina HP-20SS (AP-20SS) e separada pelo gradiente de HPLC (sistema Shimadzu).

Ratos Wistar e camundongos Swiss do sexo masculino da colônia de criação do Biotério Central da UFS foram utilizados de acordo com a diretriz desta e do Comitê Ético de Cuidado e Uso em Pesquisa (CEPA/UFS 89/2010). O efeito anti-inflamatório da *L. radula* AP-20SS foi mensurado utilizando o modelo de edema de pata [11,12], no qual a atividade da mieloperoxidase (MPO) foi medida [13] e pelo modelo de peritonite em camundongos [11], ambos induzidos por carragenina.

Foi utilizado para mensurar a capacidade antioxidante do *L. radula* AP-20SS e de seus compostos isolados (radulosídeo, samiosídeo e isonuomiosídeo A) o teste da peroxidação lipídica induzida pelo FeSO₄ (1,45 mM) ou FeSO₄+H₂O₂ (0,4 M) para

determinação das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico [14] e o ensaio da atividade sequestradora do NO [15]; ambos os ensaios foram feitos em triplicata.

A avaliação estatística dos dados foi feita usando análise de variância (ANOVA) seguida do teste Bonferroni. Para atividade antioxidante foi utilizado a ANOVA seguida do teste Newman-Keuls's (software GraphPad Prism Co., 4.0, USA). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo revelou que *L. radula* AP-20SS melhorou significativamente a resposta inflamatória em modelos roedores, sugerindo que o *L. radula* AP-20SS oferece componentes ativos promissores farmacologicamente para o desenvolvimento de agentes para tratamento de processos inflamatórios. Para atividade anti-inflamatória, pelo menos três parâmetros inflamatórios foram avaliados neste estudo: edema (resultado do aumento da permeabilidade vascular e extravasamento plasmático), atividade de MPO (figura 1) e o influxo de leucócitos (figura 2) [11, 16]. O tratamento de ratos com *L. radula* AP-20SS nas doses de 100 ou 300 mg/kg (v.o.) produziu uma redução ($P < 0,01$) do edema de pata na 3ª e 4ª horas. Do mesmo modo o grupo controle positivo tratado com dexametasona (2 mg/kg) exibiu inibição ($P < 0,05$) do edema em todas as horas.

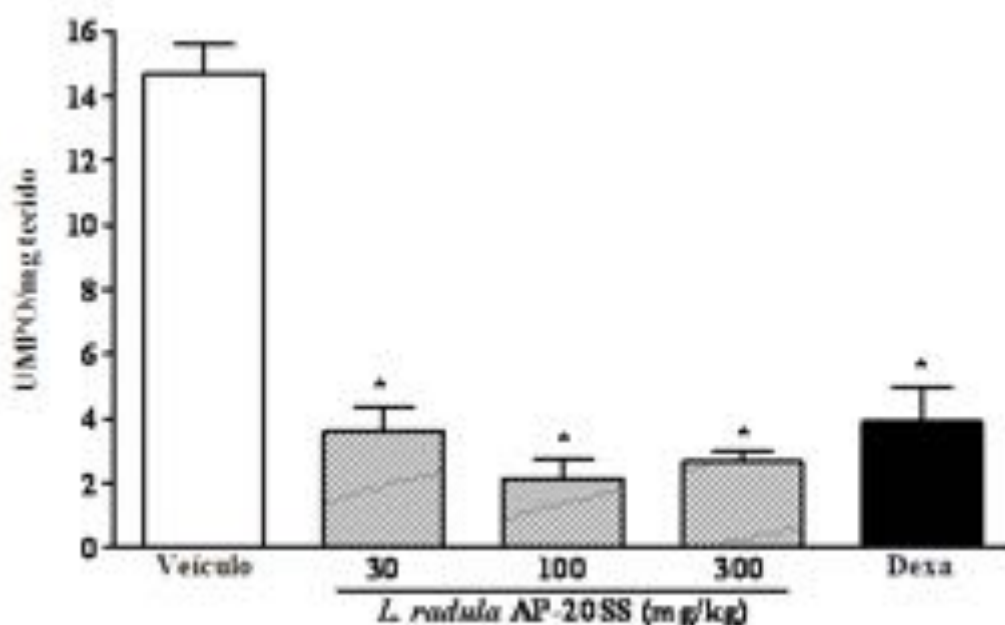


Figura 1. Efeito do *L. radula* AP-20SS sobre a atividade de MPO. Ratos foram tratados (v.o.) com o *L. radula* AP-20SS (30-300 mg/kg), dexametasona (Dexa, 2 mg/kg) ou veículo 60 minutos antes do edema induzido pela carragenina e a atividade de MPO mensurada em amostras de tecido de pata de rato 4 h após injeção de carragenina. Todos os valores estão apresentados como média \pm S.D. Análise estatística por ANOVA seguida do teste Bonferroni. * $P < 0,001$ vs. animais tratados com veículo ($n = 6$ /grupo).

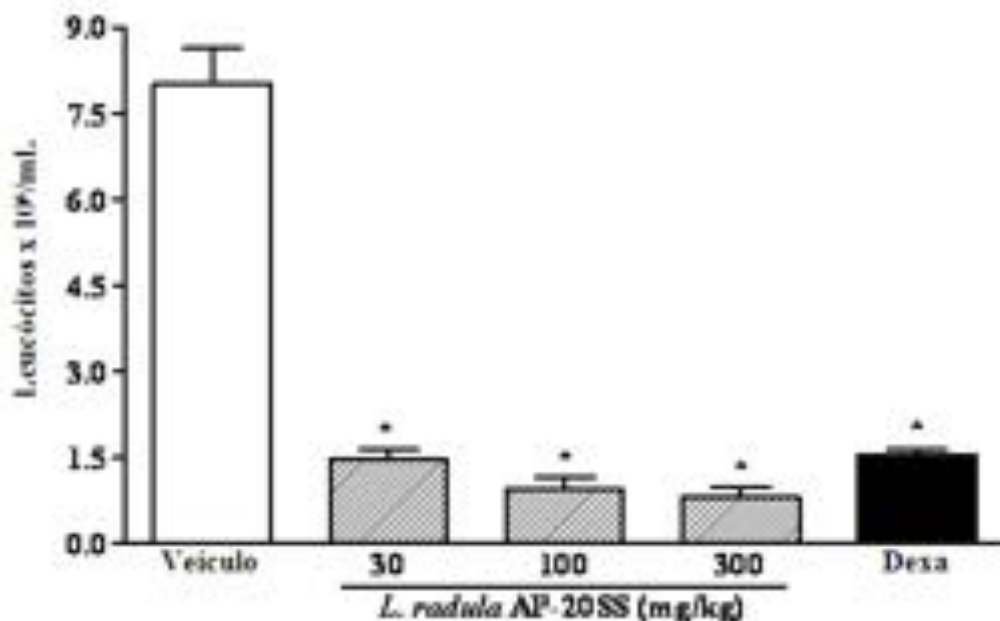


Figura 2. Efeito do *L. radula* AP-20SS sobre a migração leucocitária. Os camundongos foram tratados (v.o.) com o *L. radula* AP-20SS (30-300 mg/kg), dexametasona (Dexa, 2 mg/kg) ou veículo 60 min antes da peritonite induzida pela carragenina. Todos os valores estão apresentados como média \pm S.D. Análise estatística por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. * $P < 0,001$ vs. animais tratados com veículo ($n = 6$ /grupo).

O *L. radula* AP-20SS apresentou propriedade antioxidante revelada pela atividade sequestradora do radical NO e ensaio da peroxidação lipídica. Os compostos (radulosídeo, samiosídeo e isonuomiosídeo A) inibiram a geração do radical NO em todas as concentrações utilizadas. Contudo, a maior inibição foi em torno de 13%, enquanto o ácido ascórbico (droga referência) inibiu a geração de NO em mais de 80% em todas concentrações. Os compostos inibiram (57-99%) a peroxidação lipídica, de forma concentração-dependente e em todas as concentrações, em ambos ensaios do Fe^{2+} e do $Fe^{2+}+H_2O_2$.

O efeito anti-inflamatório da AP-20SS observado neste estudo pode estar relacionado a capacidade antioxidante de seus feniletanóides. Estes compostos previnem a formação de citocinas e mensageiros celulares essenciais, a ativação de sistemas enzimáticos importantes como as vias das fosfatases e dos fatores de transcrição, expressão gênica de proteínas inflamatórias além de sequestrarem radicais livres [2,17].

CONCLUSÕES

O extrato AP-20SS da *Lantana radula* apresentou propriedades anti-inflamatória e antioxidante e seus feniletanóides glicosídicos demonstraram ações antioxidantes. A atividade antioxidante dos compostos da *L. radula* pode ser responsável por alguns de seus efeitos medicinais, aqueles relacionados com a geração de radicais livres, como as propriedades anti-inflamatórias. A *L. radula* oferece componentes ativos promissores para o desenvolvimento de agentes farmacológicos potenciais para tratamento de

processos inflamatórios, contudo seus mecanismos de ação devem ser investigados mais profundamente.

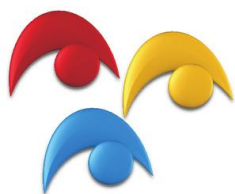
AGRADECIMENTOS

Este estudo foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. M.R. Barros-Junior e R.R. Marinho receberam bolsas da CAPES. J.S. Jandson recebeu bolsa da FAPITEC/SE. SMT é bolsista produtividade do CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ANJALIKA, G.I.; GUPTA, S.K.; GANGULY, N.K. Reactive oxygen intermediates and reactive nitrogen intermediates in copper intrauterine device users, **Contraception**, v. 59, p. 67-70, 1999.
- [2] KUNSCH, C.; MEDFORD, R.M. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature, **Circ. Res.**, v. 85, p. 753-766, 1999.
- [3] VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 39, p. 44-84, 2007.
- [4] BRACA, A.; SORTINO, C.; POLITI, M.; MORELLI, I.; MENDEZ J. Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*, **J. Ethnopharmacol.**, v. 79, p. 379-381, 2002.
- [5] GHISALBERTI, E. L. *Lantana camara* L. Verbenaceae, **Fitoterapia**, v. 71, p. 467-486, 2000.
- [6] BASU, S.; HAZRA, B. Evaluation of Nitric Oxide Scavenging Activity, *In Vitro* and *Ex Vivo*, of Selected Medicinal Plants Traditionally Used in Inflammatory Diseases, **Phytother. Res.**, v. 20, p. 896-900, 2006.
- [7] SILVA, G.N.; MARTINS, F.R.; MATHEUS, M.E.; LEITÃO, S.G.; FERNANDES, P.D. Investigation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Lantana trifolia*, **J. Ethnopharmacol.**, v. 100, p. 254-259, 2005.
- [8] SENA FILHO, J.G.; NIMMO, S.L.; XAVIER, H.S.; BARBOSA-FILHO, J.M.; CICHEWICZ, R.H. Phenylethanoid and Lignan Glycosides from Polar Extracts of *Lantana*, a Genus of Verbenaceous Plants Widely Used in Traditional Herbal Therapies, **J. Nat. Prod.** V. 72, p. 1344-1347, 2009.

- [9] HAUSMANN, M.; OBERMEIER, F.; PAPER, D.H.; BALAN, K.; DUNGER, N.; MENZEL, K.; FALK, W.; SCHOELMERICH, J.; HERFARTH, H.; ROGLER, G. *In vivo* treatment with the herbal phenylethanoid acteoside ameliorates intestinal inflammation in dextran sulphate sodium-induced colitis, **Clin. Exp. Immunol.** v. 148, p. 373-381, 2007.
- [10] LEE, J.Y.; LEE, J.G.; SIM, S.S.; WHANG, W.K.; KIM, C.J. Anti-asthmatic effects of phenylpropanoid glycosides from *Clerodendron trichotomum* leaves and *Rumex gemelini* herbes in conscious guinea-pigs challenged with aerosolized ovalbumin, **Phytomedicine.** v. 18, p. 134-142, 2011.
- [11] MENDES, S.S.; BOMFIM, R.R.; JESUS, H.C.R.; ALVES, P.B.; BLANK, A.F.; ESTEVAM, C.S.; ANTONIOLLI, A.R.; THOMAZZI, S.M. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves, **J. Ethnopharmacol.** v. 129, p. 391-397, 2010.
- [12] WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs, **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v. 111, p. 544-547, 1962.
- [13] BRADLEY, P.P.; PRIEBAT, M.; CHRISTENSEN, M.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker, **J. Invest. Dermatol.** v. 78, p. 206-209, 1982.
- [14] ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal, **Method. Enzymol.** v. 186, p. 407-421, 1990.
- [15] GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids, **Anal. Biochem.** v. 126, p. 131-138, 1982.
- [16] THOMAZZI, S.M.; SILVA, C.B.; SILVEIRA, D.C.R.; VASCONCELLOS, C.L.C.; LIRA, A.F.; CAMBUI, E.V.F.; ESTEVAM, C.S.; ANTONIOLLI, A.R. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Bowdichia virgilioides* (sucupira), **J. Ethnopharmacol.** v. 127, p. 451-456, 2010.
- [17] HANSELMANN, C.; MAUCH, C.; WERNER, S. Haemoxygenase-1: a novel player in cutaneous wound repair and psoriasis? **Biochem. J.** v. 353, p. 459-466, 2001.



EFEITOS BACTERIOSTÁTICO E BACTERICIDA DA LECTINA DA TESTA DE *Punica granatum* L. CONTRA ESPÉCIES GRAM POSITIVAS

¹P.M. SILVA, ¹F.S. GOMES, ²J.M. ARAÚJO, ¹L.C.B.B. COELHO, ¹P.M.G. PAIVA.

¹Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Bioquímica, Recife, Brasil;
polly.silva_3@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Antibióticos, Recife, Brasil

RESUMO

Lectinas são proteínas hemaglutinantes que apresentam atividade antimicrobiana. O fruto de *Punica granatum* (romã) é usado na medicina popular contra infecções causadas por microrganismos e como alimento. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana da lectina presente na testa de *P. granatum* (PgTeL) contra bactérias Gram-positivas causadoras de infecções em humanos. Extrato salino (10%, v/v) da testa foi tratado com sulfato de amônio (30% de saturação) e a fração sobrenadante 30% (FS30%) foi cromatografada em coluna de quitina equilibrada com NaCl 0,15 M. PgTeL foi eluída com ácido acético 1,0 M, dialisada contra água destilada e NaCl 0,15 M e avaliada quanto à atividade antibacteriana contra *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Streptococcus mutans*. Concentrações mínima inibitória (CMI) e bactericida (CMB) de PgTeL foram determinadas. PgTeL (atividade hemaglutinante específica: 19.430) mostrou atividade bacteriostática contra todas as bactérias testadas com CMI variando de 0,27 a 40 µg/mL e bactericida contra *E. faecalis*, *M. luteus*, *S. saprophyticus* e *S. mutans* com CMB variando de 8 a 68,4 µg/mL. Em conclusão, PgTeL possui potencial para aplicação contra agentes causadores de infecções em humanos.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de resistência bacteriana aos antibióticos atualmente utilizados tem estimulado a busca por agentes antibacterianos contra espécies de interesse médico. As lectinas constituem um grupo heterogêneo de proteínas que aglutinam diferentes tipos de células ao interagirem com glicoconjugados presentes na superfície celular. Lectinas têm apresentado diversas atividades biológicas, inclusive atividade antibacteriana (OLIVEIRA *et al.*, 2008; SÁ *et al.*, 2009; NUNES *et al.*, 2011; GOMES *et al.*, 2013). A interação de lectinas com ácidos teicóicos e peptidoglicanos presentes na parede celular de bactérias gram-positivas resulta em inibição do crescimento (atividade bacteriostática) ou morte (atividade bactericida) do

microrganismo (Paiva *et al.*, 2010). A romã (*Punica granatum* L.) é uma espécie frutífera pertencente à família Lythraceae (HUANG e SHI, 2002). O fruto da romã é utilizado pela população para tratamento de faringite, gengivite, laringite, disenteria e infecções vaginais causadas por fungos (LANSKY & NEWMAN, 2007; AL-ZOREKY, 2009; LEE *et al.*, 2010). A lectina da testa de romã (PgTeL) é isolada por procedimento que disponibiliza 3,6 mg de proteína e compreende a extração de proteínas em solução salina, fracionamento com sulfato de amônio e cromatografia em coluna de quitina (SILVA & PAIVA, 2011). O presente trabalho avaliou a atividade antibacteriana de PgTeL contra espécies Gram-positivas (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Streptococcus mutans*) causadoras de infecções em humanos.

OBJETIVO

Avaliar a atividade antibacteriana da lectina presente na testa de *P. granatum* (PgTeL) contra bactérias Gram-positivas causadoras de infecções em humanos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolamento de PgTeL: A lectina foi isolada de acordo com Silva & Paiva (2011). Testa de romã (tegumento externo gelatinoso que recobre as sementes) foi misturada com NaCl 0,15 M na proporção de 10% (v/v). A mistura foi submetida à agitação constante. Após filtração em gaze e centrifugação do filtrado, o sobrenadante foi denominado extrato. O extrato foi tratado com sulfato de amônio (30% de saturação) sob agitação e após centrifugação, a fração sobrenadante (FS30%) foi dialisada contra água destilada e NaCl 0,15 M. Para isolamento de PgTeL, a FS30% (3,9 mg de proteínas) foi cromatografada em coluna de quitina equilibrada com NaCl 0,15 M. Após a etapa de lavagem com a solução de equilíbrio, PgTeL foi eluída com ácido acético 1,0 M. A lectina foi dialisada contra água destilada (4 h) e NaCl 0,15 M (4 h) para eliminação do eluente.

Determinação da concentração de proteínas: A estimativa da concentração de proteínas foi efetuada de acordo com Lowry *et al.* (1951), utilizando-se curva padrão de albumina sérica bovina (31,25–500 µg/mL).

Determinação de atividade hemaglutinante (AH): O ensaio foi realizado de acordo com Paiva & Coelho (1992) utilizando eritrócitos de coelho fixados em glutaraldeído. A AH foi definida como o inverso da maior diluição da amostra capaz de promover aglutinação dos eritrócitos. A AH específica (AHE) foi definida como a razão entre a AH e a concentração protéica (mg/mL).

Determinação de atividade antibacteriana: A atividade antibacteriana de PgTeL contra *E. faecalis*, *E. faecium*, *M. luteus*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* e *S. mutans* foi realizada seguindo a metodologia de Amsterdam (1996). A concentração

mínima inibitória (CMI) correspondeu à menor concentração da amostra na qual ocorreu inibição do crescimento $\geq 50\%$ e a concentração mínima bactericida (CMB) correspondeu à menor concentração da amostra em que não foi observado crescimento bacteriano.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir de 151 mL da testa foram extraídas 2,1 g de proteínas. O extrato (AHE de 18,3) foi submetido ao processo de fracionamento salino com sulfato de amônio e a FS30% resultante apresentou AHE de 781. PgTeL foi eluída da coluna de quitina com ácido acético 1 M como único pico protéico (Figura 1). PgTeL apresentou AHE de 19.430, evidenciando um fator de purificação de 24,9 vezes. A maior AHE de PgTeL em relação ao extrato, preparação de partida para o isolamento da lectina, revela que a utilização de sulfato de amônio e cromatografia em coluna de quitina resultaram em purificação da lectina, como previamente determinado por Silva & Paiva (2011).

A avaliação da atividade antibacteriana de PgTeL (Tabela 1) revelou atividade bacteriostática contra todas as bactérias testadas apresentando maior efeito contra *S. Saprophyticus* com CMI de 0,27 $\mu\text{g/mL}$. PgTeL foi um agente bactericida mais eficiente contra *Streptococcus mutans* com CMB de 9 $\mu\text{g/mL}$ e não promoveu mortalidade de *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*.

A lectina da testa de *P. granatum* (PgTeL) foi mais eficiente contra as bactérias gram-positivas *E. faecalis* e *S. aureus* do que a lectina isolada a partir do veneno da cobra *Bothrops leucurus*, que apresentou valores de CMI de 62,5 e 31,5 $\mu\text{g/mL}$, e CMB de 330 e 500 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (NUNES *et al.*, 2011). A lectina ligadora de quitina isolada de sementes de *Araucaria angustifolia* mostrou atividade antibacteriana contra a bactéria Gram-positiva *Clavibacter michiganensis* causando a formação de poros e rompimento da parede celular (SANTI-GADELHA *et al.*, 2006). A presença de peptidoglicano (que contém resíduos de N-acetil-glicosamina) na parede celular de bactérias gram-positivas pode promover sítios de ação para lectinas ligadoras de quitina como PgTeL.

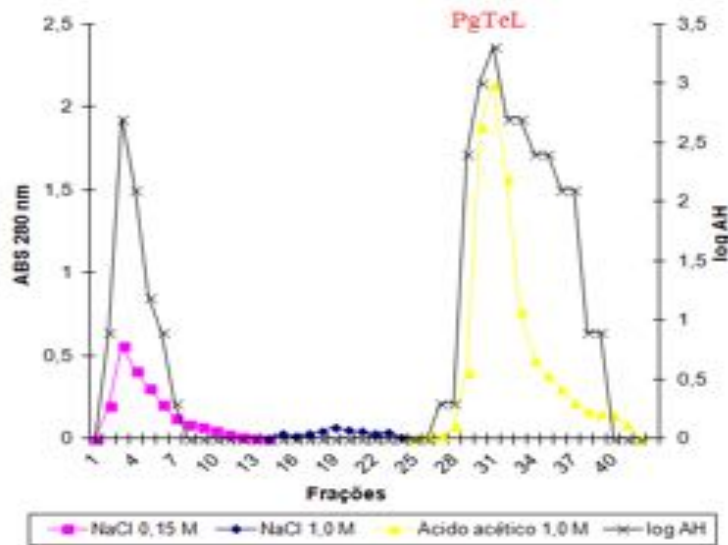


Figura 1: Cromatograma do isolamento da lectina PgTeL utilizando coluna de quitina.

Tabela 1. Atividade antibacteriana da lectina da testa de *P. granatum*.(PgTeL)

Bacterias	PgTeL	
	CMI	CMB
<i>Enterococcus faecalis</i>	4,28	68,4
<i>Enterococcus faecium</i>	40	ND
<i>Micrococcus luteus</i>	8	8
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	ND
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	16	ND
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	0,27	68,4
<i>Streptococcus mutans</i>	9	9

CMI (Concentração mínima inibitória) e CMB (Concentração Mínima Bactericida) expressos em µg/mL. ND (não determinado).

CONCLUSÃO

PgTeL, a lectina isolada da testa de *P. granatum*, tem potencial uso como agente antibacteriano contra espécies Gram-positivas que causam infecções em humanos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos órgãos financiadores Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI).

REFERÊNCIAS

- AL-ZOREKY, N. S. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, p. 244-248, 2009.
- AMSTERDAM, D. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. In: LOMAN, V. (Ed.), **Antibiotics in laboratory medicine**. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 52-111, 1996.
- GOMES, F. S. *et al.* Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. **Journal of applied microbiology**, v. 114, n. 3, p. 672-679, 2013.
- HUANG, Y.; SHI, S. Phylogenetics in the Lythraceae sensu lato: A preliminary analysis based on plastic *rbcL* and *psaA-ycf3* spacer, and ITS of nrDNA sequences. **International Journal of Plant Sciences**, v. 163, p. 215 – 225, 2002.
- LANSKY, E. P.; NEWMAN, R. A.. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. **Journal of ethnopharmacology**, v. 109, p. 177-206, 2007.
- LEE, C. J. *et al.* Anti-inflammatory effects of *Punica granatum* Linne *in vitro* and *in vivo*. **Food Chemistry**, v. 118, p. 315-322, 2010.
- LOWRY, O.H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.
- NUNES, E. S., *et al.* Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 159, p. 57-63, 2011.
- OLIVEIRA, M.D.L. *et al.* Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, p. 371-376, 2008.
- PAIVA, P. M. G. *et al.* Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. In: **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, p. 396-406, 2010.

- PAIVA, P.M.G.; COELHO, L.C.B.B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 36, p.113-118, 1992.
- SÁ, R.A. *et al.* Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood. **Wood Science and Technology**, v. 43, p. 85-95, 2009.
- SANTI-GADELHA, T. *et al.* Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 350, p. 1050-1055, 2006.
- SILVA, P.M.; PAIVA, P.M.G. Avaliação da presença de lectina em testa de *Punica granatum* (Romã). In: **Anais do XIX Congresso de Iniciação Científica da UFPE**, 2011.



EFEITOS CARDIOVASCULARES DO 1-NITRO-2-[(4'-METOXI)-FENIL]-ETENO E 1-NITRO-2-[(4'-DIMETILAMINA)-FENIL]-ETENO, DOIS DERIVADOS DO 1-NITRO-2-FENILETENO, EM RATOS HIPERTENSOS

¹T.R.A. SANTOS, ²O.A. SILVA, ³M.A. ROCHA, ⁴G.I. B.P. DUARTE, ⁵S. LAHLOU

¹Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Cardiovascular, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. thayanerebek@gmail.com

^{2,3,4}Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Cardiovascular, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco.

⁵ Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza

Introdução: Previamente, foi mostrado por nosso grupo que o 1-nitro-2-feniletano (NF), o principal constituinte do óleo essencial da *Aniba canellila*, possui efeitos vasorrelaxantes e reduz a pressão arterial. Mais recentemente, foi observado que o 1-nitro-2-feniletano (NFE), um derivado sintético do NF, possui uma potência vasodilatadora 3 a 4 vezes maior do que o NF. Sabendo que os grupamentos metoxila e dimetilamina são elétron-doadores e podem alterar o aspecto eletrônico da molécula do NFE, investigou-se os efeitos vasculares de dois derivados do NFE, o 1-nitro-2-[(4'-metoxi)-fenil]-eteno (I) e 1-nitro-2-[(4'-dimetilamina)-fenil]-eteno (II) em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). **Métodos:** Preparações de artéria mesentérica superior (SMA). **Resultados e Discussão:** Em SMA, concentrações crescentes (2 a 1000 microM) dos derivados I e II relaxou as contrações com fenilefrina com valores de CI_{50} (média geométrica [95% intervalo de confiança] de 22,41 [27,52 – 15,23] e 17,13 [31,29 – 11,82] microg/mL. Estes valores não foram modificados pela remoção do endotélio, porém foram reduzidos ($p < 0,05$) pelo pré-tratamento com ODQ (1H-[1,2,4]-oxadiazol-[4,3-a]-quinoxalin-1-ona), um inibidor da guanilato ciclase. **Conclusão:** Os derivados I e II induziram vasorrelaxamento independente da integridade endotelial que parece envolver a participação da via guanilato ciclase/GMPc/PKG.

Apoio: CNPq, FACEPE.

Palavras-chave: 1-nitro-2-feniletano, artéria mesentérica isolada, ratos espontaneamente hipertensos, relação estrutura-atividade.



ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DO ENDOCARPO DO FRUTO DE *SCHINOPSIS BRASILIENSIS* ENGL. FRENTE A BACTÉRIAS DE INTERESSE CLÍNICO

**ALMEIDA, I. V.¹; SIMÕES, C. F. S.¹; SARAIVA, A.M.¹; XAVIER, H.S.²;
CAETANO, M.N.C.¹**

1. Laboratório de Análises Microbiológicas, Depto. de Ciências Farmacêuticas- Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
2. Laboratório de Farmacognosia, Depto. de Ciências Farmacêuticas- Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

Introdução: A *Schinopsis brasiliensis* (“Braúna”) é uma árvore endêmica, distribuída na região semi-árida do Brasil. O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana do extrato metanólico do fruto de *S. Brasiliensis* (BENM) frente a bactérias de interesse clínico. **Metodologia:** O BENM foi seco por rota- evaporação a vácuo e posteriormente solubilizado em DMSO a 50%. A atividade antimicrobiana de BENM foi realizado pela técnica de poços/difusão em agar (PDA), nas concentrações de 10 e 5 mg/poço, e por determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) diluição em agar, nas concentrações de 0,031 à 2 mg/mL. As cepas ensaiadas foram: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella* spp. O antibiótico padrão para ambas as técnicas foi a Tetraciclina 30 µg/poço para PDA e 0.062 a 64 µg/mL para CMI. **Resultados:** Os halos, nas concentrações de 10 mg/poço/5 mg/poço e CMI obtidos, respectivamente, de 26 mm/17 mm e 2000 µg/mL, 24 mm/18 mm e 2000 µg/mL, 20 mm/18 mm e 2000 µg/mL, 18 mm/16 mm e 1000 µg/mL frente as cepas de *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa*, respectivamente. Para a tetraciclina os halos de inibição e CMI respectivamente, foram da ordem 20 mm e 1 µg/mL frente a *E. coli* e 25 mm e 0,5 µg/mL frente *S. aureus*. **Conclusões:** Os resultados obtidos são promissores, o que justifica prosseguir com maiores estudos para o fracionamento e/ou obtenção dos ativos isolados.

Apoio: UFPE

Palavras-chave: Endocarpo do fruto; *Schinopsis brasiliensis*; Atividade antimicrobiana.



**GT-III COMO UM MARCADOR DE BOM PROGNÓSTICO:
UMA ANÁLISE DA EXPRESSÃO IMUNO E HISTQUÍMICA DE GT-III E L-
PHA EM CARCINOMAS DUCTAIS IS SITU E INVASIVOS**

**^{1,2}A.F. SILVA FILHO, ¹G.S.V. MELLO, ¹P.B. SANTOS, ¹A. RIBEIRO-SILVA,
^{1,2}M.J.B.M. RÊGO, E.I.C. BELTRÃO¹.**

¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco
(LIKA-UFPE)

²Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica – Suely Galdino, Universidade Federal
de Pernambuco (NUPIT-SG-UFPE)

ABSTRACT

A formação do cancer é influenciada por fatores de risco, características clínicas e pelo glicocódigo celular, o qual pode ser moldado por GTs. Neste contexto, o presente trabalho possui o objetivo de analisar a expresssão de GT-III e do carboidrato produto de GT-V em amostras compostas apenas por CDIS puras e mistas com CDI, e tentar associar aos aspectos clínicos. Por isso, 100 amostras de carcinoma mamário foram submetidas à imuno-histoquímica e histoquímica com L-PHA. Os resultados analisados através de teste X² revelaram que a expressão de GT-III esteve associada com lesões comedônicas do CDIS, não havendo associação com o CDI. Além disso, em amostras de CDI as expressões de GT-III e L-PHA ocorreram de maneira antagonista, indicando o papel de GT-III como um fator de bom prognóstico.

INTRODUÇÃO

Câncer de mama é a principal neoplasia maligna que acomete a população feminina em todo o mundo (JEMAL et al, 2007) As duas lesões tumorais associadas as glândulas mamárias mais estudadas são os carcinomas ductal in situ (CDIS), lesão considerada pré-maligna não-invasiva, e o carcнома ductal invasivo (CDI), aressivo e com alto potencial metastático (MOHAN; PONNUSANKAR, 2013).

O nível de desenvolvimento de ambos os tipos de carcinoma mamário ode ser afetado por fatores de risco, tais como idade, histórico familiar, menarca antecipada e menopausa tardia, ou por aspectos clínicos tumorais, como o grau nuclear, subtipagem morfológica e estatos hormonal (TURKOZ; SOLAR; PETEKKAYA et al, 2013). Aém disso, o perfil glicobiológico em diferentes tipos de cancer tem sido apontado como

uma modificação molecular chave na determinação da maneira através da qual ocorre a emergência e o desenvolvimento tumoral. (PINHO; OLIVEIRA; CABRAL et al, 2012).

A remodelação dos oligossacarídeos de superfície celular por glicosiltransferases vem sendo apresentado como um fator crucial para os diversos aspectos funcionais das glicoproteínas, especialmente no microambiente tumoral. Neste contexto, GT-III realiza a transferência de N-acetilglicosamina (GlcNAc) para a manose em N-glicanos através de uma ligação β 1,4, sendo considerada uma glicosiltransferase chave na via de biossíntese de N-glicanos (PINHO; SERUCA; GARTNER et al, 2011).

A introdução de bifurcados de GlcNAc impede o processamento e alongamento de N-glicanos catalisado por GT-V, suprimindo a formação de estruturas ramificadas de β 1,6 GlcNAc, as quais podem ser reconhecidas pela lectina L-PHA. No ambiente tumoral, GT-III e GT-V tem de maneira geral um papel duplo onde GT-III atua como um supressor de metástase enquanto GT-V pe associado com o aumento da malignidade e metástase (ZHAO; NAKAGAWA; ITOH et al, 2006).

OBJETIVO

Devido à ausência de estudos envolvendo a atividade de GT-III em tumores de mama e acreditando na possível utilização da expressão de glicosiltransferases como fator de prognóstico, nosso trabalho procurou realizar uma análise da expressão tecidual de GT-III e do carboidrato produto de GT-V em dois tipos distintos de carcinoma mamário. Adicionalmente, tentou-se associar o perfil de expressão com os aspectos clínicos obtidos.

MATERIAIS E METODOS

Imunohistoquímica

Cortes de 3 mm foram obtidos a partir de 100 blocos parafinizados de e as reações imunohistoquímicas foram realizadas com o Mach 4 Universal kit de detecção de polímero (Biocare Medical, CA, EUA), de acordo com Ribeiro-Silva et al. (2006) e Santos et al. (2012). As concentrações dos anticorpos anti-GT-III (1:100) e anti-GT-V (1:100) foram adquiridas da Sigma Aldrich, Missouri (EUA), e os anticorpos monoclonais são de Novocastra, Newcastle upon Tyne, era ER (1 : 100), PR (1:100), HER-2 (1:100). Casos de CDIS anteriormente conhecidos por serem positivos para ER, PR e HER-2 foram usados como controles positivos. Já os controles negativos foram preparados omitindo o anticorpo primário.

Histoquímica com lectinas

A lectina *Phaseolus vulgaris* (L-PHA; Vector Labs, Burlingame, CA, USA) conjugada à biotina foi utilizada. Os cortes teciduais foram então incubados com o polímero de estreptavidina-peroxidase (Sigma Aldrich, Missouri, USA) e marcação da lectina revelada com diaminobenzidina seguido de contracoloração com hematoxilina.

Os controles negativos para todas as secções foram preparados através da substituição da lectina por PBS.

Hibridação Cromogênica in situ (CISH)

Casos HER-2 Positivo (2 +) também foram avaliados por hibridação cromogênica in situ (CISH). O ZytoDot 2C SPEC HER2/CEN 17 kit (ZytoVision, Bremerhaven, Alemanha) foi utilizada para a detecção do gene HER-2 humano e alfa-satélites do cromossoma 17.

Estatística

A análise estatística foi realizada de acordo com Santos et al. (2012). As relações entre os achados histoquímicos e imunohistoquímicos e as características clínico-patológicas foram testadas com quadros cruzados que aplicam o χ^2 (três ou mais variáveis) ou testes de Fisher (2 variáveis), e todos os testes foram o 2-atado (Tabela 1 e 2).

RESULTADOS AND DISCUSSÃO

As 100 amostras de CDIS puros (n=47) e CDI-CDIS (n=43) eram de pacientes cuja média de idade foi de 51 anos . No entanto, a inviabilidade no processo de obtenção das amostras levou à falta de informação sobre os aspectos clínicos em alguns casos .

Os testes estatísticos revelaram que dentre as 34 amostras de DCIS puros, 18 continham o subtipo morfológico comedônico, e destes, 88,89 % (n = 16) foram positivas para GT -III, com p=0,007 (Tabela 1). No entanto, não há mais significância para essa relação nas amostras que contêm o componente invasivo, indicando a importância de GT-III para um fenótipo tumoral menos agressivo, como já afirmado por outros estudos (XU; ISAJI; LU et al, 2012; AKAMA; SATO; KARIYA et al, 2012). Entretanto, é notavelmente contraditório que a expressão aumentada de GT-III tenha sido associada a níveis elevados em amostras nucleares CDI-CDIS (p=0,039) e com uma subtipo morfológico discutido como um mais receptivos à malignidade, por conseguinte, tais dados podem ser reflexo de um aumento na atividade de GT-III antes da transição epitelio-mesênquimal (Tabela 2).

Os resultados referentes às lesões CDI-CDIS mostraram que a expressão de GT-III encontrou-se inversamente associada à marcação por L-PHA. Um achado esperado uma vez que a lectina possui afinidade por β 1,6- GlcNAc, carboidrato produto de GT-V. Uma vez que são enzimaticamente competitivas, as estruturas bifurcadas de β 1,4-GlcNAc produzidas por GT- III impedem a ação de GT- V, a qual não detém a capacidade de atuar sobre os complexos binários de oligossacarídeos(TANIGUCHI; MIYOSHI; KO et al, 1999). Além disso, L-PHA marcou a expressão alterada de GlcNAc presente em mulheres com idade menor do que a média (51 anos), p = 0,047 (Tabela 2). O que se relaciona com a actividade exacerbada de GT- V em tumores que

contam com elevada capacidade metastática (ZHAO; NAKAGAWA; ITOH et al, 2006).

Tabela 1. Relação entre a marcação de GT-III e L-PHA com os fatores clinicopatológicos e os marcadores imunohistoquímicos em lesões de CDIS.

Aspectos	GT-III ⁻	GT-III ⁺	P-valor	L-PHA ⁻	LPHA ⁺	P-valor
Clinicopatológicos	n (%)			n (%)		
Idade (anos)						
<50	6 (37,5)	12 (66,7)	0,087 ^a	9 (47,4)	10 (52,6)	0,637 ^a
>50	10 (62,5)	6 (33,3)		3 (50,0)	3 (50,0)	
Estatos						
Menopausal						
			0,087 ^a			0,637 ^a
Pré-menopausal	6 (37,5)	12 (66,7)		9 (47,4)	10 (52,6)	
Pós-menopausal	10 (62,5)	6 (33,3)		3 (50,0)	3 (50,0)	
Tamanho (cm)						
<20	8 (50,0)	4 (22,2)		5 (26,3)	2 (33,3)	
20-50	5 (31,3)	10 (55,6)	0,222 ^b	9 (47,4)	4 (66,7)	0,371 ^b
>50	3 (18,8)	4 (22,2)		5 (26,3)	0 (0)	
Grau Nuclear						
Baixo	4 (25,0)	4 (22,2)		5 (26,3)	2 (33,3)	
Intermediário	4 (25,0)	0 (0)	0,039^b	2 (10,5)	0 (0)	0,697 ^b
Alto	8 (50,0)	14 (77,8)		12 (63,2)	4 (66,7)	
Multifocal						
Sim	8 (50,0)	6 (33,3)	0,262 ^a	11 (57,9)	5 (83,3)	0,267 ^a
Não	8 (50,0)	12 (66,7)		8 (42,1)	1 (16,7)	
Comedônico +						
Sim	9 (56,3)	2 (11,1)	0,007^a	13	6 (100)	0,153 ^a

				(68,4)		
Não	7 (43,7)	16 (88,9)		6 (31,6)	0 (0)	
RE						
Negativo	3 (18,8)	7 (41,2)	0,154 ^a	7 (36,8)	0 (0)	0,105 ^a
Positivo	13 (81,3)	10 (58,8)		12 (63,2)	6 (100)	
RP						
Negativo	2 (16,7)	8 (50,0)	0,076 ^a	8 (42,1)	0 (0)	0,070 ^a
Positivo	10 (83,3)	8 (50,0)		11 (53,9)	6 (100)	
HER-2						
Negativo	3 (42,9)	1 (7,7)	0,101 ^a	4 (21,1)	1 (16,7)	0,657 ^a
Positivo	4 (52,1)	12 (92,3)		15 (79,8)	5 (83,3)	

^aFisher; ^bChi-quadrado.

Tabela 2. Relação entre a marcação de GT_III e L-PHA com os fatores clinicopatológicos e os marcadores imunohistoquímicos em lesões de CDI-CDIS.

Clinicopathologic Features	GT-III ⁻	GT-III ⁺	P-value	L-PHA ⁻	L-PHA ⁺	P-value
	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
Idade (anos)						
<50	2 (50,0)	17 (43,6)	0.602 ^a	10 (35,7)	9 (50,0)	0.047^a
>50	2 (50,0)	22 (56,4)		18 (64,3)	4 (50,0)	
Estatos						
Menopausal			0.602 ^a			0.374 ^a
Pré-menopausal	2 (50,0)	17 (43,6)		12 (42,9)	7 (53,8)	
Pós-menopausal	2 (50,0)	22 (56,4)		16 (57,1)	6 (46,2)	
Tamanho (cm)						

<20	2 (50,0)	13 (33,3)		10 (37,5)	5 (38,5)	
20-50	2 (50,0)	22 (56,4)	0,696 ^b	14 (50,0)	8 (61,5)	0,351 ^b
>50	0 (0)	4 (10,4)		4 (14,3)	0 (0)	
Grau Nuclear						
Baixo	2 (4,8)	2 (7,7)		1 (3,6)	3 (23,1)	
Intermediário	0 (14,3)	5 (12,8)	0,039^b	3 (10,7)	3 (23,1)	0,061 ^b
Alto	2 (54,7)	31 (79,5)		24 (85,7)	7 (53,8)	
Multifocal						
Sim	3 (75,0)	24 (61,5)	0,521 ^a	16 (57,1)	9 (69,2)	0,350 ^a
Não	1 (25,0)	15 (38,5)		12 (42,9)	4 (30,8)	
Comedônico +						
Sim	2 (50,0)	26 (66,7)	0,436 ^a	19 (67,9)	7 (53,8)	0,300 ^a
Não	2 (50,0)	13 (33,3)		9 (32,1)	6 (46,2)	
RE						
Negativo	0 (0)	8 (21,1)	0,414 ^a	7 (25,0)	2 (15,4)	0,399 ^a
Positivo	4 (100)	30 (78,9)		21 (75,0)	11 (84,6)	
RP						
Negativo	0 (0)	15 (38,5)	0,166 ^a	8 (28,6)	4 (30,8)	0,581 ^a
Positivo	4 (100)	24 (61,5)		20 (72,4)	9 (69,2)	
HER-2						
Negativo	4 (100)	19 (54,3)	0,108 ^a	11 (39,3)	12 (92,3)	0,001^a
Positive	0 (0)	16 (45,7)		17 (60,7)	1 (7,7)	

^aFisher's exact test; ^bChi-square test

CONCLUSÃO

Com base nesses resultados, é possível sugerir que a L-PHA permite a detecção da expressão exacerbada de β 1,6-GlcNAc em tumores de mulheres mais jovens. Em contraste, a expressão de GT-III pode ser utilizada como um marcador de bom prognóstico, cuja presença é encontrada associada ao carcinoma ductal in situ.

REFERENCIAS

AKAMA, R.; SATO, Y.; KARIYA, Y.; ISAJI, T.; FUKUDA, T.; LU, L.; TANIGUCHI, N.; OZAWA, M.; GU, J. *N*-Acetylglucosaminyltransferase III expression. is regulated by cell-cell adhesion via the E-cadherin-catenin-actin complex. ***Proteomics***. V. 8, p. 3221–3228. 2008.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; MURRAY, T.; XU, J.; THUN, M. Cancer statistics 2007. ***CA Cancer J Clin***. V. 57, p. 43–66. 2007.

MOHAN, A.; PONNUSANKAR, S. Newer Therapies for the Treatment of Metastatic Breast Cancer: a Clinical Update. ***Indian J Pharm Sci***. V. 75, n. 3, p. 251–261. 2013.

PINHO, S. S.; OLIVEIRA, P.; CABRAL, J.; CARVALHO, S.; HUNTSMAN, D.; GARTNER, F.; SERUCA, R.; REIS, C. A.; OLIVEIRA, C.; Loss and Recovery of Mgat3 and GnT-III Mediated Ecadherin N-glycosylation Is a Mechanism Involved in Epithelial-Mesenchymal-Epithelial Transitions. ***PLoS ONE***. V. 7, n.3, p. 33191. 2012.

PINHO, S. S.; SERUCA, R.; GARTNER, F.; YAMAGUCHI, Y.; GU, J.; TANIGUCHI, N.; REIS, C. A. Modulation of E-cadherin function and dysfunction by *N*-glycosylation. ***Cellular and Molecular Life Sciences***. V. 68, p. 6, p. 1011-1020. 2011.

RIBEIRO-SILVA, A.; MOUTINHO, M. A. H.; MOURA, B.; VALE, F. R.; ZUCOLOTO, S. Expression of checkpoint kinase 2 in breast carcinomas: correlation with key regulators of tumor cell proliferation, angiogenesis, and survival. ***Histol Histopathol***. V. 21, n. 4, p. 373–382. 2006.

SANTOS, P. B.; ZANETTI, J. S.; RIBEIRO-SILVA, A.; BELTRÃO, E. I. C. Beta 1 integrin predicts survival in breast cancer: a clinicopathological and immunohistochemical study. ***Diagnostic Pathology***. V. 7, N.104. 2012.

TANIGUCHI, N.; MIYOSHI, E.; KO, J. H.; IKEDA, Y.; IHARA, Y. Implication of N-acetylglucosaminyltransferases III and V in cancer: gene regulation and signaling mechanism. **Biochimica et Biophysica Acta**. P. 287^300. 1999.

TURKOZ, F. P.; SOLAK, M.; PETEKKAYA, I.; KESKINB, O.; KERTMENB, N.; SARICI, F.; ARIK, Z.; BABACANB, T.; OZISIK, Y.; ALTUNDAG, K. Association between common risk factors and molecular subtypes in breast. **The Breast**. V 22, p. 344e350.

XU, Q.; ISAJI, T.; LU, Y.; GU, W.; KONDO, M.; FUKUDA, T. DU, Y.; GU, J. Growth Factor b1 (TGF-b1) in Epithelial Transition Induced by Transforming III in Epithelial-to-Mesenchymal Roles of N-Acetylglucosaminyltransferase Cell Lines. **J. Biol. Chem.** V. 287, p. 16563-16574. 2012.

ZHAO, Y.; NAKAGAWA, T.; ITOH, S.; INAMORI, K.; ISAJI, T. et al. NacetylglucosaminyltransferaseIII antagonizes the effect of N acetylglucosaminyltransferase V on alpha3beta1 integrin-mediated cell migration. **J Biol Chem**. V. 281, p. 32122–32130. 2006.



INFLUÊNCIA DA HIGROSCOPICIDADE NA ESTABILIDADE DO ANTIRRETROVIRAL FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA (FTD)

¹M.G.M. MACÊDO, ¹J.P. AVELINO, ¹T.A. GOMES, ¹C.B.M. FIGUEIRÊDO, ¹M.M. ALBUQUERQUE, ²L.A. ROLIM, ³P.J. ROLIM NETO, ¹M.F.R. SOARES, ¹J.L. SOARES SOBRINHO

¹Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco.

Email: grazyinhaah.macedo@gmail.com

²Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF). Campus Petrolina I.

³Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco.

RESUMO

Tendo em vista os potenciais entraves em torno da estabilidade do FTD, o trabalho testou sua higroscopicidade e avaliou esta influência sobre a estabilidade do fármaco. O FTD foi submetido a diferentes condições de umidade relativa (UR), sendo estas amostras analisadas por Difração de Raio-X (DRX), Microscopia (MEV) e análise térmica (TG e DTA). Neste período houve aumento próximo a 3,09% e 9,16% no peso do FTD quando submetido à UR de 74% e 96%, respectivamente; não havendo, no entanto, alterações na característica física do material, comprovada através da DRX e MEV. Por TG/DTA foi possível identificar que não houve alterações na sua estabilidade térmica. Assim, o FTD mostrou ser higroscópico, mas esta característica não influenciou na sua estabilidade física e térmica.

INTRODUÇÃO

O tenofovir (TEN; 1-(6-aminopurin-9-il) propan-2-iloximetilfosfônico ácido) pertence a classe dos antirretrovirais inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleotídeos (ITRN). Quimicamente, o tenofovir é um análogo da adenosina 5'-monofosfato (DELAHUNTY et al, 2006). É o primeiro ITRN aprovado para utilização no tratamento da infecção pelo HIV. A adição de dois ésteres alquil metil carbonato melhoraram a estabilidade, a absorção intestinal e a biodisponibilidade oral do tenofovir, permitindo sua transformação na pró-droga FTD e sua formulação como um comprimido para administração oral (KEARNEY et al., 2004). Em relação às suas características físico-químicas, o FTD é um pó cristalino branco a quase branco, sem odor, com massa molecular de 635,52. Apresenta pouca solubilidade em água, é solúvel em metanol e muito pouco solúvel em diclorometano (DECHRISTOFORO e PENZAK, 2004; USP,

2012). A estabilidade é um fator crítico para este pró-fármaco visto que apresenta grande número de impurezas reconhecidas pela Farmacopeia Internacional e Americana (WHO, 2009; USP, 2011) e é susceptível a degradação nos meios ácido, básico, neutro, oxidativo e fotolítico (HAVELE, DHANESHWAR, 2012a; HAVELE, DHANESHWAR, 2012b; ASHENAFI et al., 2010).

Paralelamente, a umidade é um fator que influencia a estabilidade físico-química e microbiológica dos materiais sólidos na forma de pó, além de poder afetar as características reológicas do produto, que são essências para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica sólida (CHAVES; COSTA, 2009).

OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo determinar a higroscopicidade do FTD e avaliar a influência dessa característica sobre a estabilidade física e térmica deste pró-fármaco.

MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizou-se FTD – fabricante CDYMAX INDIA PHARMA PVT. LTD, Lote CD110081 (cedido pela Cristalia Prod. Quim. Farmacêuticos LTDA).

Determinação da higroscopicidade do FTD

Foram seguidas técnicas adaptadas de Lemos Senna et al. (1997) e De Souza et al. (2000). Para tal, amostras de 0,5 g, em triplicata, foram acondicionadas em pesa-filtros e mantidas em dessecador, o qual garante a saturação sob UR constante, em temperatura ambiente (termohigrômetro digital J. Prolab® modelo SH 122). Em seguida, as amostras foram submetidas às UR de 28%, 74% e 95%, utilizando sílica, solução de uréia e solução de monofosfato de cálcio, respectivamente.

As amostras foram analisadas nos tempos: 0, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 dias e a porcentagem de água absorvida (% U) foi calculada em relação ao peso (g) da amostra seca (Ps) e úmida (Pu): $U = [(Pu-Ps)/Ps*100]$. As amostras foram posteriormente analisadas por DRX, MEV e TG/DTA.

Difração de Raio-X (DRX)

Foi utilizado o difratômetro D5000 da SIEMENS®, equipado com ânodo de cobre a uma velocidade de varredura de $1,2^{\circ}\text{min}^{-1}$, na faixa do ângulo 2θ de 3° - 45° .

Microscopia Eletrônica de Varredura (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® modelo SCD 050. As análises de MEV do sulfato de HCQ foram obtidas por microscópio eletrônico de varredura da JOEL®, modelo JSM-5900.

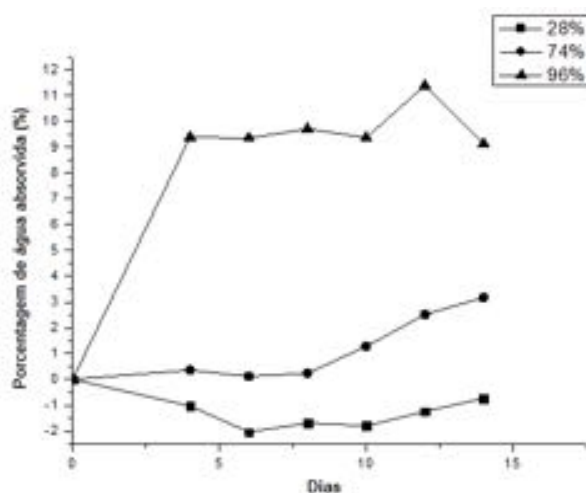
Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial (TG/DTA)

Foi utilizada a termobalança modelo DTG-60H Shimadzu[®], comparando o comportamento térmico do FTD (isento de umidade) com o FTD após ser submetido à UR 96%, por ser esta a condição mais crítica e, portanto, mais propícia de alterações; utilizando para ambos os casos 6 mg (± 0.2) de amostra, entre 25 e 600° C, razão de 10° C.min⁻¹, sob atmosfera dinâmica de N₂ (fluxo: 50 mL.min⁻¹).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As propriedades higroscópicas do FTD foram determinadas pela sorção de água em diferentes condições de umidade (28%, 74% e 96%), cujas curvas estão representadas na Figura 1.

Figura 1: As curvas de sorção de umidade do FTD



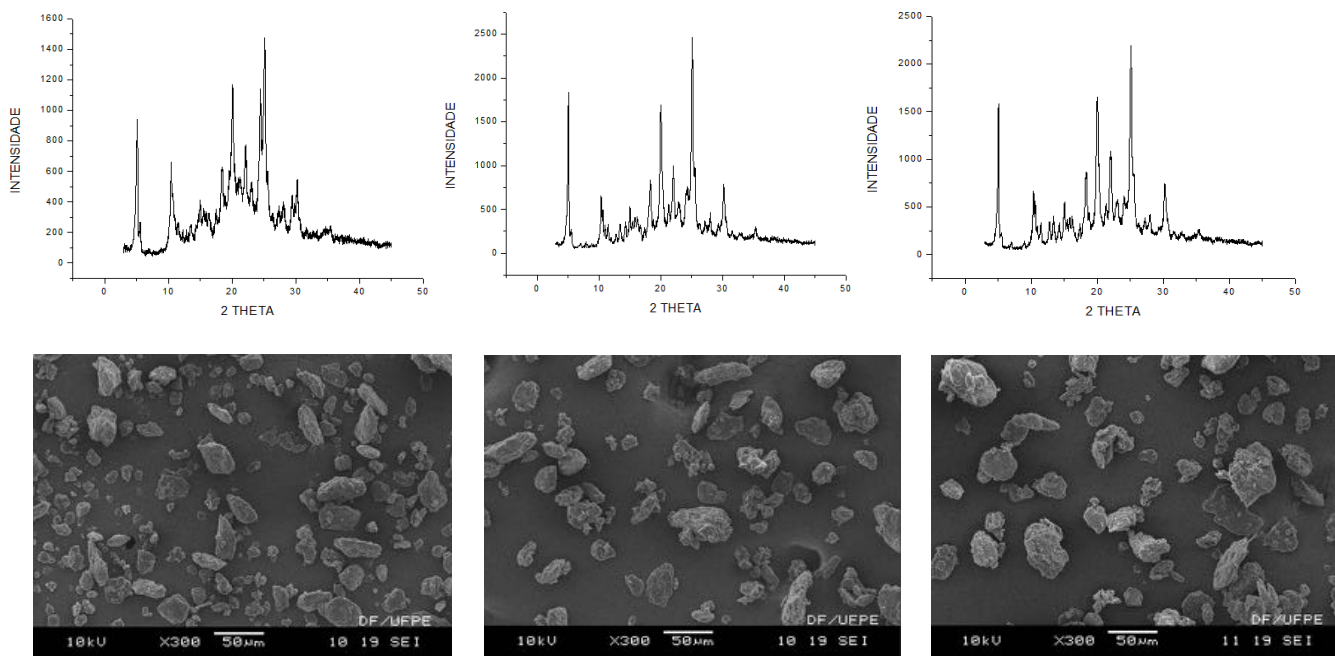
Verificou-se que a absorção de umidade pelo FTD variou em função do teor de umidade ambiente e do seu tempo de exposição à UR. Ao fim dos 14 dias houve aumento de 3,09% e 9,16% no peso das amostras nas condições de 74% e 95% de UR, respectivamente, proveniente de absorção de água.

Quanto à condição de 28% de UR, por se tratar de sílica, há uma redução do peso das amostras, explicada pela capacidade de sorção da água contida na amostra pela sílica. Esses resultados comprovam a higroscopicidade do FTD, no entanto os valores de higroscopicidade obtidos não devem ser considerados absolutos, visto que as amostras foram expostas a condições extremas de UR e não estavam acondicionadas em embalagem primária.

Em seguida, essas amostras foram observadas quanto à alteração de suas características físicas por meio de DRX e MEV (figura 2). Os resultados para os difratogramas do FTD mostram a presença de picos de difração intensos e com formas irregulares, característicos do FTD, evidenciando que não houve alteração na estrutura

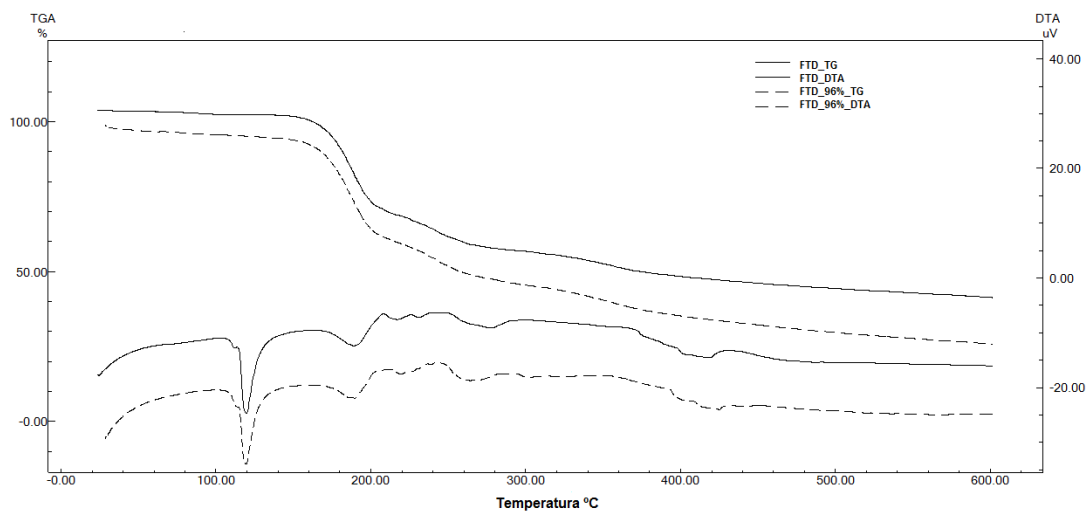
crystalina do fármaco. Este resultado foi confirmado por MEV, que indicou permanência da morfologia dos cristais com formas irregulares.

Figura 2. DRX e MEV do FTD após 28%, 75% e 96% de UR, respectivamente.



Tendo em vista a maior sorção de umidade pelo FTD quando submetido a 96% de UR, este foi avaliado quanto ao seu perfil térmico através das curvas TG e DTA (Figura 3). Observou-se assim que não houve alteração na estabilidade térmica do FTD, uma vez que não houve alteração na temperatura de fusão do fármaco (116°C) nem na sua temperatura inicial de degradação (145°C).

Figura 3. Curvas TG e DTA do FTD protegido da umidade e do FTD após 96% de UR, em atmosfera dinâmica de N₂ 50mL /min⁻¹ e razão de aquecimento 10°C/min⁻¹.



CONCLUSÕES

Tendo em vista a criticidade das questões de estabilidade sobre o FTD, os resultados apresentados neste trabalho apoiam a estabilidade físico-química do fármaco frente à UR, já que, mesmo em condições extremas de umidade, cuja matéria-prima apresentou maior higroscopicidade, a mesma manteve suas características físicas e térmicas inalteradas, de acordo com as técnicas utilizadas. Assim sugere-se a estabilidade do FTD para produção de medicamentos antirretrovirais frente a essas condições. No entanto, faz-se necessária a realização de técnicas adicionais para confirmação de tais resultados.

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHENAFI, D.; CHINTAM, V.; VEGHEL, D.; DRAGOVIC, S.; HOOGMARTENS, J.; ADAMS, E. Development of a validated liquid chromatographic method for the determination of related substances and assay of tenofovir disoproxil fumarate. **J. Sep. Sci.**, 33, 1708–1716, 2010.

CHAVES, J. S.; DA COSTA, F. B.; FREITAS, L. A. P. D. Development of enteric coated tablets from spray dried extract of feverfew (*Tanacetum parthenium* L:). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 45, n. 3, p. 573-584, 2009.

COSTA, R. S. **Estudos de Pré-Formulação e Formulação de *Heliotropium indicum* (L.) DC (Boraginaceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.

DELAHUNTY, T.; BUSHMAN, L.; FLETCHER, C. V. **Sensitive assay for determining plasma tenofovir concentrations by LC/MS/MS**. *Journal of Chromatography B - Analytical technologies in the biomedical and life*, Amsterdam, v. 830, n. 1, p. 6-12, 2006.

DECHRISTOFORO, R.; PENZAK, S. R. Tenofovir: **A nucleotide analogue reverse transcriptase inhibitor for treatment of HIV infection**. *American journal of healthsystem pharmacy*, Bethesda, v. 61, n. 1, p. 86-98, 2004.

DE SOUZA, K. C. B.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L.; GONZÁLEZ, O. G. The adjuvants aerosil 200 and gelita-sol-P influence on the technological characteristics of

spray-dried powders from *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 26, n. 3, p. 331-336, 2000.

Farmacopeia Internacional, WHO. TENOFOVIR DISOPROXIL FUMARATE, 2009.

HAVELE, S.; DHANESHWAR, S. R. Development and validation of a stability-indicating HPLC method for the determination of tenofovir disoproxil fumarate in pharmaceutical formulation. **Songklanakarin J. Sci. Technol**, v. 34, n. 6, p. 615-622, 2012a.

HAVELE, S.; DHANESHWAR, S. R. Stress Studies of Tenofovir Disoproxil Fumarate by HPTLC in Bulk Drug and Pharmaceutical Formulation. **The ScientificWorld Journal**, v. 2012, p. 1-6, 2012b. doi:10.1100/2012/894136.

KEARNEY B. P.; FLAHERTY, J. F.; SHAH, J. **Tenofovir Disoproxil Fumarate: Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics**. **Clinical Pharmacokinetics**, New York, v. 43, n. 9, p. 613-622, 2004.

LEMOSENNA, E.; PETROVICK, P. R.; GONZÁLEZ, O. G.; BASSANI, V. L. Preparation and characterization of spray-dried powders from *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC extracts. **Phytotherapy Research**, Malden, v. 11, n. 2, p. 123-7, 1997.

USP. Tenofovir Disoproxil Fumarate. Authorized USP Pending Monograph, 2011.



O IMPACTO DA JUDICIALIZAÇÃO NO ACESSO ÀS TECNOLOGIAS MEDICAMENTOSAS: UM ESTUDO DE CASO

¹K.K.S. MARÇAL, ²M.C. RIOS, ²P.F. CASTRO,
²D.P. LYRA JR., ³J.L.A.C. ARAÚJO JR.

¹Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos, Ministério da Saúde.
karolinamarcal@gmail.com

²Laboratório de Ensino e Pesquisa em Farmácia Social – LEPFS, Departamento de Farmácia,
Universidade Federal de Sergipe. lepfs.ufs@gmail.com

³Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Universidade Federal de Pernambuco.

Introdução: Nos últimos anos, os medicamentos muitas vezes têm sido garantidos por ações jurídicas, requerendo o fortalecimento do poder público e a criação de instâncias institucionais para regular as novas tecnologias e garantir a sustentabilidade do SUS. Assim, a presente pesquisa analisou o fenômeno da judicialização da Assistência Farmacêutica no Estado de Pernambuco. **Métodos:** Foi realizado um estudo transversal, a partir da análise de 655 processos judiciais impetrados entre 2009 e 2010. **Resultados e Discussão:** A tutela foi deferida em praticamente todas as ações impetradas pela Defensoria Pública (99,1%), os fármacos antineoplásicos foram os mais solicitados (30,5%). Os gastos com medicamentos demandados superaram os gastos da aquisição programada, apresentando perfil de crescimento anual, com razão de gasto, em torno de 0,47 em 2009 a 0,57 em 2010. Há relação entre a demanda médica e a tecnologia empregada na produção dos fármacos: a biotecnologia. Fármacos como Trastazumabe (10,3%) e Insulina Glargina (10,1%) foram os mais solicitados, ambos com patente vigente no Brasil. **Conclusão:** Apesar de forte recomendação com nível de evidência B, evidenciou-se a necessidade da inclusão de profissionais técnicos, como o farmacêutico, para sensibilizar os prescritores e assessorar as decisões do poder judiciário a considerar as normas e a regulamentação do SUS.

Apoio: FAPITEC.

Palavras chaves: Assistência Farmacêutica, Direito a saúde, Decisões Judiciais.



***Operculina macrocarpa*: ASPECTOS QUÍMICOS E FARMACOLÓGICOS**

¹M.A.M. GALVÃO, ²M.R.A. FERREIRA, ^{1,2}K.P. RANDAU, ^{1,2}L.A.L. SOARES

¹Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Departamento de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Pernambuco. marcosgalvao334@hotmail.com

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Ciências Farmacêuticas,
Universidade Federal de Pernambuco.

RESUMO

O objetivo desta breve revisão é trazer informações sobre os aspectos químicos e farmacológicos da espécie vegetal *Operculina macrocarpa*. A espécie é conhecida como jalapa e possui um vasto emprego na medicina popular do Nordeste brasileiro. Suas raízes são constituídas de resinas glicosídicas que apresentam atividade laxativa associada ao efeito propulsor da motilidade intestinal. Estas resinas são compostas em sua maioria por duas substâncias, a jalapina e jalapurgina, que em doses elevadas podem ser extremamente tóxicas. Apesar da utilização da espécie na fitoterapia ser aceito e bem tolerado pela população em geral, é grande a preocupação quanto a sua utilização de forma inadequada, pois seu uso sem critérios pode trazer graves consequências à saúde do usuário.

INTRODUÇÃO

Convolvulaceae é uma família de angiospermas da divisão Magnoliophyta, formada por 57 gêneros contendo cerca de 1600 espécies, que se estende por todos os biomas Brasileiros (BIANCHINI, 2013). O nome Convolvulo, advém do latim e significa entrelaçar-se, e refere-se, em termos gerais, à forma do seu crescimento. Grande número das espécies pertencentes a esta família são trepadeiras volúveis, que crescem enroscadas em um suporte (CARTAXO, 2010). Possuem fileiras de células secretoras de resinas glicosídicas em seus tecidos foliares, que constituem uma das características quimiotaxonômicas mais importantes desta família.

Dentro da família, se destaca *Operculina macrocarpa* L. Urban, devido as suas notáveis atividades farmacológicas. A espécie é trepadeira bienal de aspecto ornamental amplamente encontrada no Nordeste brasileiro (MATOS, 1994). Seu farmacógeno é constituído de raízes tuberosas, grandes, amiláceas e resiníferas. É popularmente conhecida como batata-de-purga ou jalapa, sendo utilizada tradicionalmente como laxante, purgativa, depurativa contra moléstias da pele e no tratamento de leucorreias (MARTINS et al., 2000; MICHELIN; SALGADO, 2004; GOMES et al., 2009).

O. macrocarpa possui potencial farmacológico e de interesse comercial. A planta é fonte tradicional de “remédios” utilizados na medicina popular do Nordeste

brasileiro e, seu uso é conhecido a mais de dois séculos (MATOS, 1997). A literatura registra o emprego de suas raízes em preparações para o uso no tratamento da asma, paralisias parciais resultantes de acidente vascular cerebral e como laxante. Entretanto, preparações caseiras ou industriais devem ser utilizadas com cuidado, pois em doses elevadas podem causar intoxicação severa, traduzida por cólicas fortes e diarreia intensa, com risco de rápida desidratação (MATOS, 2008).

OBJETIVOS

O objetivo desta breve revisão é descrever informações sobre os aspectos químicos e farmacológicos da espécie vegetal *Operculina macrocarpa* L. Urban, fornecendo informações para a sua utilização na fitoterapia de forma racional.

MATERIAIS E MÉTODOS

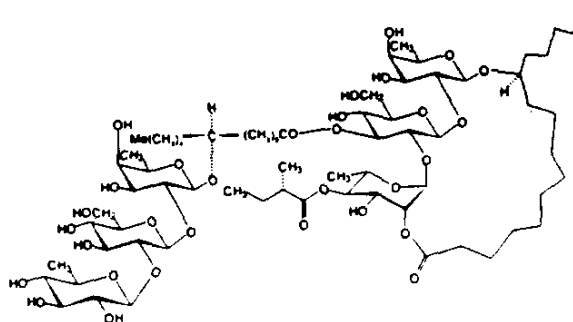
O estudo sobre os aspectos químicos e farmacológicos da espécie vegetal *Operculina macrocarpa* L. Urban foi construído através da consulta de publicações nas principais bases de dados científicos como Scielo, PubMed, Medline, Capes e Science Direct. As publicações foram selecionadas utilizando os seguintes descritores: *Operculina macrocarpa*, convolvulaceae, jalapa e batata-de-purga.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As raízes são compostas por fécula e resina (cerca de 12%), esta é formada de uma mistura complexa de substâncias com propriedades laxativa ou, em doses maiores, como purgativo drástico e anti-helmíntico (MORS et al., 2000). As resinas são constituídas principalmente por duas substâncias distintas: jalapina e jalapurgina ou convolvulina. A jalapurgina é mais ativa e também é mais irritante do que a jalapina e, em doses elevadas pode ser extremamente tóxica (CULBRETH, 1927; GOMES et al., 2009).

Investigações recentes permitiram a caracterização das complexas estruturas dos constituintes individuais, de natureza lipo-oligossacarídica, presentes nas resinas glicosídicas de espécies da família Convolvulaceae, estes compostos são constituídos por oligossacarídeos diferentes acilados glicosidicamente ligados a ácidos graxos hidroxilados, e são geralmente ligados de volta à cadeia de açúcar de modo a formar anéis de macrolactona de vários tamanhos, como apresentado na figura 1 (DING, 2012).

Figura 1. Exemplo de resina glicosídica isolada de *Ipomoea tricolor*.



Tendo em vista a comercialização e a utilização de amostras pulverizadas de *O. macrocarpa* para o tratamento de constipação intestinal, o estudo de Michelin e Salgado (2004) teve como objetivo avaliar os efeitos da droga na motilidade intestinal de camundongos. Em conclusão, foi provado que o efeito laxante da espécie está associado ao seu efeito propulsor da motilidade intestinal comprovando seu uso etnomedicinal.

Cunha e colaboradores (2011) realizaram estudo duplo cego, randomizado, controlado por placebo para avaliar a eficácia da tintura de jalapa no tratamento de pacientes com constipação crônica. Os resultados concluíram que a tintura é efetiva para o tratamento de constipação intestinal e a droga representa uma importante alternativa terapêutica para o tratamento da fase aguda da doença.

CONCLUSÕES

Com os diversos usos terapêuticos atribuídos a *O. macrocarpa*, a sua utilização vêm crescendo cada vez mais, devido à facilidade de aquisição e utilização. Apesar de seu uso ser aceito e bem tolerado pela população em geral, é grande a preocupação quanto à sua utilização de forma inadequada, pois o uso sem critério pode trazer graves consequências à saúde do usuário. Neste sentido, mais pesquisas sobre a espécie e a sua correta utilização devem ser desenvolvidas para alertar a população sobre possíveis benefícios e potenciais efeitos prejudiciais quando utilizada de forma inadequada.

AGRADECIMENTOS

FACEPE, CAPES, ANVISA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIANCHINI, R.S.; FERREIRA, P.P.A. Convolvulaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB007108>>. Acesso em: 14 out. 2013.

CARTAXO, S. L. et al. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal Ethnopharmacology**, v.131, n.2, p. 326-342. 2010.

CULBRETH, D. M. R. **The Cayce Herbal. A comprehensive guide to the botanical medicine of Edgar Cayce.** Meridian Institute, 1927.

CUNHA, G.H. et al. Efficacy of the tincture of jalapa in the treatment of functional constipation: A double-blind, randomized, placebo-controlled study. **Contemporary Clinical Trials**, v. 32, p. 153-159, 2011.

DING, W., JIANG, Z., WU, P., XU, L., WEI, X. Resin glycosides from the aerial parts of *Operculina turpethum*. **Phytochemistry**, v. 81, p. 165-174, 2002.

DING, W.B. et al. Bioactive dammarane-type saponins from *Operculina turpethum*. **Journal of Natural Products**. v.74, p. 1868–1874. 2012.

GOMES, A.M.M., DA SILVA, P.L., SOARES, S.A., DA SILVA, C.E.M., GALLAO, M.I., GERMANI, R., RICARDO, N.M.P.S. Isolation and physico-chemical and rheological characterisation of the jalap starch (*Operculina tuberosa* Meisn.). **Carbohydrate Polymers**, n. 77, p. 885-890, 2009.

MARTINS, E.R., CASTRO, D.M., CASTELANI, D.C., DIAS, J.E. **Plantas medicinais.** Viçosa: UFV, 2000.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas.** 2.ed. Fortaleza: EUFC, 1994.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades.** 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, 1998. 267 p.

MATOS, F. J. A. **O formulário fitoterápico do Prof. Dias da Rocha**. 2. ed. Fortaleza: UFC Edições, 1997 . 80 p.

MICHELIN, D.C.; SALGADO, H.R.N. Avaliação da atividade laxante de *Operculina macrocarpa* L. Urban. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, n.2, p.105-109, 2004.

MORS, W.B.; RIZZINI, C.T.; PEREIRA, N.A. **Medicinal Plants of Brasil**. Reference Publications, Inc. Algonac, Michigan, 2000. 501 p.



SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HIPOGLICEMIANTE DE UM NOVO DERIVADO TIAZOLIDÍNICO.

M.J.D.PAULA¹, L. C. L. OLIVEIRA², M. C. A. LIMA³, S.L. GALDINO⁴, I.R. PITTA⁵,
G. I. B. P. DUARTE⁶

¹ Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Cardiovascular, Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Universidade Federal de Pernambuco . julianaddp@gmail.com

^{2, 3, 4, 5} Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, Departamento de Antibióticos, Universidade
Federal de Pernambuco.

⁶ Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Cardiovascular, Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Universidade Federal de Pernambuco

RESUMO

Diabetes mellitus (DM) é uma doença caracterizada pela desregulação metabólica de glicose e lipídeos. Uma estratégia para o tratamento do DM2 é o uso de tiazolidinonas (TZDs). Sintetizamos uma nova TZD (LPSF-GQ-11), e avaliamos os efeitos hipoglicemiante e hipolipidêmico deste novo candidato a fármaco em ratos Wistar com DM induzido por estreptozotocina (42 mg/kg). O LPSF-GQ-11 foi sintetizado a partir de uma reação de N-alquilação da tiazolidina com haletos de alquila, seguida de Adição de Michael com intermediários de Cope. A metodologia apresentou facilidade de execução e bons rendimentos, e após o tratamento com o LPSF/GQ-11 houve uma redução nos níveis de glicose e triglicérides. Esses dados apontam para uma atividade hipoglicemiante promissora desse novo candidato à fármaco.

INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) caracteriza-se pela regulação metabólica anormal de glicose e lipídeos, resultando em hiperglicemia causada pelo declínio acelerado na função de células beta. A associação entre DM e doenças cardiovasculares (DCV) bem como morbidade e mortalidade é mundialmente bem estabelecida, sendo responsáveis por mais de 75% das hospitalizações e por 80% da mortalidade de pacientes diabéticos (ARONSON; RAYFIELD, 2002; CHANG et al., 2006). É possível, que esse número elevado seja consequente à ineficiência dos tratamentos farmacológicos em atingir os distúrbios fisiopatológicos observados no DM. Avanços importantes ocorreram no estabelecimento de estratégias para o tratamento do DM2, entre eles o uso de tiazolidinonas (TZDs). Esta classe reduz

diretamente a resistência insulínica (RI) no tecido adiposo, músculo esquelético e fígado, sendo ligantes de PPARs (GERVOIS et al, 2004).

Os PPAR α , β/δ , - γ pertencem à família de receptores nucleares e são responsáveis pela modulação da expressão gênica da repressão basal, transativação e transrepressão da transcrição (ZHANG et al., 2007). Estes receptores estão associados ao DM2, aterosclerose e obesidade (WILLSON et al., 2001). Agonistas de PPAR γ como TZDs diminuem a RI, o que justifica sua utilização no tratamento do DM 2 (CHOGTU et al., 2009), exercem efeitos benéficos no tratamento de dislipidemias, (DESVERGNE & WAHLI, 1999), na redução da secreção de VLDL pelo fígado e ao aumento da produção das apolipoproteínas que compõem a HDL (BERTHOU et al., 1996). No presente estudo nos propomos a avaliar a segurança cardiovascular de um novo derivado tiazolidínico bifuncionais, potencialmente antidiabético.

OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho é Investigar a influência do tratamento com tiazolidinadionas sobre as complicações decorrentes do diabetes mellitus, tais como, disfunção glicolipoprotéica.

MÉTODOS

Para a síntese do derivado (LPSF/GQ-11) inicialmente, obtém-se a tiazolidina-2,4-diona por reação da tiouréia com o ácido cloroacético. Na segunda etapa a tiazolidina-2,4-diona reagiu com um cloreto de 4-metilbenzila através da reação de substituição nucleofílica, para formação do derivado 3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-1). Paralelamente, obtém-se o composto 3-(indol-3-ilmetileno)-2-ciano-acrilato de etila (LPSF/IP-19) através da reação de condensação de indol-3-carboxaldeído com cianacetato de etila, em presença de trietilamina. Finalmente, a 3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-1) sofre uma reação de adição pelo éster cianocinâmico, conduzindo ao produto final 5-(indol-3-il-metileno)-3-(4-metilbenzil)-Tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-11) substituído.

Para a avaliação biológica foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 200-250g, estes foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE, a temperatura $21 \pm 2^\circ\text{C}$ e luminosidade controlada (12 horas claro e 12 horas escuro), sendo fornecidas água e ração *ad libitum*. Os animais foram divididos em dois grupos: i) controle (n= 6) – tratado com o veículo (tampão citrato). ii) diabético (n = 36) - recebendo dose única de 42 mg/Kg (i.p) de estreptozotocina (STZ, Sigma, St. Louis, MO, USA), dissolvida em tampão citrato (0,01M pH 4,5), (n = 36). Após sete dias da indução do diabetes, este grupo foi subdividido em: grupo STZ+R (tratado com a droga padrão rosiglitazona (10mg/Kg/dia v.o)); grupo SZT+GQ (tratado com LPSF/GQ-11 (10mg/Kg/dia v.o)); grupo STZ (diabético tratado com o veículo). Durante o período experimental foi o medido o consumo de água e ração diariamente, e ao final foram realizadas dosagens bioquímicas utilizando o kit comercial (Labtest®).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características físico-químicas do derivado (LPSF/GQ-11) encontram-se na tabela abaixo:

P.F(°C)	Rdt (%)	Rf	Sistema de eluição
162-165	84	0,71	Benz/AcOEt 6:4

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H) permitiu confirmar as estruturas dos compostos sintetizados. Os hidrogênios do grupo metílico aparecem como singlete com deslocamento químico de 4,79 ppm. O hidrogênio do grupo metileno aparece como um singlete com deslocamento químico de 7,82 ppm. Os hidrogênios benzílicos aparecem como dubletos com deslocamento de 7,92 ppm e 7,51 ppm, sendo mais desblindados quando comparados com os hidrogênios benzilidênicos que aparecem como multiplete na faixa entre 7,29-7,14 ppm.

Conforme observado nas Figuras 1a e 1b, nos grupos diabéticos tratados ou não com LPSF/GQ-11 (10mg/Kg) e rosiglitazona (10mg/Kg), houve um aumento no consumo de ração e água quando comparados com o grupo controle, porém após o tratamento com o GQ-11 o consumo de ração retornou aos valores normais, o que não foi observado nos animais tratados com o padrão. Nos animais diabéticos tratados com TZDs, houve uma redução no consumo de água, porém esses níveis ainda permaneceram elevados (Figura 1b). Esses dados permitiram confirmam o estado diabético, caracterizado por polifagia, polidipsia além de poliúria (dados não mostrados), corroborando com outros autores (CALUWAERTS et al., 2003).

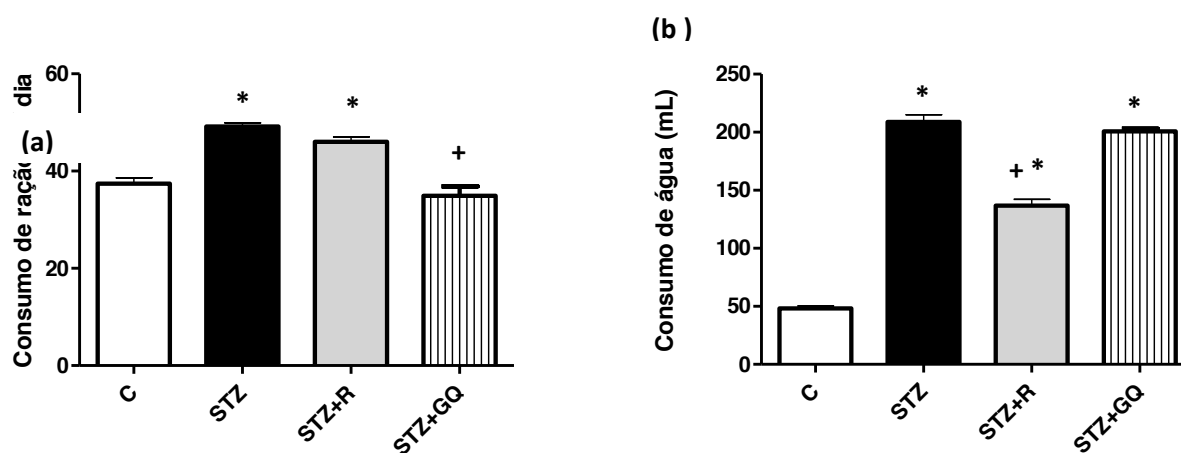


Figura 1. Médias do consumo de ração em gramas (a) e água em mililitro (b), ao longo dos 14 dias de tratamento, dos animais dos grupos: controle normoglicêmico (C), diabético não tratado (STZ), diabético tratado com rosiglitazona (STZ+R), diabético tratado com LPSF GQ-11 (10mg/Kg) (STZ+GQ). Os valores são expressos como média \pm e.p.m; * $p < 0.001$ vs. Grupo C, * $p < 0.001$ vs. Grupo STZ. (ANOVA uma via seguido pelo teste Bonferroni).

Os níveis de glicose dos animais tratados com STZ foram significativamente elevados, configurando um quadro de hiperglicemia. Após o tratamento com as TZDs houve uma melhora neste quadro (Figura 2a). O grupo diabético não tratado apresentou níveis de triglicerídeos significativamente elevados quando comparado aos demais grupos (figura 2b). Os agonistas do PPAR-gama podem reduzir os níveis de triglicerídeos e ácidos graxos não esterificados reduzindo o risco vascular.

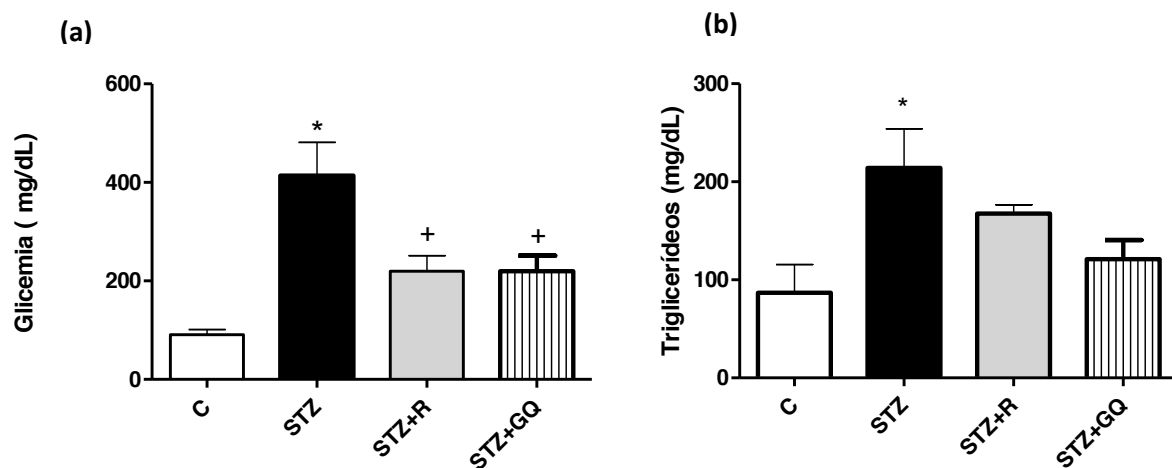


Figura 2 – Efeito do diabetes e do tratamento com rosiglitazona (STZ+R) e LPSF/GQ11- (STZ+GQ) sobre os níveis de glicose plasmática (a) e triglicerídeos (b). Os valores são expressos como média \pm EPM de n = 4 a 6 animais/grupo. *P < 0,05 vs. grupo C, +P < 0,01 vs. grupo STZ (ANOVA uma via seguido pelo teste Bonferroni).

CONCLUSÕES

Os testes realizados com o modelo de diabetes experimental induzidos por STZ, não mostraram atividade hipoglicemiante, embora tenha sido observado que o tratamento com o LPSF/GQ-11 reduziu os níveis de glicose plasmática e triglicerídeos, o que pode ser sugestivo de uma possível melhoria no risco vascular.

O tratamento com o novo derivado tiazolidínico LPSF/GQ-11 na dose 10mg/Kg foi capaz de melhorar os quadros de polifagia, mas a polidipsia nos animais diabéticos induzidos por STZ, não foram significativos. Assim, mais estudos com outros modelos experimentais, como os de resistência à insulina, podem ser importantes para se definir o papel deste candidato à fármaco na terapia do diabetes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARONSON D, RAYFIELD EJ. How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanisms. *Cardiovasc Diabetol.* 8 (1):1-10, 2002.

CHO, H., J. MU, et al. "Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta)". *Science*, 292(5522): 1728-31, 2001.

CLARK, D.A.;GOLDSTEIN, S.W.; VOLKMANN, R.A. et al., substituted dihydrobenzopyran and dihydrobenzofuran thiazolidine-2,4-diones as hypoglycemic agents, *MED J Chem*, 34: 319–325, 1991.

COLDITZ, G.A; WILLETT, W.C.; STAMPFER, M.J, et al. Weight as a risk factor for clinical diabetes in women. *Am J Epidemiol*, 132: 501-13,1990.

GERVOIS P., FRUCHART J.C., STAELS B. Inflammation, dyslipidaemia, diabetes and PPARs: pharmacological interest of dual PPARalpha and PPARgamma agonists. *Int J Clin Pract Suppl.* (143):22-9. 2004

FURUKAWA S., FUJITA T., SHIMABUKURO M., IWAKI M. ET AL. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.*, 114: 1752–1761, 2004.

LAHLOU S., DUARTE G. P. Bromocriptine-induced tachycardia in conscious rats: blunted response following isoproterenol pretreatment for 5 days. *Acta. Physiol. Pharmacol. Ther. Latinoam*, 48: 65-174, 1998

LEITE L. C; MOURÃO R. V; LIMA M.C.; GALDINO S. L; ET AL. Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Modeling Studies of Arylidene-Thiazolidinediones with Potential Hypoglycemic and Hypolipidemic Activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2007.

MARTENS,F.M.,VISSEREN,F.L.,LEMAY,J.,KONING,E.J.,RABELINK,T.J. Metabolic and additional vascular effects of thiazolidinediones. *Drugs* 62 : 1463-1480, 2002.

NAKAMURA T., YAMAMOTO E.,KATAOKA K. ET AL. Beneficial effects of pioglitazone on hypertensive cardiovascular injury are enhanced by combination with candesartan. *Hypertension*. 51:296-301, 2008.



**TERMOGRAVIMETRIC ANALYSIS AND SPECTROPHOTOMETRIC
SCANNING OF WASTES OF *Agave sisalana***

¹F. F. SANTOS, ¹C.O. MELO, ²A. C. APOLINÁRIO, ¹M. LOPES, ²J. P. L. VIEIRA, ⁴A. CONVERTTI, ³A. PESSOA, ²B. P.G. L DAMASCENO, ²J. A SILVA

¹Department of Pharmacy, State University of Paraíba, Rua Juvêncio Arruda, S/N - Bairro Universitário, 58429-600, Campina Grande, Paraíba, Brazil.

²Graduation Program in Pharmaceutical Sciences, State University of Paraíba, Rua Juvêncio Arruda, S/N - Bairro Universitário, 58429-600, Campina Grande, Paraíba, Brazil

³Department of Civil, Chemical and Environmental Engineering, Chemical Engineering Pole, Genoa University, Via Opera Pia 15, 16145, Genova, Italy

⁴Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580 – Bloco 16, Cidade Universitária, 05508-000, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

Introduction: Only 5% of the hard fiber resulting from decortication of *Agave sisalana* Perrine leaves is exploited, while the remaining 95% consists of wastes: bagasse and juice. Studies demonstrated the potential of *A. sisalana* components in different pharmaceutical applications, but the physicochemical characterization of herbal raw materials is essential. The aim of this work was to analyze physicochemical parameters of wastes from *A. sisalana* by termogravimetry (TG) and spectrophotometric scanning (SC). **Methods:** Solid waste was dried in a forced circulation oven at 40°C and extracted with distilled water at 80°C for 2 h, and the juice was lyophilized. The herbal drug was characterized by TG and the extract by SC at 200-800 nm. **Results and Discussion:** Wastes exhibited similar chemical profiles, in that picks of bagasse were observed at 669, 307 and 271 nm to bagasse and 671 nm, and those of juice at 307 and 271 nm. The decomposition process involved several events of mass loss, and the first stage, occurred in the temperature range of 36–100°C, was due to volatile compounds, mainly water. The initial moisture removals from the herbal drug and the lyophilized juice were 10.6% at 98°C and 7.2% at 96°C, respectively. Mass loss associated with thermal decomposition of fructans, aromatic and stable moieties of lignin and carbonate-rich residue (ash) were observed. **Conclusion:** The spectral and thermal behaviors suggest differences in the composition of agave bagasse and juice.

Palavras-chave: *Agave sisalana* , termogravimetry, spectrophotometric scanning



TRATAMENTO COM LOSARTAN CONTRIBUI PARA REDUÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL E MELHORA DA HIPERREATIVIDADE VASCULAR EM ARTÉRIAS DE RESISTÊNCIA NA PROLE DE RATAS DIABÉTICAS.

¹ DIEGO B. DE QUEIROZ, ²FERNANDA E. RAMOS-ALVES, ³ODAIR A. SILVA, ⁴JULIANA SANTOS-ROCHA, ⁵FRANCINE G. DE SÁ, ⁶LEAL. G A L, ⁷MOREIRA H S N, ⁸GLORIA P. DUARTE, ⁹FABIANO E. XAVIER

Laboratório de Reatividade Vascular, Departamento de Fisiologia e Farmacologia – UFPE; E-mail:

¹diegodequeiroz@hotmail.com; ²fernanda.eliz@yahoo.com.br; ³odair.federal@gmail.com;

⁴js.julianarocha@gmail.com; ⁵francineiane@hotmail.com; ⁶leal.georgia@hotmail.com;

⁷hici.moreira@gmail.com, ⁸Docente/pesquisador do Depto de Fisiologia e Farmacologia-UFPE;E-mail:

duarte.gloria@gmail.com, ⁹Docente/pesquisador do Depto de Fisiologia e Farmacologia-UFPE;E-mail: fabiano.exavier@gmail.com

Introdução: A Angiotensina II está envolvida na patogênese de várias doenças cardiovasculares mediando muitas ações pró-inflamatórias na parede do vaso, incluindo uma maior produção de prostanoídes derivados da COX-2. **Objetivos:** Analisar o papel do sistema Renina-Angiotensina, na patogênese da hipertensão e na reposta contrátil de artérias mesentéricas de resistência (AMR) da prole de ratas diabéticas. **Métodos:** Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE. Foram utilizados ratos Wistar machos adultos com 6 e 12 meses de idade provenientes de ratas controle (CON) ou diabéticas (STZ). Os animais foram divididos em 4 grupos: dois grupos não-tratados (CON e STZ) e dois grupos tratados com losartan durante 12 semanas (CONLos e STZLos). **Resultados:** Os animais do grupo STZ (6M e 12M) apresentaram níveis elevados de pressão arterial média comparado aos seus respectivos controles. No grupo STZ a pressão arterial foi normalizada pelo tratamento com Losartan: (6M, CON 98±7 vs. STZ 86±1, P<0,05; 12M, CON 96±2 vs. STZ 97±1, P<0,05). As AMR do grupo STZ 6 e 12 meses apresentaram um aumento da resposta à NA em comparação ao grupos controle: (CON 107±2,0 %; STZ 120±2,0 %; CONLos 92±1,0 %; STZLos 100±5,0 %; P<0,05) e 12M (CON 106±2,0 %; STZ 131±3,0 %; CONLos 90±2,0 %; STZLos 96±5,0 %; P<0,05). **Conclusão:** Os resultados sugerem que na prole de ratas diabéticas a Angiotensina II pode estar envolvida na patogênese da hipertensão.

Apoio Financeiro: CNPq/ CAPES.

Palavras-chave: Losartan, Diabetes, Hiperreatividade Vascular



3º Encontro Brasileiro
para Inovação Terapêutica

1º Workshop
Rede RISH
Rede de Inovação em Insumos
para Saúde Humana

II Workshop
Estabilidade de Fármacos
e Medicamentos

21 e 22/10/2013
Campus UFPE

23 a 25/10/2013
Dorisol Recife
Grand Hotel

Interligando competências científicas, tecnológicas e industriais em espaços de saúde

TECNOLOGIA FARMACÊUTICA E BIOFARMÁCIA



A VARIABILIDADE DE RESPOSTAS À DROGAS E O PAPEL DA FARMACOGENÉTICA NA BUSCA DE NOVOS SEGMENTOS TERAPÊUTICOS

¹A.P.F. SILVA, C.R. FERNANDES, D.F. ARAÚJO, P.R. AZEVEDO.

¹Centro Universitário Maurício de Nassau – Uninassau anafernnandes@gmail.com

Introdução: A variabilidade da resposta aos medicamentos é em grande parte atribuída a fatores genéticos, que afetam os efeitos terapêuticos. Estas variações genéticas, conhecidas como polimorfismos, podem alterar parâmetros cinéticos e dinâmicos e são estudadas por um ramo da farmacologia conhecido como farmacogenética. **Metodologia:** Trata-se de uma revisão com base em artigos científicos publicados em revistas indexadas e consultados em acervos eletrônicos (lilacs e scielo) relacionadas à área de estudo. **Referencial Teórico:** Os dados provenientes do Projeto Genoma Humano forneceram uma estimativa de 2,1 milhões de nucleotídeos polimórficos, incluindo aqueles codificadores de enzimas que catalisam as reações metabólicas. Polimorfismos podem afetar a resposta terapêutica através de mecanismos que modificam a afinidade de receptores por seus agonistas ou antagonistas ou que alteram a atividade de enzimas fundamentais no metabolismo de alguns fármacos. A aplicação da farmacogenética possibilita a avaliação da toxicidade e da resposta ao fármaco de maneira individualizada através dos nucleotídeos presentes no genoma, possibilitando a identificação da droga e da dose eficaz para cada paciente. **Conclusão:** Os estudos no campo da farmacogenética contribuem para otimização dos protocolos de farmacologia clínica, redução de reações adversas e construção da individualização farmacêutica, com base nos fatores genéticos que modulam a farmacocinética e farmacodinâmica dos medicamentos.

Palavras-chave: farmacogenética, farmacogenômica, polimorfismo, terapêutica.



ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA DE INFRAVERMELHO EM BIOFILMES DE QUITOSANA COM INSULINA PARA USO FARMACÊUTICO.

¹A.R.S. FREITAS, ¹B.P. SILVA, ¹C.O. LIMA, ¹D.G. OLIVEIRA, ¹D.M.S WANDERLEY, ²R. S. C. LIMA.

¹ Graduandos do curso de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, Laboratório de Avaliação e Certificação de Biomateriais do Nordeste, Universidade Estadual da Paraíba. bruna.silva00@hotmail.com; dicelima@gmail.com; danigomesoliveira@gmail.com; davisonmw@hotmail.com.

² Professora Doutora do curso de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, Laboratório de Avaliação e Certificação de Biomateriais do Nordeste, Universidade Estadual da Paraíba. rosysousa1@hotmail.com.

Introdução: Quando existe dificuldade no organismo em manter adequados os níveis de insulina, ocorre uma patologia denominada Diabetes Mellitus, havendo a necessidade do uso das injeções de insulina. O desenvolvimento deste trabalho vem de encontro a esses incômodos acarretados por esse método de aplicação. Portanto, iniciamos análises com Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) de biofilmes de quitosana associados à insulina, de modo a desenvolver um novo sistema de liberação controlada de fármacos. **Métodos:** as análises de FTIR foram realizadas para insulina isolada e para dois tipos de biofilmes de quitosana produzidos por duas metodologias, um deles elaborado pelo método sol-gel que utiliza calor (B2) e outra pela metodologia por resfriamento (B4). **Resultados e discussão:** foi possível observar a interação entre quitosana e insulina nos biofilmes obtidos, sugerindo uma possível presença de insulina no método por resfriamento (B4), pois ocorre na presença de bandas características de NH e OH que são mais semelhantes ao espectro da insulina, quando comparado ao biofilme feito por aquecimento (B2). **Conclusão:** através do FTIR foi possível caracterizar e discriminar os biofilmes para o tratamento do Diabetes Mellitus, propondo um desafio a substituir a agulha para liberação da insulina por vias alternativas menos invasivas renovando a esperança de uma melhor qualidade de vida para milhares de pessoas portadoras de Diabetes Mellitus.

Apoio: CNPq, UEPB, UFCG, CERTIBIO

Palavras-chave : Diabetes Mellitus, Biofilmes, Análise espectroscópica.



ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DE BIOFILMES DE QUITOSANA COM E SEM INSULINA PARA USO TERAPÊUTICO EM PACIENTES DIABÉTICOS.

¹A.R.S. FREITAS, ¹B.P. SILVA, ¹C.O. LIMA, ¹D. G. OLIVEIRA, ¹D.M.S WANDERLEY, ²R. S. C. LIMA.

¹ Graduandos do curso de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, Laboratório de Avaliação e Certificação de Biomateriais do Nordeste, Universidade Estadual da Paraíba. bruna.silva00@hotmail.com; dicelima@gmail.com; danigomesoliveira@gmail.com; davisonmw@hotmail.com.

² Professora Doutora do curso de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, Laboratório de Avaliação e Certificação de Biomateriais do Nordeste, Universidade Estadual da Paraíba. rosysousa1@hotmail.com.

Introdução: O tratamento do Diabetes Mellitus traz incômodo, pois consiste na administração múltipla diária de insulina por via subcutânea. O desenvolvimento deste trabalho vem de encontro a esses incômodos acarretados por esse método de aplicação, portanto, iniciamos análises e produções de biofilmes de quitosana com e sem insulina que possam ser administrados através de uma via de aplicação alternativa Utilizando a Análise Termogravimétrica (TG). **Métodos:** foram utilizadas amostras de biofilmes de quitosana com e sem insulina, produzidos por duas metodologias diferentes, um deles elaborado pelo método sol-gel que utiliza calor (B1 e B2) e outra pela metodologia de secagem por resfriamento (B3 e B4). **Resultados e Discussão:** na análise dos biofilmes (B1, B2, B3 e B4) a primeira impressão que se tem ao visualizar as quatro curvas é sua similaridade, estando as curvas praticamente sobrepostas. A similaridade dos demais dados, obtidos por ambas as metodologias, constata que a técnica não foi eficiente para detectar insulina, nas condições em que foi processada. **Conclusão:** através da TG foi possível caracterizar e discriminar os biofilmes para o tratamento do Diabetes Mellitus, obtidos por diferentes metodologias, propondo uma possível via de administração alternativa da insulina.

Apoio: CNPq, UEPB, UFCG, CERTBIO.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus, Análise Termogravimétrica, Biofilmes de quitosana e insulina, Tratamento.



AVALIAÇÃO DO TAMANHO DA GOTÍCULA DE EMULSÕES TIPO O/A CONTENDO ÓLEO DE SOJA

^{1,2}I. DE SOUZA, ^{1,3}L. STRECK, ⁴M.M. ARAÚJO, ²S.R.A. SANTOS, ^{1,2*}A. A. S.
JÚNIOR

¹Laboratório de Tecnologia e Biotecnologia Farmacêutica - TecBioFar, Departamento de Farmácia,
Universidade Federal de Rio Grande do Norte, UFRN.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte,
UFRN.

³Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos,
Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN.

⁴Programa de Pós-graduação em Nanotecnologia aplicada às Ciências Farmacêuticas, Universidade de
São Paulo, USP.

Introdução: Emulsões (EM) são sistemas dispersos estabilizados pela adição de tensoativos e cotensoativos, usualmente utilizadas como meio para administração de fármacos insolúveis em água. **Métodos:** EM foram produzidas utilizando um Ultraturrax[®], tendo água ultra pura como fase externa, óleo de soja como fase interna em razão fixa de 10%, Tween 80[®] e Span 80[®] como tensoativos (5%) em EHL 9,0. A adição de cotensoativos foi estudada quando adicionado álcool benzílico (AB) em razão de 2,5% às EM, sendo estes sistemas avaliados pelo tamanho da gotícula através da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial zeta (PZ). A estabilidade destes sistemas foi monitorada durante 365 dias. **Resultados e discussão:** O tamanho da gotícula das EM após 24 horas de preparo apresentou valores de 50,16 nm e 604,37 57, sendo as amostras sem AB e quando adicionado o AB, respectivamente. A análise destas EM após 365 dias mostrou um incremento no tamanho da gotícula para 57,88 nm e 1418,48 nm, sem AB e adicionado AB, respectivamente. O PZ revelou valores inferiores a 30 mV em todos os tempos de análise. **Conclusão:** Este estudo mostra que as EM produzidas sem AB apresentaram estabilidade após o período de 365 dias pois o tamanho da gotícula permaneceu praticamente inalterado. O aumento do tamanho da gotícula das EM contendo AB comprovam a falta de estabilidade do sistema sendo que o mesmo apresentou separação de fases. Sendo assim, estes testes comprovam que utilizando óleo de soja, Tween 80[®] e Span 80[®] para produção de uma EM O/A em EHL 9 permanece estável pelo tempo estudado revelando a eficiência dos tensoativos utilizados e a razão de cada um na EM.

Apoio: CNPq, CAPES, PPgCF, UFRN.

Palavras-chave: emulsão, óleo de soja, DLS.



AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE DROGA VEGETAL E ESTUDOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA *IN VITRO* DE EXTRATOS SECOS DE *PASSIFLORA NITIDA* KUNTH

¹P.T. RIBEIRO, ¹J.F.A.LIBÓRIO, ¹C. Q.VALENTIM, ¹S. R. CASTRO, ¹V.S.C. NÓBREGA, ¹C. C.PACHECO, ¹R. O. S. SOUZA, ¹E. S. LIMA, ^{1*}A.A.NLIMA

¹ Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal do Amazonas, Manaus - AM.

*e-mail: adleyantonini@yahoo.com.br

RESUMO

A *Passiflora nitida* Kunth apesar de apresentar alto teor antioxidante ainda é pouco estudada. A caracterização da droga vegetal (DV) e o estudo das atividades biológicas são os objetivos do trabalho. A DV foi coletada na Embrapa e o extrato seco, de 3 diferentes concentrações da DV, obtido por aspersão em *spray dryer* (ESPN). Realizou-se análise como granulometria por tamisação para a DV e para atividade biológica dos ESPN, DPPH e inibição da tirosinase. A granulometria caracterizou o pó como pó grosso. A CI_{50} encontrada no DPPH, nas concentrações de 5; 7,5 e 10% de ESPN, foram 23,5; 31,5; 25,9 μ g/ml e na inibição da tirosinase foi de 654,4; 436,8; 400,1 μ g/ml. Dados iniciais de controle de qualidade foram estabelecidos e a atividade antioxidante e inibitória da tirosinase confirmada.

INTRODUÇÃO

Passiflora nitida Kunth é uma espécie da flora amazônica popularmente conhecida como “maracujá-do-mato” e pertence ao grupo dos maracujás doces. (Junqueira et al., 2007). Sendo da família Passifloraceae, esse fruto tem um sabor exótico e é bem aceitável para o consumo, sendo muito apreciado pela população do norte do Brasil. (Lima et al., 2012). Segundo Junqueira e col. (2007), a planta apresenta muita similaridade botânica com o maracujazeiro doce *Passiflora alata* Curtis. Suas folhas apresentam superfícies cartáceas e coriáceas, opacas e envernizadas e as margens são levemente denteadas. Apresentam nervuras secundárias com glândulas terminais proeminentes e nervuras terciárias, percurrentes, retas e obliquas (HOPKINS e SOUZA, 1999).

Os extratos das folhas de *Passiflora nitida* Kunth apresentam alto potencial antioxidante, e essa atividade está atribuída às substâncias fenólicas presentes nas folhas

desta espécie. (Lima et al., 2009) No entanto, do ponto de vista científico e biotecnológico, a *Passiflora nitida* Kunth tem sido pouco explorada. (Lima et al., 2012)

Até o presente momento, não existe registrado nenhuma monografia da espécie contendo a caracterização físico-química da matéria-prima vegetal das folhas *P. nitida* que possa auxiliar no controle de qualidade da matéria-prima. Assim como o estudo das atividades biológicas *in vitro* traçando um comparativo entre diferentes concentrações do extrato seco.

OBJETIVOS

Realizar a caracterização físico-química inicial da droga vegetal (DV) obtida das folhas da *P. nitida* (PN) para obtenção de parâmetros de controle de qualidade da matéria-prima (MP). Além disso, estudar as atividades biológicas do extrato seco de *P. nitida* (ESPN) em três concentrações diferentes: 5; 7,5 e 10%.

MATERIAIS E MÉTODOS

Matéria-prima Vegetal e Testes físico-químicos

As Folhas de PN foram obtidas de cultivo da Embrapa, na estrada Manaus-Itacoatiara. Trata-se de um segundo lote, coletado em agosto de 2012, um estudo inicial já foi realizado com o primeiro lote. As folhas foram limpas e secas em estufa de ar circulante, à temperatura de 45 °C ± 2 °C, por 7 dias, sendo, posteriormente, trituradas em moinho de facas.

O ESPN foi obtido através de secagem por aspersão (ESA). Os extratos líquidos de 5; 7,5 e 10% foram preparados por maceração (solução hidroetanólica) a temperatura ambiente sob agitação por 48h. Após filtração ocorreu à secagem em *spray dryer*, com temperatura de entrada e saída de 140/100°C, fluxo de 85%, vazão de 1,2ml/min e bico de 0,07mm.

As análises de granulometria por tamisação, perda por dessecação e cinzas totais foram realizadas seguindo a metodologia descrita na 5ª ed. da Farmacopeia Brasileira (FB). Já o teor extrativo seguiu a metodologia de Bundesvereinigung, 1986.

Testes *in vitro*

A determinação do teor de fenóis totais, foi feita por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o método de Folin–Ciocalteu com modificações descrito por Bonoli et al. (2004). A determinação do teor de flavonoides totais foi realizada segundo metodologia utilizada por Chang et al. (2002), com modificações. A determinação da atividade antioxidante foi realizada por meio da capacidade dos antioxidantes presentes nas amostras em sequestrar o radical estável DPPH, segundo metodologia utilizada por Molyneux (2004), com modificações. A determinação da atividade antirradical ABTS foi realizada pelo método Re et AL. (1999) com pequenas modificações. A inibição da tirosinase pelos extratos foi realizada segundo método descrito por Chan et al.,2008.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela granulometria o pó pode ser classificado como pó grosso, pois a quantidade que passa pelo tamis de malha 355 é menor que 40%. A média das repetições em triplicata (\bar{X}) da perda por dessecação foi de $9,08 \pm 0,08\%$ demonstrando um valor dentro do esperado que é de 8 a 14%. A \bar{X} do teor extrativo encontrado foi de $17,16 \pm 0,05\%$, este estudo foi empregado como um ensaio auxiliar na caracterização da droga vegetal e indica a quantidade de substâncias extraíveis.

Analisando o teor de cinzas totais e fazendo uma análise comparativa entre a \bar{X} $5,43 \pm \%$ em relação à *Passiflorae dulcis folium* e *Passiflorae acetum folium*, cuja referência farmacopéica é de no máximo 10,0%, o resultado encontrado mostra menor quantidade de contaminantes.

A \bar{X} encontrada para o teor de fenóis totais nas concentrações de 5; 7,5 e 10% foram respectivamente: 16,7; 18,9; 17,9% e para flavonoides foram de: 3,3; 4,1; 3,9%. Esses resultados demonstram que o ESPN apresenta um alto teor de fenóis e flavonoides totais, ao comparar as concentrações dos ESPN o que apresentou os melhores resultados foi o ESPN de 7,5%. Na avaliação da atividade antioxidante as CI_{50} para o radical DPPH encontradas para as concentrações de ESPN de 5; 7,5 e 10% foram de: 23,5; 31,5; 25,9 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, e para o ABTS foram de: 14,9; 21,8; 20,4. Estes resultados quando comparados com o padrão utilizado, o ácido ascórbico foram $2,7 \pm 0,3$ para o DPPH e $4,8 \pm 0,3$ para o ABTS, mostrou-se ± 10 vezes menor para DPPH e ± 5 vezes menor para ABTS. Na avaliação da inibição da tirosinase as CI_{50} encontradas para as concentrações de ESPN de 5; 7,5 e 10% foram de: 654,4; 436,9; 400,1 $\mu\text{g/ml}$. Fazendo uma comparação com o padrão que é o ácido kójico com CI_{50} de $14,5 \pm 1,7$, os extratos apresentam uma CI_{50} 30 vezes maior.

CONCLUSÕES

O resultado da caracterização físico-química da PN está dentro dos padrões de referência, o que permite usar os dados no controle de qualidade da MP. Com relação à atividade biológica notamos que os ESPN apresentam uma boa atividade, embora os valores encontrados sejam bem diferentes do padrão devemos lembrar que o mesmo é uma substância isolada e por isso o resultado encontrado é significativo. Com esses dados podemos pensar na utilização da *Passiflora nitida* em possíveis formulações farmacêuticas e cosméticas, sendo necessário aprofundar os estudos para maiores conclusões.

AGRADECIMENTOS

CNPQ, FAPEAM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 JUNQUEIRA, K.P.; FALEIRO, F.G.; RAMOS, J.D.; BELLON, G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; Variabilidade genética de acessos de maracujá-suspiro com

base em marcadores moleculares. **Revista Brasileira de Fruticultura**. n. 29, p. 571-575, 2007.

2 LIMA, E.S.; SCHWERTZ, M.C.; SOBREIRA, C.R.C.; BORRAS, M.R.L.; Efeito hipoglicemiante da farinha do fruto de maracujá-do-mato (*Passiflora nitida* Kunth) em ratos normais e diabéticos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. N. 14(2), p. 383-388, 2012.

3 HOPKINS, M.J.G.; SOUZA, M.A.D. Passifloraceae. In: RIBEIRO, J.E.L.S.; HOPKINS, M.J.G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C.A.; COSTA, M.A.S.; BRITO, J.M.; SOUZA, M.A.D.; MARTINS, L.H.P.; LOHMANN, L.G.; ASSUNÇÃO, P.A.C.L.; PEREIRA, E.C.; SILVA, C.F.; MESQUITA, M.R.; PROCÓPIO, L.C. **Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central**. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 1999. p. 299.

4 LIMA, E. S.; OLIVEIRA, N. S. M. de; CARVALHO, M. J. Fenóis totais e atividade antioxidante de extratos das folhas de maracujá-do-mato (*Passiflora nitida* H.B.K). In: 61ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 2009, Manaus, Brasil. **Resumo...** Manaus: UFAM, 2009.

5 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopéia Brasileira 5ª ed.** Brasília, 2010.

CARACTERIZAÇÃO DE ÓLEO DE MACAÚBA (*Acrocomia intumescense*) PARA DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA MICROEMULSIONADO

¹D.R. SILVA, ¹G.C.L. SILVA, ¹M.Y.F.A. REIS, ²M.V. SILVA, ²A.G. SILVA, ³G. MACHADO, ³J.V. MELO, ^{1*}K.L.A. SARAIVA

¹Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB; ²Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, Recife-PE; ³Laboratório de Microscopia e Microanálise, Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, Recife-PE

*karina.saraiva@gmail.com

RESUMO

A macaúba é uma palmeira nativa do cerrado brasileiro, popularmente usada como anti-inflamatório e antioxidante. Para formulação de microemulsões (ME) faz-se necessário a determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) do óleo, para uma melhor escolha de surfactantes e construção do diagrama de fases pseudoternário. O objetivo deste trabalho foi determinar o EHL do óleo de macaúba para sintetizar uma ME óleo em água de uso tópico. Como resultado, o valor de EHL obtido foi 13,5 e o sistema microemulsionado obtido foi composto por Tween 20, Span 65, propilenoglicol e água. Com isso, a ME de óleo de macaúba pode ser um potencial nanocosmético para terapia anti-envelhecimento.

INTRODUÇÃO

O organismo humano está frequentemente sujeito a diversas patologias, fazendo uso recorrente de medicamentos. Uma alternativa aos fármacos sintéticos e seus potenciais efeitos adversos são os medicamentos oriundos da vasta flora brasileira.

Os óleos vegetais são potenciais fitoterápicos, por sua riqueza em ácidos graxos, minerais, vitaminas e substâncias antioxidantes. Isso viabiliza o uso dos mesmos para inúmeros fins terapêuticos e estimula a indústria farmacêutica a investigar, cada vez mais, as novas propriedades destes compostos (HIANE et al., 2005; CICONINI, 2013).

Microemulsões são sistemas termodinamicamente estáveis de dois líquidos imiscíveis (água e óleo), estabilizados por um filme interfacial de tensoativos. As ME tem sido muito utilizadas como nanocarreadores para aplicação tópica, promovendo uma forma mais efetiva de entrega de fármacos, já que os tensoativos interagem com estrato córneo da pele possibilitando uma maior permeação (DAMASCENO et al., 2010).

A Macaúba é uma palmeira nativa do cerrado brasileiro e a partir de seus frutos extrai-se o óleo de macaúba, rico em fibras, vitaminas A e E, minerais e β -caroteno, sendo muito utilizado na medicina popular por suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (FERREIRA et al., 2013). Dessa forma, combinando-se o óleo de macaúba a um sistema nanoestruturado será possível explorar as propriedades farmacológicas desse composto natural *in situ*. Logo, é de fundamental importância caracterizar a físico-química do óleo de macaúba para formulação de uma nova forma farmacêutica.

OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi determinar o EHL crítico do óleo de macaúba para formulação de uma microemulsão o/a.

MATERIAS E MÉTODOS

A determinação do EHL foi realizada através da preparação de onze emulsões seriadas com EHL variando de 4,5 a 14,5. Elas foram compostas pela mistura dos tensoativos Tween 80 e Span 80 e preparadas pela técnica de inversão de fases (PIT). As fases aquosa e oleosa foram aquecidas em banho-maria 70 ± 5 °C, com posterior agitação em ultraturrax (9000 rpm/5 minutos). Após 24 horas, o pH e a condutividade foram mensurados, como também após o ensaio de ciclo gelo-degelo. A formação de creamagem foi observada por 28 dias. A turbidez foi analisada por meio de espectrofotômetro UV-Mini (Schimadzu), após diluição das amostras em água (0,25%), leitura em 726 nm, em triplicata. O teste de estabilidade acelerada foi realizado em uma microcentrifuga a 10.000 rpm por 30 minutos.

Após a caracterização, um digrama de fases foi construído, através da titulação de volumes de água-propilenoglicol (PPG) (3:1), sob agitação. O sistema foi composto pelos surfactantes Tween 20 e Span 65 (3:1) e o óleo. Este último foi adicionado à mistura de surfactantes nas proporções de 1:9 a 9:1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as emulsões produzidas apresentaram um pequeno grau de instabilidade no período de 28 dias de estocagem, que foi detectado através do índice de creamagem com variação de 0-0,7cm. Esta análise não pode ser usada isoladamente para predizer o valor de EHL de uma substância, pois não há uma distinção precisa entre a camada aquosa e a cremosa (ORAFIDYA & OLADIMEJI, 2002).

O comportamento das emulsões foi avaliado frente ao estresse térmico e centrifugação. Elas se tornaram instáveis após o desafio. Para que uma emulsão seja estável ela precisa apresentar-se contínua, ou seja, sem separação de fases após tais condições (LEAL et al, 2013).

O teste de turbidez indica o menor tamanho de gotícula para menores valores de absorção do feixe de luz emitido pelo equipamento, ou seja, maior transmitância. O menor tamanho de gotículas para as emulsões do óleo de macaúba foram detectadas na emulsão de EHL 13,5 (FIGURA 1). Adicionalmente, o PH das emulsões variou entre $5,68 \pm 0,06$ e $5,84 \pm 0,03$, e a condutividade variou entre $10,30 \mu\text{S}/\text{cm}^{-1} \pm 0,13$ e $12,24 \mu\text{S}/\text{cm}^{-1} \pm 0,03$ antes e após o ciclo gelo-degelo, respectivamente. Os menores valores estão, possivelmente, relacionados à perda de água.

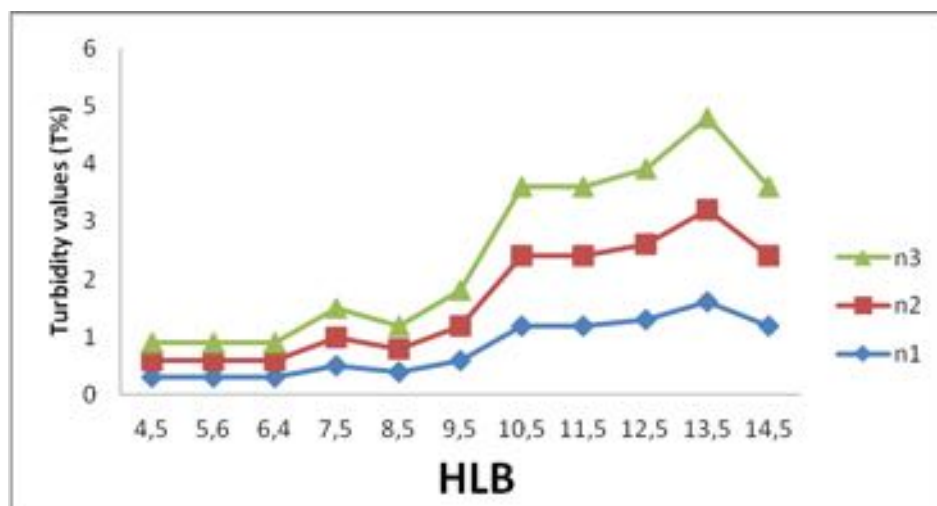


FIGURA 1: Valores de turbidez obtidos com o óleo de macaúba em função do EHL da emulsão. Maior valor de turbidez indica menor tamanho de gotícula.

A partir dos resultados de EHL encontrados, construiu-se o digrama de fases pseudoternário do óleo de macaúba. A região de microemulsão obtida encontra-se em destaque na figura 2. O sistema foi formado pela mistura de Tween 20, Span 65, água, propilenoglicol e óleo de macaúba na proporção citada acima (FIGURA 2).

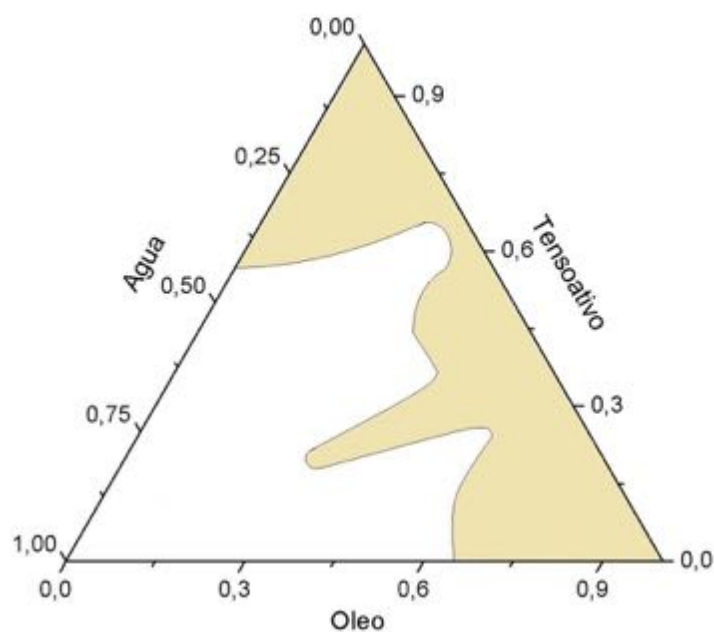


FIGURA 2: Diagrama de fases pseudo-ternário com região de microemulsão em destaque.

CONCLUSÕES

Este estudo buscou a síntese de uma nova forma farmacêutica contendo o óleo de macaúba para futura aplicação como um fitoterápico. A metodologia empregada neste

trabalho foi suficiente para a determinação do EHL do óleo, necessário para formulação de um sistema microemulsionado. Com isso, este potencial medicamento pode ser testado em modelos biológicos de inflamação.

AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), CETENE, UEPB e UFPE

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CICONINI, G. **Caracterização de frutos e óleo de polpa de macaúba dos biomas Cerrado e Pantanal do estado de Mato Grosso do Sul, Brasil**. 2011. 128f. Dissertação (mestrado em biotecnologia) – Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2011.

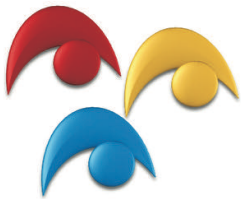
DAMASCENO, B.P.G.L.; et al. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.32,n.1,p.9-18, 2010.

FERREIRA, A. N.; SANTOS, C. P. A. dos; COSTA, G. L. de A.; GEBARA, K. S. Utilização do extrato de bocaiúva (*acrocomia aculeata*) como um alimento funcional do tipo “shake”. **Interbio**, v.7 n.1, 2013.

HIANE, P. A.; FILHO, M. M. R.; RAMOS, M. I. L., MACEDO, M. L. R. Óleo da polpa e amêndoa de bocaiúva, *acrocomia aculeata* (jacq.) lodd. Caracterização e composição em ácido graxos. **Brazilian Journal of Food and Technology**, v.8, n.3, p. 256-259, 2005.

LEAL,L.B. et al. Determination of the critical hydrophile-lipophile balance of licuri oil from *Syagrus coronata*: application for topical emulsions and evaluation of its hydrating function. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 1, 2013.

ORAFIDIYA,L.O; OLADIMEJI,F.A. Determination of the required HLB values of some essential oil. **International Journal of Pharmaceutics**.v.237,p.241-249,2002.



CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DE MICROPARTÍCULAS À BASE DE XILANA ORIUNDAS DE DIFERENTES FONTES PRIMÁRIAS

¹B.S. SOUZA, ¹K.C.H. SILVA, ²F. ALEXANDRINO JÚNIOR,
³H.R.MARCELINO, ^{1,2,3}E.S.T. EGITO.

¹Laboratório de Sistemas Dispersos (LaSiD), Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) - Natal-RN. socratesegito@gmail.com

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) - Natal-RN.

³Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) - Natal-RN.

Introdução: Micropartículas poliméricas à base de xilana (MPX) são sistemas inovadores com potencial para carrear e liberar fármacos de forma cólon-específica. A xilana pode ser obtida de diferentes origens como o sabugo de milho (X_1) e a faia (X_2). O objetivo deste trabalho foi comparar as propriedades físicas de micropartículas formadas a partir das diferentes xilanas: X_1 e X_2 . **Métodos:** Inicialmente foi realizada a análise de X_1 e X_2 pela técnica de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR). Para a produção das MPX, uma solução alcalina contendo xilana foi preparada e emulsionada com uma dispersão de clorofórmio:cicloexano 1:4_(v/v) contendo 5%_(p/v) de triestearato de sorbitano, por 10 minutos. Posteriormente, a reação de reticulação foi realizada utilizando cloridrato de tereftaloila. Ao término do processo, as micropartículas foram submetidas a sucessivas lavagens e armazenadas em água destilada. **Resultados e Discussão:** As MPX produzidas com X_1 e X_2 apresentaram tamanho médio e *Span Index* (SI) de $18,46 \pm 0,88 \mu\text{m}$, $\text{SI} = 2,44$, e $17,74 \pm 1,86 \mu\text{m}$ $\text{SI} = 3,32$, respectivamente. Quanto à morfologia ambas se apresentaram esféricas e com aspecto homogêneo. O mesmo espectro de FT-IR foi observado para X_1 e X_2 . Este fato adicionado da técnica empregada na produção pode explicar a semelhante distribuição do tamanho das MPX ($t(16)=0.4338$, $p=0.67$). **Conclusão:** A técnica utilizada para produção de MPX se mostrou robusta quanto a variação do tipo da xilana utilizada.

Apoio: CNPq, UFRN.

Palavras-chave: Micropartículas, xilana, métodos extrativos.



COMPARAR O PERFIL FARMACOCINÉTICO DO ANTI-RETROVIRAL LAMIVUDINA NA DOSE FIXA COMBINADA COM ZIDOVUDINA E A ADMINISTRAÇÃO ISOLADA.

¹T.S.FIGUEIREDO, D.E.D.SILVA, J.H.S.FILHO, D.P.SANTANA

¹Centro de Biodisponibilidade/Bioequivalência, Núcleo de desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético, Universidade Federal de Pernambuco. contato@nudfac.com.br

INTRODUÇÃO

A lamivudina (3TC) não pode ser utilizada isoladamente no tratamento de HIV, pois induz à resistência viral, no entanto a associação com a zidovudina dificulta esse processo de resistência e potencializa o efeito da zidovudina (AZT). Para evitar que os pacientes tenham que tomar diversos comprimidos ao dia foi desenvolvido a dose fixa combinada de AZT + TC. Este trabalho tem o objetivo de comparar a farmacocinética da lamivudina isolada com a associação com AZT.

MÉTODOS

Tratou-se de um estudo bioequivalência aberto, aleatório, cruzado 2x2, dose única, administração do medicamento em jejum em voluntários sadios. Os voluntários ficaram internados por um período de até 24 horas após administração da medicação, em cada período do estudo, retornando para uma coleta pontual.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se que administração da dose fixa combinada da associação de lamivudina e zidovudina provocou uma redução da C_{máx}, T_{máx} e ASC da lamivudina, no entanto essas alterações não foram estatisticamente significativas. Essas informações corroboram as obtidas às literaturas e a administração da lamivudina poderá ser realizada na forma de dose fixa e isolada sem afetar a sua farmacocinética.

CONCLUSÃO

Podemos concluir que a dose fixa combinada é uma forma viável e segura para administrar lamivudina e zidovudina associadas. A dose fixa combinada facilita a administração e aumenta a adesão ao tratamento por diminuir a quantidade de comprimidos tomados ao longo do dia

Palavras-Chave: Lamivudina, Zidovudina, associação.



DESENVOLVIMENTO DE DISPERSÕES SÓLIDAS, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA *IN VITRO* E ESTUDO DE MODELAGEM MOLECULAR COM NOVA ENTIDADE QUÍMICA 6CN

¹W.O. CARDOSO, ¹R.B. CHAVES, ¹P.T. RIBEIRO, ¹C.C. TAVARES, ²P.D.O. ALMEIDA, ²E.S. LIMA, ³F.J.B. MENDONÇA JÚNIOR, ¹A.A.N. LIMA

¹Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas. adleyantonini@yahoo.com.br

²Laboratório de Atividade Biológica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Amazonas

³Laboratório de Síntese de Fármacos, Universidade Estadual da Paraíba

RESUMO

A síntese de Novas Entidades Químicas (NEQ) aumentou nos últimos anos. Entretanto, essas moléculas apresentam problemas de solubilidade e biodisponibilidade. A utilização de matrizes poliméricas no desenvolvimento de dispersões é uma alternativa eficiente para as NEQ. Neste trabalho, realizou-se a modelagem molecular entre 6CN e polímeros PVP e PEG e avaliou-se a atividade antiinflamatória das dispersões. A dispersão 6CN-PVP apresentou uma estrutura química mais estável com a presença de uma ligação entre o hidrogênio do grupo amino do 6CN e o oxigênio do grupo carbonila do polímero, além disso, o complexo 6CN-PVP obtido por rotaevaporação também apresentou melhor atividade antiinflamatória, havendo uma comprovação da interação química e formação de dispersões sólidas entre o 6CN e o PVP.

INTRODUÇÃO

A inovação terapêutica é formada por uma série consecutiva ou não de etapas que visem ao descobrimento de novas substâncias com aplicação terapêutica. Esses compostos desenvolvidos são conhecidos como Novas Entidades Químicas (NEQ), os quais são moléculas candidatas a novos fármacos (Pronfar, Barreiro, & Manssour, 2005). Contudo, uma grande parte dessas NEQ apresentam problemas como: baixa solubilidade e biodisponibilidade, estabilidade e toxicidade. (Park, Dalton-Brown, Hirst, & Williams, 2006). O 2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (6CN), um derivado 2-aminotiofeno, foi sintetizado pela primeira vez por Gewald e colaboradores e, hoje, apresenta cerca de até quinze modificações para realizar a síntese de 2-aminotiofenos altamente funcionalizados (Scotti et al., 2012).

O 6CN é um derivado tiofênico com potencial atividade antiinflamatória e antifúngica e, como grande parte das Novas Entidades Químicas (NEQs), apresenta

problemas nas suas características físico-químicas, como baixa solubilidade em água, o que dificulta sua utilização. A utilização de matrizes poliméricas e o desenvolvimento de dispersões sólidas entre as novas moléculas e os polímeros mostram-se como uma alternativa eficaz para o aprimoramento das características das moléculas candidatas a novos fármacos (Lima, Sobrinho, Jr, & Neto, 2008). A polivinilpirrolidona (PVP) e o polietilenoglicol (PEG) são os polímeros mais amplamente utilizados para o desenvolvimento de dispersões sólidas, assim como as técnicas de malaxagem e rotaevaporação são as mais descritas para a produção das dispersões (Lima et al., 2011). Após o desenvolvimento das dispersões é de suma importância a sua caracterização, para a comprovação da formação do complexo (Lima et al., 2008). Neste trabalho usamos a modelagem molecular, para verificar a geometria otimizadas das dispersões formadas e o ensaio de produção de óxido nítrico (NO) para a determinação da atividade antiinflamatória.

OBJETIVOS

Desenvolver dispersões sólidas com a NEQ 6CN e os polímeros PVP e PEG, bem como determinar interações químicas através de modelagem molecular e avaliar a atividade antiinflamatória do 6CN e dispersões.

MATERIAIS E MÉTODOS

O 6CN foi sintetizado e fornecido pelo Laboratório de Síntese de Fármacos da Universidade Estadual da Paraíba. Foram desenvolvidas misturas físicas, dispersões sólidas de 6CN com os polímeros PEG 6000 e PVP (1:1 p/p). Utilizaram-se os métodos de malaxagem e de rotaevaporação para a obtenção das dispersões (Lima et al., 2011). As geometrias otimizadas dos complexos 6CN-PEG e 6CN-PVP foram obtidas utilizando o B3LYP/6-31G*, 25°C, vácuo, (Kong et al., 2000). Os cálculos foram obtidos pelo programa Spartan'10 (Spartan'10 Wavefunction, Inc. Irvine, CA). Os valores de energia intermoleculares (E) foram determinados como se segue: $\Delta E = E(\text{dispersão}) - \Sigma[E(\text{monômeros})]$. O ensaio de produção de óxido nítrico (NO) produzido por macrófagos murinos da linhagem J774 foi feito pela medição do acúmulo de nitrito no meio de cultura usando o reagente de Griess. Resumidamente, após incubação das células (1 x 10⁶ células / ml) com compostos diferentes (6CN, 6CN-PEG, 6CN-PVP, e suas respectivas misturas físicas) em concentrações entre 3,12 e 25µg/ml. As células foram incubadas durante 24 horas com LPS (1µg/ml), a 37°C numa atmosfera de 5% de CO₂. A absorbância do produto da reação foi determinada a 560 nm utilizando um leitor de microplacas (DTX 800, contador Beckman). Nitrito de sódio foi usado como um padrão para calcular as concentrações de nitrito.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação às estruturas moleculares (figura 1), foi observada uma interação clara entre o hidrogênio do grupo amina do 6CN e o oxigênio da carbonila do PVP a

uma distância de 1.8 angstroms (Å). Com relação a dispersão PEG-6CN, foram observadas duas interações na ordem de 2.6 Å entre os átomos das estruturas. Os valores de energia calculados (PVP-6CN: -41.52) e (PEG-6CN: -11.22) confirmam que é necessária menos energia quando a afinidade é maior, logo existe maior afinidade entre a dispersão 6CN-PVP. A dispersão desenvolvida entre 6CN-PVP pelo método de rotaevaporação mostrou-se a mais eficiente na redução da produção de NO por macrófagos murinos da linhagem J774 ativados por LPS, quando comparados com as outras dispersões e as respectivas misturas físicas. Na concentração de 12,5 µg/ml de 6CN-PVP [rotaevaporação] (figura 2b), a produção de NO ficou em torno de 3 µM, enquanto que na mesma concentração apenas com o 6CN (figura 2a), a produção de NO ficou em torno de 6 µM. Essa melhor atividade do 6CN-PVP também pode ser observada nas demais concentrações. Quando comparado com o seu controle (10 µM), o 6CN-PVP (rotaevaporação) apresentou uma atividade ainda mais acentuada na redução da produção de NO.

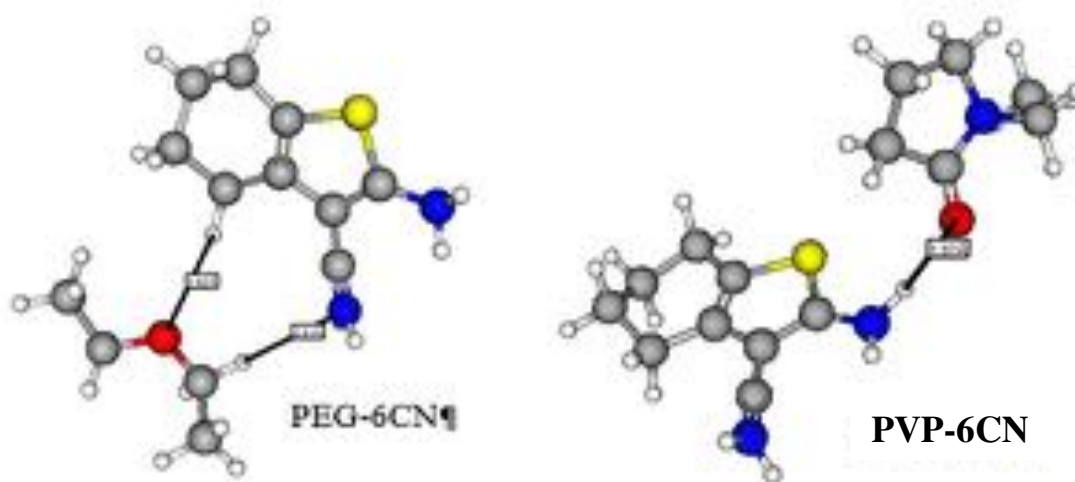


Figura 1: Modelagem molecular das dispersões sólidas formadas

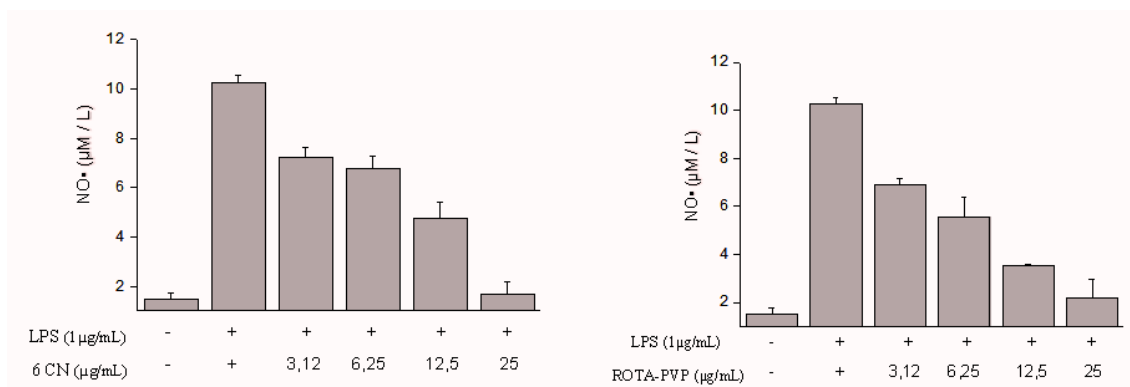


Figura 2a: efeito do 6CN na produção de NO pelas células em diferentes concentrações

Figura 2b: efeito da dispersão sólida PVP-6CN produzida por rotaevaporação (ROTA-PVP) na produção de NO pelas células em diferentes concentrações

CONCLUSÕES

A dispersão sólida desenvolvida com o polímero PVP apresentou-se como a mais estável, pela análise da geometria molecular. Além disso, o complexo 6CN-PVP produzido pela técnica de rotaevaporação apresentou mostrou-se mais eficiente na redução da produção de NO pelas células. Sendo assim, o PVP parece ser o polímero mais vantajoso para a produção de dispersões sólidas com o 6CN. Outros ensaios de caracterização físico-química ainda necessitam ser realizados para a confirmação desse prognóstico.

AGRADECIMENTOS

CNPQ

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 LIMA, A.A.N.; SOBRINHO, J.L.S.; LYRA, M. DE; ROLIM, L. A.; SANTOS, F.L.A.; ROLIM-NETO, P.J. The Use of Solid Dispersion Systems in Hydrophilic Carriers to Increase Benznidazole Solubility. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Vol. 100, 2443–2451. 2011

2 LIMA, A.A.N.; SANTOS, P.B.S.; LYRA, M. DE; SANTOS, F.L.A.; ROLIM-NETO, P.J. Solid dispersion systems for increase solubility: cases with hydrophilic polymers in poorly water soluble drugs. **Rev. Bras. Farm.** 92(4): 269-278, 2011

3 KONG, J.; WHITE, C. A.; KRYLOV, A. I.; ADAMSON, R. D.; FURLANI, T. R.; LEE, S.; POPLER, J. A. Q-Chem 2.0: A High-Performance. **Journal of Computational Chemistry** 21(16), 1532–1548, 2000.

4 LIMA, A.A.N.; SOBRINHO, J.L.S.; JUNIOR, R.A.C.C.; NETO, P. J. R. Alternative Technologies to Improve Solubility of Poorly Water Soluble Drugs. **Latin American of Journal Pharmacy**, 27(5), 789–797, 2008.

5 PARK, K.B.; DALTON-BROWN, E.; HIRST, C.; WILLIAMS, D.P. Selection of new chemical entities with decreased potential for adverse drug reactions. **European Journal of Pharmacology**, 549(1-3), 1–8, 2006. doi:10.1016/j.ejphar.2006.08.025.

6 BARREIRO, E. J.; MANSSOUR, A. A questão da inovação em fármacos no Brasil: proposta de criação do programa nacional de fármacos (PRONFAR). **Química Nova**, 28, 56–63, 2005.

7 SCOTTI, L.; SCOTTI, M.T.; LIMA, E.D.O.; SOBRAL, M.; ALVES, C.; PITTA, R.; MENDONÇA, B. Experimental Methodologies and Evaluations of Computer-Aided Drug Design Methodologies Applied to a Series of 2-Aminothiophene Derivatives with Antifungal Activities. **Molecules** 2298–2315, 2012. doi:10.3390/17032298.



DESENVOLVIMENTO DE EMULSÃO BASEADA EM ÓLEO DE GIRASSOL PARA VEICULAÇÃO DE FÁRMACOS VIA ORAL.

²K. C. H. SILVA, ¹V. R. VIANA, ¹D. A. GARÓFALO, ³I. E. G. FARIAS, ³K. S. SILVA, ²F. A. JÚNIOR, ^{1,2}K. G. H. e SILVA

¹Laboratório de Sistemas Híbridos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro

²Laboratório de Sistemas Dispersos, Faculdade Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte

³Natulab Tecnologia e Serviços SA

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo sistemático para o desenvolvimento de uma formulação para administração de fármacos via oral baseada em emulsão líquida utilizando óleo de girassol como fase interna. Para isso, o estudo de diagramas de fases pseudo-ternários foi utilizado como ferramenta para a identificação de regiões de emulsão com caráter líquido. Dois diagramas, utilizando proporções distintas de tensoativos, foram construídos. Os sistemas dispersos obtidos foram macroscopicamente classificados. A partir da análise dos diagramas 5 formulações foram selecionadas para estudo de caracterização. Ensaios de granulometria, estabilidade, foram realizados para a escolha da melhor formulação e posterior incorporação do ativo.

INTRODUÇÃO

A via oral é sem dúvida a melhor escolha para administração de medicamentos, principalmente no que se refere a aceitação pelos pacientes. Considerando que uma das principais causas da falta de adesão à um tratamento terapêutico está relacionado com a forma farmacêutica, o desenvolvimento de sistemas para administração oral está sempre em foco. Nesse contexto, as emulsões, devido as suas características de dispersão líquida, são uma excelente alternativa quando se faz necessário disfarçar características organolépticas desagradáveis, melhorar palatabilidade, veicular ativos lipossolúveis ou quando o medicamento é destinado a grupos distintos de pacientes como crianças e idosos. No entanto, o caráter termodinamicamente instável desses sistemas exige, durante a etapa de desenvolvimento da formulação, um estudo sistemático e complexo que garanta o conhecimento das características físico-químicas e de estabilidade do sistema (ROLAND, 2003; BURY, 2005).

As emulsões já são bastante conceituadas para as vias de administração tópica e parenteral, no entanto aquelas destinadas a via oral aparecem em número muito menor. Geralmente são do tipo óleo/água e tem como objetivo disfarçar o sabor e a textura desagradáveis do fármaco ou em alternativa as soluções oleosas. O desenvolvimento de emulsões para administração oral de fármacos consiste uma área de pesquisa

promissora, devido ao fato desses sistemas poderem modificar a biodisponibilidade de alguns fármacos. Uma importante consideração é que alguns compostos solúveis em óleo, como as vitaminas, são melhor absorvidos quando administrados em sistemas emulsionados do que quando administrados sob forma de solução oleosa, por exemplo (McCLEMENTS, 2007; SANTOS MAGALHÃES, 1991).

Para sistemas destinados à via oral, são preferíveis os óleos vegetais como componentes da fase interna, devido ao fato da sua boa digestibilidade, biocompatibilidade e capacidade de serem absorvidos pela via linfática. Nesse rol, o óleo de girassol, com sua composição rica em ácidos graxos insaturados e tocoferóis, surge com alternativa de escolha para o desenvolvimento de uma emulsão oral (ELMADFA, 1999; WHITE, 2008).

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma emulsão líquida composta de óleo de girassol para ser utilizada como veículo de formulações para administração oral.

MATERIAIS E MÉTODOS

Partindo de estudos prévios para determinação do Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL) do óleo de girassol, dois diagramas ternários foram construídos com o intuito de estudar o comportamento das fases em função do sistema tensoativo. A partir do diagrama no qual houve maior região de emulsão líquida, 5 formulações foram escolhidas e preparadas pelo método de inversão de fases: aquecendo-se as fases aquosa e oleosa separadamente à $75 \pm 5^\circ\text{C}$, em seguida a fase aquosa foi vertida sobre a oleosa sob agitação em Ultraturrax por 2 minutos à 13.000 rpm. Os aspectos organolépticos das formulações, assim como uma variação na sua estabilidade (presença de cremagem, coalescência e/ou separação de fases), foram avaliados por inspeção visual e índice de cremagem.

As emulsões foram armazenadas e suas características físico-químicas analisadas após 24 horas o preparo e nos dias 5, 7, 35 e 45. As análises de pH e condutividade foram realizadas nos dias de pré-determinados. A análise granulométrica foi realizada utilizando um difratômetro laser Mastersizer 2000 com o módulo Hydrosizer 2000S (Malvern Instruments, UK). As amostras foram extemporaneamente dispersas em água purificada a 2500 rpm. Os cálculos para distribuição de tamanho de gotícula foram baseados na teoria de Mie-Scattering e o diâmetro médio calculado foi baseado no volume (D[4,3]). Todas as medidas foram realizadas em triplicata e os resultados foram analisados pela distribuição volumétrica. O índice de cremagem foi avaliado com o auxílio de uma escala graduada, através da razão entre a altura da camada de cremagem com a altura total da emulsão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O diagrama utilizando proporção de Span 80 e Tween 20 (25:75) demonstrou maior área de emulsão óleo/água, como era esperado, uma vez que nessa proporção de tensoativo é alcançado o EHL do óleo de girassol. O estudo de fases utilizando diagramas pseudo-ternário confirmou que quando se utiliza proporção de tensoativos corresponde ao EHL do óleo, neste caso específico 13,7, emulsões mais estáveis podem ser produzidas. A partir deste diagrama, das 5 formulações escolhidas apenas a Formulação 1 (composta por 78% de água; 7,8% de óleo; e 13,25% de tensoativo) demonstrou características físico-químicas e de estabilidade aceitáveis dentro do intervalo de 45 dias. Os resultados dos ensaios de pH, condutividade, índice de cremagem e distribuição de tamanho de gotícula estão expostos na Tabela 1 e confirmam a estabilidade da formulação.

Um dos principais fatores que influenciam na estabilidade desses sistemas é a homogeneidade do tamanho de gotícula. A Figura 1 mostra que a formulação mais estável (Formulação 1) possui comportamento unimodal quando se analisa esse parâmetro.

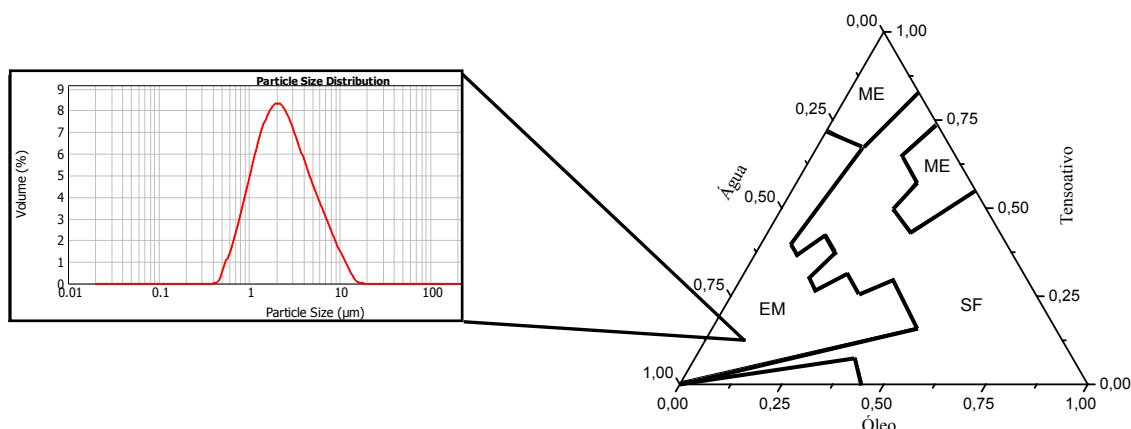


Figura 1. Diagrama pseudo-ternário dos sistemas compostos por óleo de girassol, água e tensoativos (Span 80 e Tween 20 - 75:25) e distribuição do diâmetro hidrodinâmico da Formulação 1, obtido por espalhamento de luz.

Tabela 1. Características físicas e físico-químicas da Formulação 1.

ANÁLISE/DIA	D1	D7	D35	D45
pH	5,82	5,90	5,89	5,75
Condutividade (μS)	206,21	208,27	208,87	201,97
Índice de Cremagem (%)	2,11	4,21	7,36	10,52
Volume hidrodinâmico (μM)	3,05	7,86	7,34	7,69
SPAN $D_{4,3} = (d_{0,9} - d_{0,1})/d_{0,5}$	2,33	2,32	2,20	2,34

CONCLUSÕES

Neste estudo, uma formulação emulsionada contendo óleo de girassol com características físico-químicas e de estabilidade aceitáveis para administração oral de fármacos foi desenvolvida. O processo de inversão de fase foi satisfatório para a produção dessa formulação. Apesar das dificuldades durante a etapa de desenvolvimento, as emulsões continuam a ser veículos factíveis e econômicos para fármacos insolúveis em água. Em etapas posteriores, fármacos insolúveis em água serão incorporados nessa formulação e parâmetros de biodisponibilidade serão avaliados.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao fomento recebido da FAPERJ, a colaboração de pesquisadores do Laboratório de Sistemas Dispersos - UFRN, e a Profa. Dra. Valéria Pereira de Souza pela infra-estrutura do Laboratório de Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos - UFRJ.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BURY, M., et al. Application of a New Method Based on Conductivity Measurements to Determine the Creaming Stability of O/W Emulsions. **Int. J. Pharm.**, v.124, n.2, p. 183-194, 1995.

ELMADFA, I. e PARK, E. Impact of diets with corn oil or olive/sunflower oils on DNA damage in healthy young men. **Eur J Nutr**, v.38, n.6, p.286-292, 1999.

McCLEMENTS, D.J., DECKER, E.A. WEISS, J. Emulsion-Based Delivery Systems for Lipophilic Bioactive Components. **Journal of Food Science**, v. 72, n.8, p.R109-R124. 2007

ROLAND, I., et al. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. **Int. J. Pharm.**, v.263, n.1-2, p.85-94, 2003.

SANTOS MAGALHÃES, N. S. **Etude d'une emulsion destinee a la voie orale: obtention, phenomenes de surface, liberation du principe actif.** 1991. 72-88 p. Unite de Formation Doctorale et de Recherche - Faculte de Pharmacie de Chatenay-Malabry, Universite Paris-Sud, Paris, 1991.

WHITE, D. A., et al. Sunflower-seed oil body emulsions: Rheology and stability assessment of a natural emulsion. **Food Hydrocolloids**, v.22, n.7, p.1224-1232, 2008.



DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA QUANTIFICAÇÃO DO LPSF/GQ-130

NASCIMENTO A.L.S.¹; VIEIRA, A.C.Q.M.¹; MELO, C.M.M.¹; ROLIM, L.A.¹; LIMA, M.C.A.²; PITTA, I.R.²; ROLIM-NETO, P.J.¹

¹Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos, Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Pernambuco.

²Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco.

andrenascimento2012@gmail.com

RESUMO

O LPSF/GQ-130 é um protótipo de atividade anti-inflamatória promissora. Diante da ausência na literatura de método analítico de quantificação, este trabalho objetivou seu desenvolvimento e validação por CLAE. Foram avaliados: composição e fluxo da fase móvel (FM), preparo das amostras e temperatura; tendo como parâmetros de escolha o tempo de retenção (TR) e reprodutibilidade da área dos picos obtidos. A validação seguiu os critérios da RE 899/03. A metodologia final (FM acetonitrila/água 85:15; fluxo 2mL/min; temperatura 30°C; e amostras em acetonitrila/água 70:30) apresentaram os parâmetros estabelecidos pela RE 899/03. Assim, foi possível desenvolver um método adequado para quantificação do protótipo e de grande utilidade para obtenção de sistemas carreadores.

INTRODUÇÃO

O LPSF/GQ-130 é uma tiazolidinodiona que apresentou efeitos anti-inflamatórios promissores, segundo estudos realizados por Santos (2009). Entretanto, este protótipo a fármaco apresenta baixa solubilidade aquosa, o que pode repercutir em uma absorção errática pelo organismo (VIEIRA et al., 2013), necessitando de intervenção tecnológica para modular esta propriedade, tais como a obtenção de novos sistemas carreadores.

Entretanto, por se tratar de uma substância nova, não há relatos na literatura de métodos de quantificação, sendo este um empecilho para o desenvolvimento de novos sistemas, já que a quantificação do protótipo em água é imprescindível para averiguar os benefícios trazidos pelos sistemas desenvolvidos.

Assim, este trabalho objetiva preencher esta lacuna, através do desenvolvimento e validação de um método de quantificação do LPSF/GQ-130 por cromatografia líquida de alta eficiência.

OBJETIVOS

Desenvolver e validar um método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para doseamento do LPSF/GQ130

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

LPSF/GQ-130, solventes, reagentes e equipamentos

Os materiais utilizados foram: LPSF/GQ-130 (cedido pelo laboratório de planejamento e síntese de fármacos – UFPE); álcool metílico P.A.; álcool etílico P.A.; acetona; diclorometano; acetonitrila grau HPLC; água ultrapura.

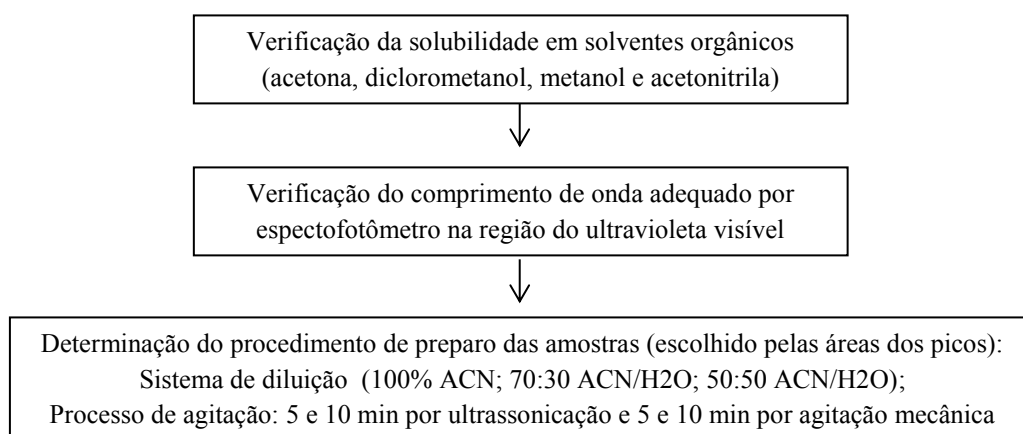
Os equipamentos e vidrarias utilizados foram: vidrarias volumétricas (Satelit®), com certificado de calibração por lote pelo fabricante; balança analítica Bioprecisa®, (FA2104N), Ultra-som 1.500 Barnson® e Cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE-DAD) modelo DGU-20 A5, Shimadzu®.

MÉTODO

Preparo das amostras

A avaliação da interferência do preparo das amostras foi realizada conforme expresso na Figura 1.

Figura 1 – Procedimento de seleção do preparo das amostras.



Determinação da composição da fase móvel

A fase móvel foi determinada observando-se como fator resposta o tempo de retenção do pico. Foram testados cinco fases móveis: 1) 75% ACN + 15% MeOH + 10% H2O; 2) 65% ACN + 15% MeOH + 20% H2O; 3) 65% ACN + 35% H2O; 4) 75%

ACN + 25% H₂O; 5) 85% ACN + 15% H₂O. Foram mantidos os outros parâmetros, tais como temperatura (30°C), fluxo (1,5 mL/min) e volume de injeção das amostras (20 µL).

Determinação dos parâmetros do equipamento

Com a fase móvel e o método de obtenção das soluções concentradas e diluídas, variou-se a temperatura do forno (30 e 25°C) e o fluxo da fase móvel (1,5 e 2,0 mL/min).

Validação do Método de Quantificação do LPSF/GQ-130 por CLAE-DAD

A validação da metodologia analítica foi validada conforme critérios estabelecidos pela RE n° 899/03.

Tratamento Estatístico

Todos os resultados foram tratados estatisticamente através do teste ANOVA, com um nível de significância de 95%, através do software OriginPro 8®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

DESENVOLVIMENTO

Devido a solubilidade do LPSF/GQ-130 nos solventes testados, a acetonitrila (804,0119 µg/mL) foi determinada como o solvente de escolha para o preparo das amostras.

No preparo das soluções concentradas, os diferentes métodos de agitação geraram resultados estatisticamente diferentes entre si (p -valor < 0,05), sendo selecionado o de melhor resultado (sonicação por 10 min).

As fases móveis 1 e 5 (TR < 10 min) apresentaram-se apropriadas para o método, pois sugerem a elaboração de um método rápido, ideal para a finalidade pretendida. Ainda, foi determinado como fase móvel de escolha a de número 5, uma vez que a 1 apresenta risco de recristalização do protótipo no interior do equipamento.

O aperfeiçoamento do preparo das amostras foi realizado de acordo com as áreas obtidas através da diluição de alíquotas da solução concentrada em diferentes proporções de ACN:H₂O (100% ACN; 70% ACN; e 50% ACN). Assim, foram demonstradas diferenças estatisticamente significativas entre si (p -valor < 0,05), sendo os estudos prosseguidos com solução 70% de ACN.

Outros parâmetros, tais como a temperatura do forno do equipamento e o fluxo da fase móvel também foram avaliados. De acordo com os resultados, o fluxo de 2 mL.min⁻¹ apresenta TR menor do que o fluxo 1,5 mL.min⁻¹ (6,58 e 8,55 min, respectivamente), sendo o fluxo de 2 mL.min⁻¹ e a temperatura de 25°C as escolhidas.

VALIDAÇÃO

As condições finais do método desenvolvido atingiram os parâmetros solicitados pela RE 899/03, demonstrando atender a linearidade ($R^2 = 0,9992$), especificidade (p -valor = 0,066), exatidão (CV% 0,0206), preciso (repetibilidade e precisão intermediária: p -valor > 0,05); robusto (variação temperatura: $p = 0,99$; variação fluxo: $p = 0,1$)

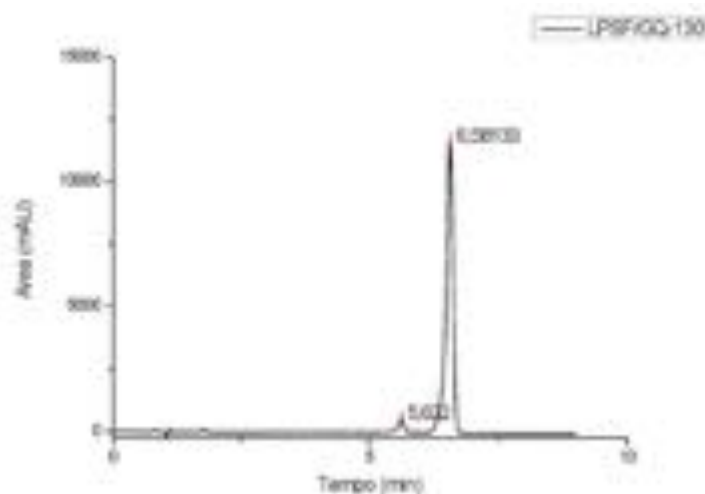


Figura 1: Cromatograma do LPSF/GQ-130 obtido por CLAE, com fase móvel ACN/H₂O 85:15 (2 ml.min⁻¹), a 25°C.

CONCLUSÕES

O desenvolvimento e validação do método de doseamento do LPSF/GQ-130 foram alcançados de acordo com as especificações colocadas pela RDC 899/03, sendo possível sua utilização para averiguação incremento de solubilidade aquosa dos sistemas a serem desenvolvidos.

AGRADECIMENTOS

À CAPES e PIBIC-CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

RODRIGUEZ-VITA, J.; LAWRENCE, T. The resolution of inflammation and cancer. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 21, n.1, p. 61-65, 2010.

TLASKALOVA-HOGENOVA, H.; TUCKOVA, L.; STEPANKOVA, R.; HUDCOVIC, T.; PALOVA-JELINKOVA, L.H.; ROSSMANN, P.; SANCHEZ, D.; CINOVA, J.; HRNCU, T.; KVEKA, N.; FROLOVA, L.; UHLIZ, H.; POWRIE, F.; BLAND, P. Involvement of innate immunity in development diseases. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1051, pp.787-798, 2005.

SOARES-SOBRINHO, J.L.; SOARES, M.F.R.; LOPES, P.Q.; CORREIA, L.P.; SOUZA, F.S.; MACÊDO, R.O.; ROLIM-NETO, P.J. A Preformulation Study of a New Medicine for Chagas Disease Treatment: Physicochemical Characterization, Thermal Stability, and Compatibility of Benzimidazole. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 3, pp. 1391-1396, 2010.

BATLOUNI, M. Anti-inflamatórios não esteroides: efeitos cardiovasculares, cerebrovasculares e renais. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n. 4, pp. 556-563, 2010.

SANTOS, I.B.V.; **Síntese e Atividades Anti-inflamatória e Antinociceptiva de Novas Tiazolidinadionas**. 2009. 96p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

OXER, D.S. **Interação entre as vias de sinalização CD40 / CD40L e os PPARs**. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SANTOS, L.C.; UCHÔA, F.T.; MOURA, R.O.; LIMA, M.C.A.; GALDINO, S.L.; PITTA, I.R.; BAERBE, J. Synthesis and anti-inflammatory activity of new thiazolidine-2,4-diones, 4- thioxothiazolidinones and 2-thioxoimidazolidinones. **Heterocyclic Communications**, v. 11, n. 2, pp. 121-128, 2005.

VIEIRA, A.C.Q.M.; MARQUES, G.S.; MELO C.M.; SILVA, K.E.R.; ROLIM, L.A.; LIMA, M.C.A.; GALDINO, S.L.; PITTA, I.R.; ROLIM-NETO, P.J. **Physical-chemical characterization of new anti-inflammatory agent (LPSF/GQ-130) and evaluation of its thermal compatibility with pharmaceutical excipients**. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry. 2013. 10.1007/s10973-013-3358-y



**DETERMINAÇÃO DE ÁGUA E ÓLEOS VOLÁTEIS DE *Thuja occidentalis* Linn.
(Cupressaceae)**

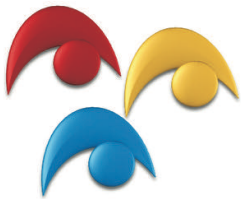
**¹L.D.S. ALVES¹; ¹C.B.M FIGUEIRÊDO; ¹C.C.A.R. SILVA; ¹L.R.M. FERRAZ*;
¹G. S. MARQUES; ¹P.A. FERREIRA; ¹R.F. SILVA; ¹M.F.L.R. SOARES; ¹L.A.
ROLIM; ¹P.J. ROLIM NETO.**

¹Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco. *lrpha@hotmail.com

Introdução: *Thuja occidentalis* é uma planta medicinal utilizada amplamente no tratamento de infecções do trato respiratório. Estudos fitoquímicos dão destaque para os óleos essenciais, sendo a sua quantificação de extrema relevância. Adicionalmente, a perda por dessecação permite determinar o teor de compostos voláteis, incluindo água, que favorece reações de hidrólise e contaminação de microbiana, possibilitando a avaliação da secagem e armazenamento. O presente trabalho tem por objetivo Determinar a teor de água e óleos essenciais, através da correlação das técnicas de perda por dessecação com o método volumétrico de Karl Fischer para a determinação de água e o método Clevenger para óleos voláteis. **Métodos:** Cultivou-se a espécie no Cabo-PE, coletada em out/2011 e identificada pela curadora Rita de Cássia Pereira, com exsiccata depositada no herbário do IPA (nº 87752). As partes aéreas foram lavadas, secas em estufa (120 h/ 40°C) e pulverizadas. A droga vegetal foi submetida aos ensaios de perda por dessecação e determinação de água por Karl Fischer, segundo a Farm. Bras. 5ª Ed. Para a quantificação dos óleos voláteis, realizou-se a extração por hidrodestilação através do aparelho de Clevenger. Pesou-se 30 g da droga que foi transferida para balão de fundo chato com 250 mL de água e hidrodestilada por 3 h. **Resultados e Discussão:** A perda por dessecação determinou um valor de 6,92%, abaixo dos limites máximos apresentados nas monografias das drogas vegetais (8 a 14%). Na determinação de água por Karl Fischer o valor médio foi de 5,30%. Assim, de acordo com a perda por dessecação, conclui-se que cerca de 1,62% poderia ser atribuído aos demais constituintes voláteis, majoritariamente os óleos. Contudo, determinou-se um valor de 0,7% e, portanto, inferior ao teórico previsto. Este, no entanto, encontra-se em conformidade com o teor de óleos essenciais apresentados na literatura. **Conclusão:** O baixo conteúdo de umidade indica que houve eficiência na secagem, proporcionando estabilidade. Adicionalmente, as técnicas possibilitaram a caracterização da droga vegetal pelos parâmetros estabelecidos.

Apoio: FACEPE.

Palavras-chave: *Thuja occidentalis*; caracterização; padronização.



DEVELOPMENT OF XYLAN-BASED MICROPARTICLES BY FREE-ORGANIC SOLVENT METHOD AND ITS BIOCOMPATIBILITY WITHIN CACO-2 LINES

^{1,2}H.R Marcelino, ²M.J. Chen, ²H. Derendorf, ¹E.S.T. Egito

¹Laboratório de Sistemas Dispersos, Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. socratesegito@gmail.com

²Department of Pharmaceutics, University of Florida.

ABSTRACT

Xylan has been studied as a potential raw material to the pharmaceutical field, mainly to the production of drug carriers. Therefore, the majority of techniques used to produce drug carriers (e.g. microparticles) use organic solvents, which are considered toxic to both the environment and the humans. The aim of this work was to produce microparticles applying a method free of organic solvents. Additionally, aiming to guarantee the biocompatibility of the microparticles the raw materials were also tested by their cytotoxicity. The electron microscopy confirmed that the microparticles were produced, and the *in vitro* assay showed that both the compounds and the microparticles were biocompatible. Thus, the technique and the materials used on this study have potential application on pharmaceutical research.

INTRODUCTION

Xylan is a polysaccharide based on monomers of d-xylose. Its application on the industrial field, mainly pharmaceutical, has been suggested due to its abundance, biocompatibility and renewability (Oliveira *et al.*, 2010).

The application of biopolymers on the pharmaceutical field has many different objectives. Among them, the target controlled release has been received much attention. To achieve this goal many microparticle formulations have been suggested (Liu *et al.*, 2008).

Furthermore, xylan use has been described for the production of target colon delivery systems (Nagashima *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2013).

OBJECTIVES

The goal of this work was to produce xylan-based microparticles (XBM) by a free-organic solvent technique, as well as, to evaluate the cell availability (caco-2 cell line) in different samples of xylan and XBM.

MATERIALS E METHODS

Materials

Xylan, trisodium trimetaphosphate (TSTP) and Pluronic[®] F68 were purchased from Sigma (USA). Polyethylene Glicol (PEG) 8000 and Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) came from Fischer (USA).

Production of xylan-based systems

As a first step, a 20 %_(w/v) xylan solution containing 2 %_(w/v) of TSTP was prepared in 0.325 M sodium hydroxide (NaOH) medium. This solution was drop wisely added into a 30 or 40 %_(w/v) PEG 8000 or Pluronic[®] F68 (PF68) solution under magnetic stirring. Afterwards, the emulsion was incubated at 40°C for 8 h. The reaction was stopped by the addition of ethanol, and washing steps were carried out with 10mM acetate buffer (pH=5.01) and water. At the end, the suspensions were lyophilized for 48h. (Li 2012)

Preparation of the samples

The solutions used on the cell viability assay were prepared by the solubilization of TSTP in water and xylan in 1N NaOH. For the assay, the dilutions were made with the DMEM.

Microparticle citotoxicity

The caco-2 cells were seeded into a 48-well plate at 6×10^3 . The plates were incubated for 48h at 37°C in humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. Afterwards, 200 μL of samples were added. The dilutions of the samples were made with DMEM. The addition of the MTT reagent was performed 24h later. All the assays were performed in triplicate, whereas the morphological analysis was performed only for one well of each sample.

Morphological analysis

The scanning electron scanning microscopies were performed for the XBM. Additionally, a morphological analysis of the caco-2 cells after treatment with xylan and TSTP was carried out.

RESULTS AND DISCUSSION

To evaluate the morphology of the XBM all samples were lyophilized. At the end of the lyophilization process white samples with elastic properties were obtained.

Apparently the formulations showed wide particle size distribution, from sub-micrometric size to 20 μm (Figure 1), with no relationship among polymer, concentration and the particle size distribution. Additionally, it was possible to observe

several sheet-like structures, which might remain from the external phase of the emulsion (Pluronic[®] F68 or PEG 8000).

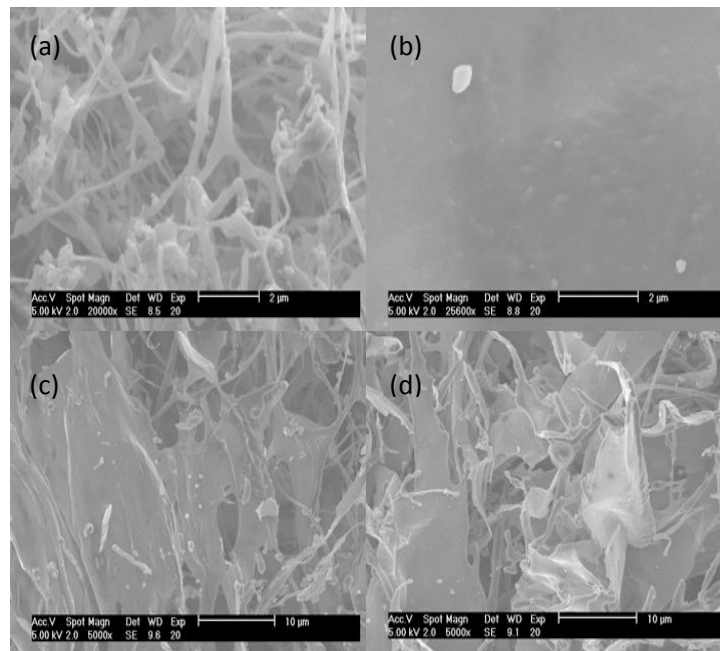


Figure 1: Transmission electron micrography. (a) XBM PF68 40%, (b) XBM PF68 30%, (c) XBM PEG8000 30% and (d) XBM PEG8000 40%.

The results from the MTT analysis showed that xylan and TSTP are not toxic to caco-2 cells (Figure 2a). This is a quite important finding, mainly for the TSTP due to its ability to bind with other molecules and be potentially cytotoxic (Melo-Silveira *et al.*, 2012).

As expected from the MTT assay, the XBM also showed a high cell viability, 74.99 ± 4.94 %, 84.68 ± 2.85 %, 75.66 ± 9.71 %, and 75.43 ± 9.36 % for XBM 30% PEG 8000, XBM 40% PEG 8000, XBM 30% Pluronic[®] F68 and XBM 40% Pluronic[®] F68, respectively (Figure 2b).

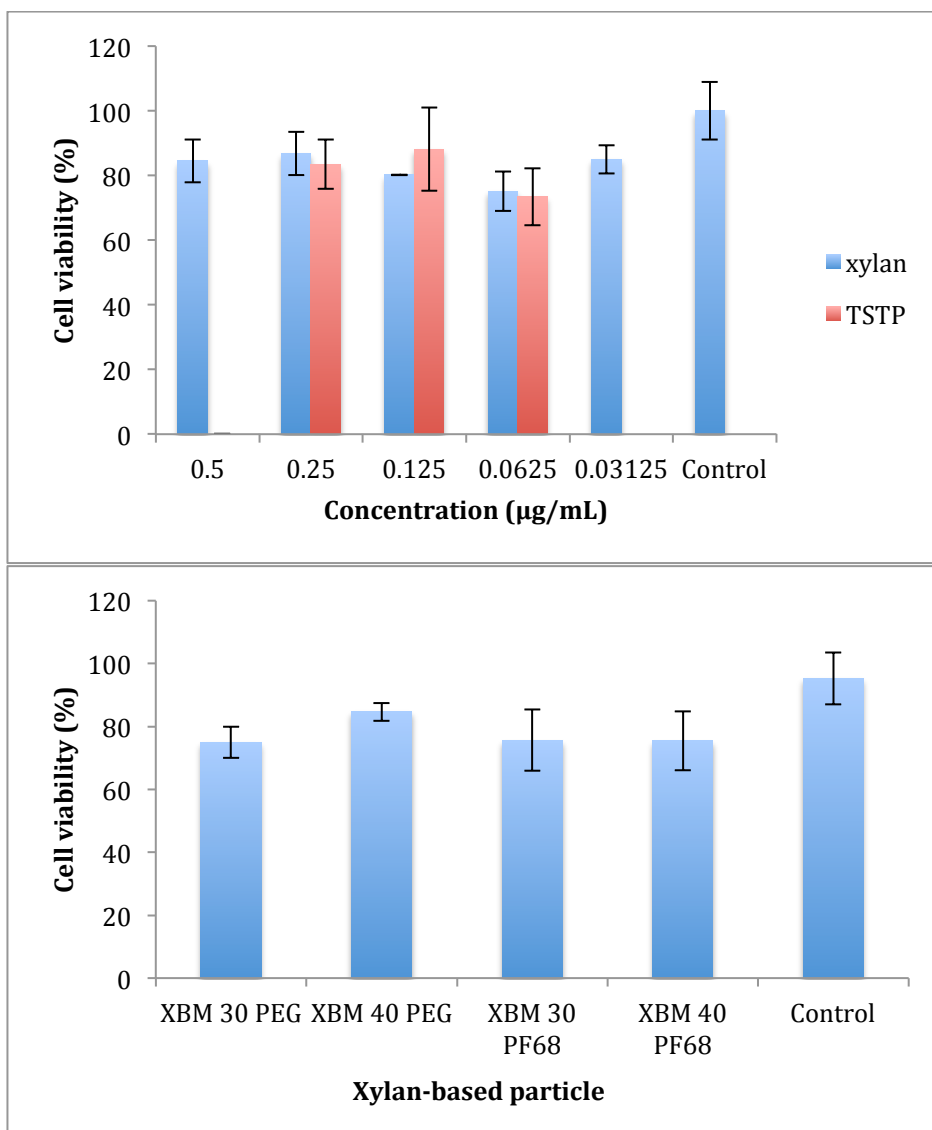


Figure 2 : (a) MTT assay of xylan and TSTP solutions, and (b) MTT assay for XBM systems.

At the end, it was not possible to make a correlation between the XBM concentration and cell availability due to the biocompatibility of all samples.

CONCLUSIONS

The water-in-water emulsion showed to be a potential technique to produce XBM. However, much attention should be spending for the choice of the external phase. Polymers with the same chain average size showed to produce microparticles with different morphological characteristics.

On the other hand, all the tested samples were biocompatible with caco-2 cells. Therefore, XBM has a great potential as drug carrier.

ACKNOWLEDGMENT

The authors are grateful to the Associate Professor Sihong Song for providing the immortalized caco-2 cells, and Professor Guenther Hochhaus for the facility in which the microparticles were produced. Additionally, Henrique Rodrigues Marcelino is grateful to CAPES/PDSE 0223-12-5 for the studentship.

REFERENCES

LIU, Z. *et al.* Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 15, p. 1650-62, Dec 14 2008. ISSN 1872-8294 (Electronic)

0169-409X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18848591> >.

MELO-SILVEIRA, R. F. *et al.* In vitro antioxidant, anticoagulant and antimicrobial activity and in inhibition of cancer cell proliferation by xylan extracted from corn cobs. **International Journal of Molecular Science**, v. 13, n. 1, p. 409-26, 2012. ISSN 1422-0067 (Electronic)

1422-0067 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22312261> >.

NAGASHIMA, T., JR. *et al.* Influence of the lipophilic external phase composition on the preparation and characterization of xylan microcapsules--a technical note. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 3, p. 814-7, 2008. ISSN 1530-9932 (Electronic)

1530-9932 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18607759> >.

OLIVEIRA, E. E. *et al.* Xylan from corn cobs, a promising polymer for drug delivery: production and characterization. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5402-6, Jul 2010. ISSN 1873-2976 (Electronic)

0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20171878> >.

SILVA, A. E. *et al.* Producing xylan/Eudragit(R) S100-based microparticles by chemical and physico-mechanical approaches as carriers for 5-aminosalicylic acid. **Journal Microencapsulation**, Apr 30 2013. ISSN 1464-5246 (Electronic)

0265-2048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23631384> >.



ESTABILIZAÇÃO DE PONTOS QUÂNTICOS EM FORMAS FARMACÊUTICAS GELIFICANTES PARA APLICAÇÃO EM TERAPIA FOTODINÂMICA

¹V. A. Almeida, ²O. S. Viana, ²B. S. Santos, ¹A. Fontes

¹Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Centro Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. victor.avelinodealmeida@gmail.com

²Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

Introdução: Os pontos quânticos (PQs) são nanocristais de semicondutores e têm se destacado como sondas fluorescentes em diagnóstico e para elucidação de processos biológicos. Mais recentemente, o potencial dos PQs para terapia fotodinâmica (TFD) começou também a ser investigado. Neste trabalho foram elaborados géis, à base de PQs, para se aprimorar a estabilidade dessas nanopartículas e facilitar sua veiculação no tratamento fotodinâmico. **Métodos:** Foram utilizados natrosol ou carbopol para os géis e, adicionadas a ele diferentes alíquotas de PQs de CdTe (Telureto de Cádmio) com emissão do verde ao vermelho. A caracterização óptica dos géis, com e sem PQs, foi feita por espectroscopias de absorção e emissão. Para a detecção de espécies reativas de oxigênio (ROS), as amostras foram irradiadas por LED (415 nm, 31 mW) por até uma hora. A produção de ROS foi avaliada pela atenuação da densidade óptica (440 nm), como consequência da degradação da L-histidina pela N,N-dimetil-4-nitrosoanilina. **Resultados/Discussão:** O gel carbopol foi incapaz de estabilizar os PQs. O gel natrosol não interferiu nas propriedades ópticas dos PQs e permaneceu estável por pelo menos 3 meses. Além disso, todos os PQs foram capazes de produzir ROS após serem incorporados neste gel. **Conclusão:** O gel natrosol manteve as propriedades ópticas dos PQs e a produção de ROS. Portanto, esses resultados abrem perspectivas para o desenvolvimento de preparações cosméticas e tópicas, à base de PQs, para TFD.

Apoio: CNPq, FACEPE, CAPES, INCT de Fotônica (INFo).

Palavras-Chave: Ponto Quântico, Terapia Fotodinâmica, Gel Natrosol, Gel Carbopol, Nanotecnologia.



ESTUDO DE COMPATIBILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DA IVERMECTINA E CITRATO DE DIETILCARBAMAZINA UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA FILARIOSE LINFÁTICA

¹I.M.F. OLIVEIRA, ²M.L.C.M. GONÇALVES, ³L.A. ROLIM, ¹L.L. CHAVES,
²M.F.R. SOARES, ²J.L. SOARES-SOBRINHO, ¹P.J. ROLIM-NETO

¹Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco. Isabellamfreitas15@gmail.com

²Núcleo de Controle de qualidade de medicamentos e correlatos, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco

³Central Analítica, Colegiado de Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do São Francisco

RESUMO

A OMS considera a filariose linfática como potencialmente erradicável e planeja eliminá-la por meio de programas de administração em massa de medicamentos. Três compostos ativos são utilizados como estratégia para extingui-la: citrato de dietilcarbamazina (DEC), albendazol e ivermectina (IVC). O estudo realizado visou à compatibilidade físico-química da DEC e IVC, através do desenvolvimento de forma farmacêutica de associação em dose fixa objetivando contribuir para a erradicação da doença. Foram obtidos perfis térmicos, espectros e cromatogramas, para a DEC e a IVC de forma isolada, bem como avaliações para a compatibilidade dos dois fármacos em misturas por meio de análise térmica (DSC/TG), espectroscopia na região do infravermelho e estudo de estabilidade (CLAE-DAD).

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a filariose linfática tem aparecido como um problema crescente na saúde pública em várias partes do mundo. A debilitação física e o estigma social associados à filariose linfática têm sido considerados como a segunda causa mundial de incapacidade para o trabalho. Nas áreas em que a doença é endêmica, a prevalência de infecção aumenta continuamente, principalmente, pela criação de condições ideais para a multiplicação dos focos de mosquitos transmissores da doença, o *Culex quinquefasciatus*. Assim, a bancroftose é considerada hoje uma doença reemergente. O tratamento antifilarial está indicado em todos os indivíduos com evidências de infecção ativa, independentemente de apresentarem ou não qualquer manifestação clínica. A droga de escolha para o tratamento individual é a dietilcarbamazina (DEC). Porém, o poder adulticida da droga não é 100% e estima-se que cerca de 50 a 60% dos vermes adultos são refratários ao tratamento. Dessa forma,

ocorrendo falha no tratamento com a DEC, deve-se lançar mão da co-administração com a ivermectina (IVC). Essa indicação visa a melhor ação microfilaricida encontrada com a combinação das duas drogas e, conseqüentemente, a obtenção de um maior tempo de depuração plasmática das microfílaras circulantes. A utilização da terapia de associação em dose fixa é uma poderosa ferramenta para um tratamento mais adequado dessa doença, já que através do desenvolvimento de apenas um comprimido contendo DEC e IVC é possível melhorar a situação da população acometida por essa doença, facilitando a administração da medicação e tornando mais eficaz o tratamento.

OBJETIVOS

Realizar o estudo de compatibilidade físico-químico da DEC e IVC, visando o desenvolvimento de forma farmacêutica de associação em dose fixa desses fármacos para ampliar o efeito microfilaricida da administração em massa da DEC, contribuindo para a erradicação da filariose linfática.

MATERIAIS E MÉTODOS

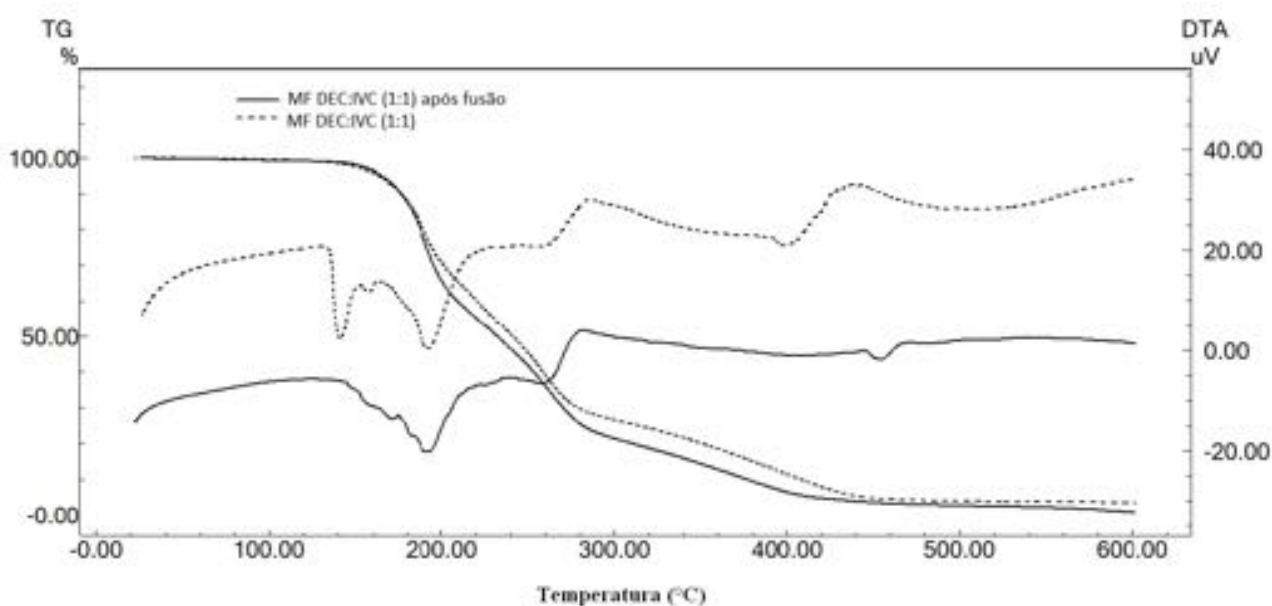
O citrato de DEC foi sintetizado e doado pela Nortec Química[®], lote 010276. As substâncias relacionadas da DEC: N-metilpiperazina e N,N-dimetilpiperazina, descritas em compêndios oficiais (Farmacopéia Britânica, 2009), foram adquiridas da Sigma-Aldrich[®], grau reagente. Foram utilizados dois lotes de ivermectina, um lote de matéria prima cedido pelo Laboratório Veterinário Vallée[®] (Lote: 07016/2010, fabricado na China), e o padrão de ivermectina adquirido a Sigma Aldrich[®], lote: 70288-86-7 (pureza: 95% H₁B_{1a} + 2% de H₁B_{1b}). As misturas binárias (MB) 1:1 e 50:6 (p/p) do citrato de DEC a IVC foram preparadas utilizando almofariz e pistilo, triturando a mistura durante 3 minutos cada. Os métodos utilizados foram: Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC); Termogravimetria (TG); Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-FT); Estudos de Estabilidade por 3 meses (40°C ± 2°C e 75%UR ± 5%) com quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência CLAE-DAD das amostras isoladas, MB e MB submetida a aquecimento a 140°C para fusão do citrato de DEC, sendo posteriormente resfriada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Calorimetria Exploratória Diferencial: A análise de DSC da DEC e IVC evidenciou 2 processos endotérmicos, sendo em ambos primeiro referente à fusão e o segundo a degradação. Na análise de DSC da MB 1:1 observou-se a fusão da DEC e a sobreposição dos eventos de fusão da IVC com a etapa inicial de degradação da DEC. Na MB DEC:IVC 50:6 não foi possível visualizar o sinal endotérmico de fusão da IVC devido a maior proporção de citrato de DEC.

Termogravimetria: Para a DEC e a IVC na proporção de 1:1 a análise não permitiu a detecção de possíveis interações, porém nessa mesma MB DEC:IVC 1:1 submetida ao aquecimento, o fornecimento de energia evidencia uma antecipação da temperatura inicial de degradação da IVC, assim os resultados obtidos nas análises da MB na proporção 1:1 após fusão da DEC há um indício de interação físico-química (figura 1). A MB na proporção 50:6 não demonstra sinais de interação.

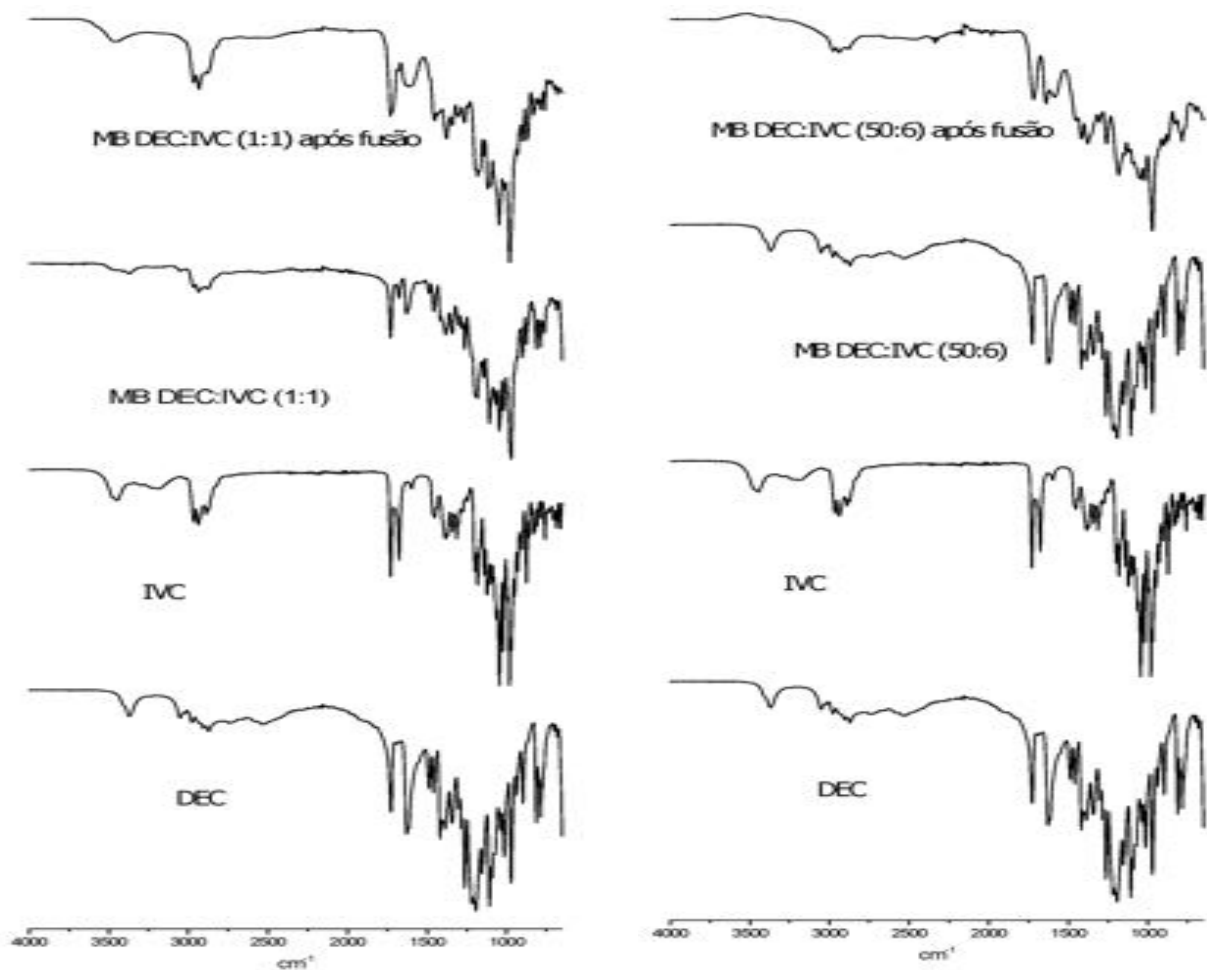
Figura 1 - Curvas de TG e DTA da MB DEC+IVC (1:1) e MB após fusão do citrato de DEC.



Infravermelho: As bandas constatadas na DEC:IVC 1:1 e da DEC:IVC 1:1 após fusão, indicam a ausência de alterações significativas, quando comparadas às bandas dos fármacos isolados. Assim como os valores da DEC:IVC 50:6 e da DEC:IVC 50:6 após fusão se encontram dentro da mesma faixa de bandas, não evidenciando mudanças expressivas (figura 2).

Estudo de Estabilidade: Após realização do estudo os cromatogramas da DEC apresentaram 5 produtos de degradação; enquanto que o da IVC exibiu os isômeros H₂B_{1a} e o H₂B_{1b}, bem como algumas impurezas. Nas análises realizadas com as MBs foram constatados inúmeros outros produtos de degradações, dessa forma, evidenciou-se que as MBs não apresentam estabilidade assegurada pela presença destes PDs, originados possivelmente pela interação da DEC e IVC, ou por inadequação da embalagem primária associada às condições de armazenamento do estudo.

Figura 2 - Espectros de IV-TF do citrato de DEC, IVC e das MB's DEC+IVC (1:1) e MB após fusão do citrato de DEC, MB DEC+IVC (6:1) e MB após fusão do citrato de DEC.



CONCLUSÕES

As técnicas utilizadas para caracterização físico-química da IVC e DEC permitiram conhecer a natureza físico-química dos antiparasitários fornecendo subsídios para o estabelecimento de um perfil de qualidade, bem como condições de estabilidade a ser adotada no controle de qualidade e nas possíveis formulações. Evidenciaram-se possíveis interações entre os fármacos, principalmente, no estudo de estabilidade, porém os demais resultados viabilizam a associação em dose fixa para preencher uma lacuna do tratamento da filariose linfática aumentando à adesão assegurando sua eficácia e segurança.

AGRADECIMENTOS

Aos órgãos de fomento Capes, Cnpq, ao Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, pela realização do projeto, e à Universidade Federal de Pernambuco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALSANTE, K. M.; MARTIN, L. & BAERTSCHI, S. W. A Stress Testing Benchmarking Study. **Pharmaceut. Technol.**, v. 27, n. 2, p. 60–72, 2003.

ALVES, G. M. C.; ROLIM, L. A.; ROLIM NETO, P. J.; LEITE, A. C.; BRONDANI, D. J.; MEDEIROS, F. P. M.; BIEBER, L. W.; MENDONÇA JÚNIOR, F. J. B. Purificação e caracterização da β -Lapachona e estudo de estabilidade dos cristais em diferentes condições de armazenamento. **Química Nova**. v. 31, n. 2, p. 413-416, 2008.

ANVISA. Resolução nº 01, de 29 de julho de 2005 - Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. Informe Técnico nº 01, de 15 de julho de 2008. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Brasília, DF.

BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of Validated Stability-Indicating Assay Methods: Critical Review. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 28, p. 1011–1040, 2002.

CAMPBELL, W. C.; FISHER, M. H.; STAPLEY, E. O.; ALBERS-SCHONBERG, G.; JACOB, T. A. Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. **Science**, v. 221, n. 4613, p. 823-828, 1983. [DOI:10.1126/science.6308762].

COUTINHO, A. D.; DREYER, G.; MEDEIROS, Z.; LOPES, E.; MACHADO, G. ; GALDINO, E.; RIZZO, J. A.; ANDRADE, L. D.; ROCHA, A.; MOURA, I.; GODOY, J.; OTTESEN, E. A. Ivermectin Treatment Of Bancroftian Filariasis In Recife, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, n. 3, p. 339-348, 1994.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. Guidance for Industry Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products. nov, 2003 / Guideline Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and products. nov. 1996

PROGRAMA MECTIZAN, “Uma história de sucesso no combate à cegueira dos rios”, Jornal Nacional Diário, seção Nacional, Diário de notícias, suplemento especial, tireagem: 54.326, (3840792), Faxinforme, pág: 12,13,14, 13/10/2011.

SINGH, S.; BAKSHI, M. Guidance on Conduct of Stress Tests to Determine Inherent Stability of Drugs. **Pharmaceut. Technol.**, v. 24, p. 1-14. 2000.

TRACY, J. W.; WEBSTER, L. T. **Fármacos usados na quimioterapia das helmintíases**. 15. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2002.



ESTUDO DO EFEITO DA HEPARINA NA ESTABILIDADE DE LIPOPLEXOS DNA-ESTERILAMINA: CAPACIDADE DE DISSOCIAÇÃO DO DNA E CARACTERÍSTICAS FÍSICAS QUÍMICAS

1A.M. ROSA, 2 P.R. DE PAULA, 2A.L. SILVA, 2 L.M. VERISSIMO, 2 E.S. EGITO

¹Laboratório de Sistemas Dispersos, Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

²Laboratório de Sistemas Dispersos, Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

RESUMO

Nanoemulsões são sistemas heterogêneos, termodinamicamente instáveis que se apresentam como potenciais carreadores lipídicos para terapia gênica quando associadas a lipídeos catiônicos como, por exemplo, Estearilamina (SA). A complexação do sistema nanoemulsionado com o DNA, ocorre devido a interações eletrostáticas que resultam numa compactação do material genético e na formação de um lipoplexo, nanoemulsão/DNA. A fim de verificar se houve uma dissociação do material genético e analisar o comportamento físico-químico do sistema foram realizados ensaios de estabilidade do lipoplexo pela adição de heparina, em diferentes concentrações. A dissociação do DNA do complexo foi observada assim como o desempenho da formulação frente ao polissacarídeo com grupos carregados negativamente.

INTRODUÇÃO

A terapia gênica constitui-se na transferência de material genético para dentro das células de um indivíduo com o objetivo de conferir um benefício terapêutico ao corrigir uma anormalidade existente ou proporcionar às células uma nova função (Lemoine, 1999). Tal processo se faz através de vetores especialmente desenvolvidos (Veríssimo et al, 2010). Uma estratégia alternativa para vetores virais, que embora ofereçam uma maior eficiência de transfecção, podem desencadear fortes respostas imunológicas ([Gajbhiye](#) e Gong, 2013), é a utilização de veículos não virais que constituem-se de carreadores sintéticos atraentes para a indústria farmacêutica graças a sua estabilidade e versatilidade (Schmidt-Wolf, 2003). Como exemplo podemos citar as nanoemulsões, sistemas cineticamente estáveis, compostos por duas fases distintas, uma oleosa e outra aquosa, estabilizadas por um conjunto de tensoativos. Entre eles, um lipídeo carregado positivamente permite a formação de um lipoplexo, através da complexação do DNA, e consequente diminuição do volume aparente da molécula pela interação eletrostática da carga positiva do lipídeo catiônico com os grupamentos

fosfato do material genético. Sob estas circunstâncias, a endocitose pode ser desencadeada por uma interação eletrostática não específica entre os complexos carregados positivamente e os proteoglicanos carregados negativamente, na superfície celular, seguido por um processo de internalização denominado pinocitose (Hess, Humphries *et al.*, 2007). Para que tal internalização seja bem sucedida é crucial que o sistema não desestabilize e libere precocemente o DNA em presença de grupamentos carregados negativamente. Assim é fundamental o desenvolvimento de ensaios de estabilidade frente a moléculas negativamente carregada presentes nos fluidos biológicos, para a avaliação do comportamento do sistema nanoemulsionado especialmente desenvolvido como um potente veículo para terapia gênica.

OBJETIVO

- ✓ Verificar a capacidade da heparina em dissociar o pDNA do lipoplexo e se em sua presença o sistema nanoemulsionado pode ser desestabilizado.

MATERIAS E MÉTODOS

1. PREPARAÇÃO DO PLASMÍDEO

O vetor plasmidal (5,3 Kb) consiste de um promotor p-IRES2, associado ao gene repórter EGFP (cedido pelo prof. Dr. Calos Meck – USP). A multiplicação do material genético foi feita por transformação em bactérias *E. coli* competentes (DH5 α), pelo método do choque térmico. A extração do pDNA foi feita pelo protocolo de lise alcalina com SDS (Midiprep) (Sambrook e Russell, 2001). O extrato foi diluído em água ultrapura autoclavada. A quantificação do material genético foi realizado em aparelho específico (Nanovue – GE) e a densidade óptica (OD) calculada como a razão das leituras em 260/280 nm.

2. PREPARAÇÃO DAS NANOEMULSÕES

As nanoemulsões consistem de um sistema óleo em água (O/A), preparadas pelo método de sonicação. A formulação é composta de 5% de Captex 355[®] (triglicerídeo de cadeia média – TCM) (p/p), 0,8% de Span80[®], 1,2% de Tween80[®], 0,33% de estearilamina e água ultrapura (qsp 100%). A fase aquosa foi sonicada por 3 minutos e colocada em banho de ultrassom por 2 minutos. Em seguida adicionou-se a fase oleosa e submeteu-se à sonicação por 4 minutos, em banho de gelo.

3. PREPARAÇÃO DO LIPOPLEXO

O material genético (pIRES a 1 μ g/uL) foi colocado em contato direto com a nanoemulsão na relação de 3:1 (v/v) nanoemulsão:pDNA e incubados durante duas horas em banho de gelo.

4. AVALIAÇÃO DA COMPLEXAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO

A verificação da complexação do DNA Plasmidial/nanoemulsão catiônica (pDNA/EC) foi feita pelo ensaio de retardo em gel de agarose 0,7%.

5. TESTE DE DESLOCAMENTO DE pDNA POR HEPARINA

Nos lipoplexos anteriormente preparados, foram adicionados concentrações crescentes de heparina (0,5,1,2,4,8 μ L) e incubou-se durante 10 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram sujeitas a eletroforese em gel de agarose a 0,7% em tampão TAE a 80V durante 40 minutos.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

As nanoemulsões e os lipoplexos, inclusive os aqueles contendo heparina apresentaram tamanho de gotícula próximo a 220 nm, com baixo índice de polidispersão (IP < 0.2) (Silva, Alexandrino et al,2012). Adicionalmente, todas as formulações estudadas apresentaram potencial zeta positivo (Tabela 1), no entanto, a adição do material genético diminui a carga de superfície das gotículas devido à complexação do mesmo na superfície da gotícula.

	Tamanho (nm)	Potencial- ζ	IP (+DP)
Nanoemulsão	220,9 \pm 2,3	56,96 \pm 2,99	0,217 \pm 0,006
Lipoplexo	222,1 \pm 1,5	13,25 \pm 7,84	0,156 \pm 0,119
Lipoplexo + 0,5 μ L de Hep	194,3 \pm 1,3	-15,49 \pm 5,18	0,207 \pm 0,044
Lipoplexo + 2 μ L de Hep	222 \pm 1,2	-54,40 \pm 0,9	0,220 \pm 0,054
Lipoplexo +	197,5 \pm 0,9	-52,16 \pm 7,9	0,110 \pm 0,043

4 μ L de Hep			
------------------	--	--	--

Tabela 1: Caracterização das Formulações: Nanoemulsão, Lipoplexo e Lipoplexo e heparina em diferentes concentrações.

Apesar do tamanho de gotícula não ser alterado pela adição de heparina (Tabela 1), ocorreu uma notável alteração do potencial zeta. Este sendo mais negativo induz a liberação de cadeias de DNA (Bhattacharya e Bajaj, 2009). Na concentração de 0,5 μ L de heparina, o lipoplexo mesmo com um potencial zeta negativo (Tabela 1) é capaz de proteger o material genético evitando o seu deslocamento. Aumentando-se essas concentrações para 1, 2, 4 e 8 μ L respectivamente, observa-se que o polissacarídeo é capaz de deslocar o pDNA do sistema nanoemulsionado, desfazendo o lipoplexo, o que é comprovado pelo potencial zeta significadamente mais negativo. Logo, observa-se que a heparina foi capaz de liberar o DNA provavelmente como consequência de uma interação competitiva entre as cargas positivas da estearilamina e as cargas negativas do polissacarídeo (Moret, Esteban Peris *et al.*, 2001). Contudo, quando comparam-se as bandas do sistema com heparina e a banda do pDNA livre, nota-se que a heparina não liberou completamente o material genético do lipoplexo, já que a intensidade das bandas é visualmente menos intensa que quando se tem o pDNA nu (Figura 2).

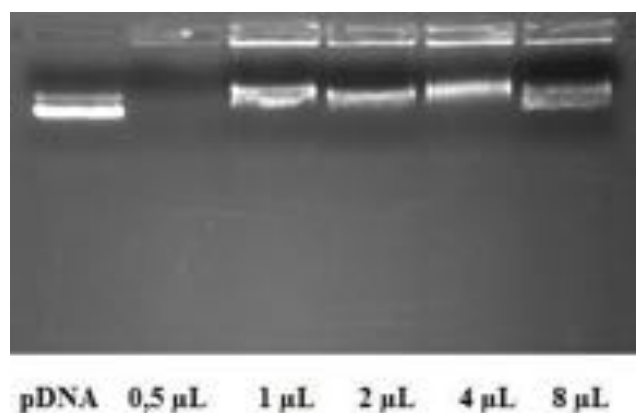


Figura 2: Perfil de comportamento do lipoplexo perante adição de diferentes concentrações de heparina.

CONCLUSÃO

O desenvolvimento de sistemas não virais para terapia gênica enfrenta um grande número de variantes que influenciam na formação dos sistemas nanotecnológicos. A heparina, polissacarídeo com cargas negativas pode ser capaz de desestabilizar o sistema, com liberação do DNA compactado. Esta, no presente estudo

não alterou as características físico-químicas da nanoemulsão catiônica, e apesar de deslocar pDNA do lipoplexo, essa dissociação ocorreu de forma incompleta. Tais resultados fortaleceram a hipótese de que nanoemulsões catiônicas constituem possíveis veículos não virais para terapia gênica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bhattacharya, S. e S. Haldar. The effects of cholesterol inclusion on the vesicular membranes of cationic lipids. Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes, v.1283, n.1, p.21-30. 1996.

Hess, G. T., W. H. Humphries Iv, *et al.* Cellular binding, motion, and internalization of synthetic gene delivery polymers. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, v.1773, n.10, p.1583-1588. 2007.

Lemoine, N. R. Gene therapy: a decade shows that smart weapons are not so smart: The Development of Human Gene Therapy, by Theodore Friedman. Trends in Genetics, v.15, n.7, p.289. 1999.

Liu, C.-H. e S.-Y. Yu. Cationic nanoemulsions as non-viral vectors for plasmid DNA delivery. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v.79, n.2, p.509-515.2010.

Moret, I. S., J. Esteban Peris, *et al.* Stability of PEI-DNA and DOTAP-DNA complexes: effect of alkaline pH, heparin and serum. Journal of Controlled Release, v.76, n.1-2, p.169-181. 2001.

Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: a laboratory manual. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor; 2001.

Silva, A. L., F. Alexandrino, *et al.* Physical Factors Affecting Plasmid DNA Compaction in Stearylamine-Containing Nanoemulsions Intended for Gene Delivery. Pharmaceuticals, v.5, n.6, p.643-654.2012.

Verissimo, L. M., L. F. A. Lima, *et al.* Pharmaceutical emulsions: a new approach for gene therapy. Journal Of Drug Targeting, v.18, n.5, p.333-342.2010.

HYDROPHILE-LIPOPHILE BALANCE DETERMINATION OF *Caryocar brasiliense* FIXED OIL FOR MICROEMULSION FORMULATION

D.R. Silva¹, G.C.L. Silva¹, M.Y.F.A. Reis¹, M.V. Silva², A.G. Silva², G. Machado³,
J.V. Melo³, K.L.A. Saraiva^{1*}

¹Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB; ²Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, Recife-PE;

³Laboratório de Microscopia e Microanálise, Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, Recife-PE

*karina.saraiva@gmail.com

ABSTRACT

Pequi (*C. brasiliense*) is a native plant of the Brazilian Savanna with some biological properties. For microemulsion formulation, the required HLB value was determined by using turbidimetric methods. A pseudoternary phase diagram was constructed to quantify the ideal surfactant blend. So, the aim of this study was to determine the HLB of the Pequi oil for microemulsion (o/w) synthesis for topical administration. Based on these methods, the HLB value of the oil was 12-13 and the best systems obtained were composed of water, propylene-glycol, Span 65 and Tween 20. In conclusion, a microemulsion with Pequi oil was formulated for future biological application as a phytopharmaceutical agent.

INTRODUCTION

The skin is the largest organ in humans, covering nearly the entire surface of the body. This organ constitutes an efficient barrier for defense and regulation, ensuring the relationship between the interior and exterior environment (LEAL et al., 2013).

Oils are typically used in emulsions and microemulsion. The last one is a thermodynamically stable dispersion, composed by an oil phase and a water phase stabilized by surfactants (FORMARIZ et al., 2005). Natural oils are characterized by low molecular weight and low viscosity, and because they are less occlusive than mineral oils, they show good cutaneous penetration, greater compatibility with the skin, and constitute a source of essential fatty acids and vitamins.

The Northeast Region of Brazil shows a great potential for the production of natural oils, which needs to be explored primarily in the semiarid region. Among the most commonly found oils, pequi (*C. brasiliense*) seed oil has attracted interest because of its vast applicability (VILELA et al., 2009).

Pequi is a fruit of native trees of the Brazilian Savanna. The oil can be extracted from the pulp or seed. This natural oil contains high levels of saturated fatty acids (oleic and palmitic acids), minerals and vitamins (BATISTA et al., 2010). The saturated fatty acids and the other compounds comprises the fixed oil, giving them an anti-inflammatory and antioxidant properties when incorporated into pharmaceutical formulations. Therefore, it is of great importance to investigate the physical and chemical properties of the pequi seeds oil in order to synthesize a new pharmaceutical form for oil delivery.

OBJECTIVE

The objectives of this study were to determine the critical HLB value of the pequi oil and to develop oil in water microemulsion for topical administration as an anti-inflammatory therapy.

MATERIAL AND METHODS

Emulsions systems were formulated with the pequi oil, using a blend of the emulsifiers Span 80 and Tween 80 2% w/v, 93% of water and 5% of the oil. A series of emulsions with HLB values ranging from 4,5 to 14,5 was prepared by heating the phases separately at $70 \pm 5^\circ\text{C}$. The aqueous phase was dispersed into the oil phase and stirred at 9,000 rpm for 5 minutes in an Ultraturrax. The pH and conductivity analyses of the samples were performed 24h after preparation and ice thaw cycle. The creaming degree was detected until 28 days after the preparation. The turbidity was analyzed with a spectrophotometer (UV-Mini, Shimadzu) to each diluted emulsion sample (0,25%) at 2,712 nm, in triplicate. The stability test was performed by samples centrifugation at 10,000 rpm for 30 minutes.

After that, a pseudoternary phase diagram was constructed using the water titration method. The systems were composed by a mixture of the surfactants Tween 20 and Span 65 (3:1) and distilled water with propylene glycol (PPG) (1:3), as the aqueous phase. The pequi oil was mixed with the surfactants at various weight ratios (1:9 to 9:1). After that, the aqueous phase was titrated under moderate agitation.

RESULTS AND DISCUSSION

The emulsions have a small degree of instability until 28 days, as demonstrated by the creaming degree of 0,1-0,6cm. This result could not be used to determine the HLB value, once the emulsions did not show a precise demarcation between the separated aqueous phase and the cream layer (ORAFIDYA & OLADIMEJI, 2002). After that time, they become unstable when treated with high temperatures and rotations. To be considered stable, an emulsion must maintain the continuous phases, without separation, even when subjected to stresses caused by variations in temperature, rotation and gravity (LEAL et al., 2013). The centrifugation test simulates an increase in gravity and induces a stress in the sample, increasing the mobility of droplets and possibly promoting instability (BRASIL, 2004).

The turbidimetric assay associates the smallest droplet sizes of the emulsions with the highest measurement rates, indicating the stability of the system. The lowest mean droplets diameters for *C.brasiliense* emulsions were obtained at HLB of 12-13 (FIGURE 1). In addition, the pH of the emulsions ranged from 6,24 to 8,62 and the conductivity ranged from $11,63\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ to $81,72\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$. After the ice thaw cycle, these values slightly decrease. This variation could be associated with the loss of water.

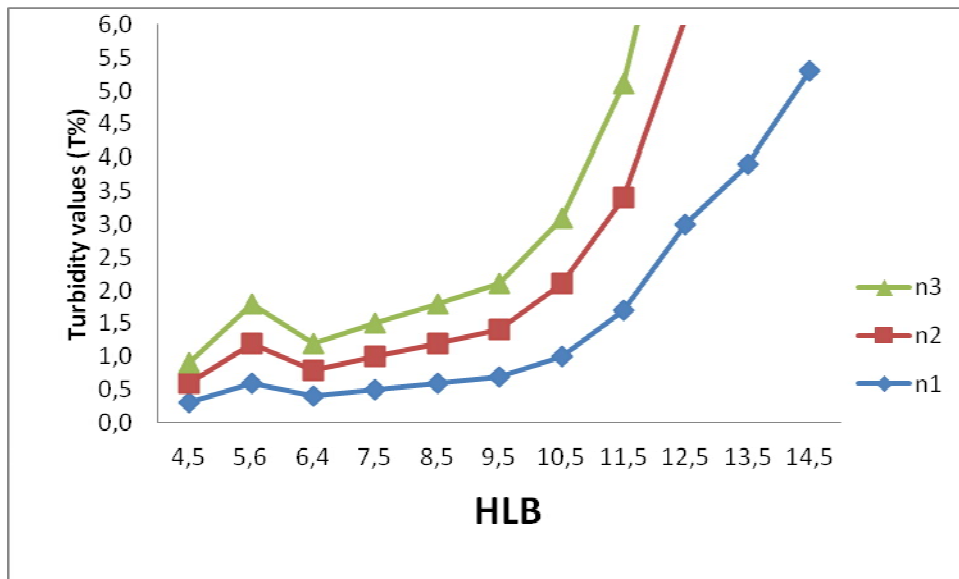


FIGURE 1: Turbidity values of pequi seed oil emulsion versus HLB. Observe that the highest measurements were obtained at HLB 12-13, indicating the smallest droplet sizes.

With the HLB value, the pseudo-ternary diagram was constructed and a microemulsion region was obtained as demonstrated in the figure 2. The formulations were made by mixing and heating the following components: Tween 20, Span 65, propyleneglycol, water and pequi oil, with the proportions cited above.

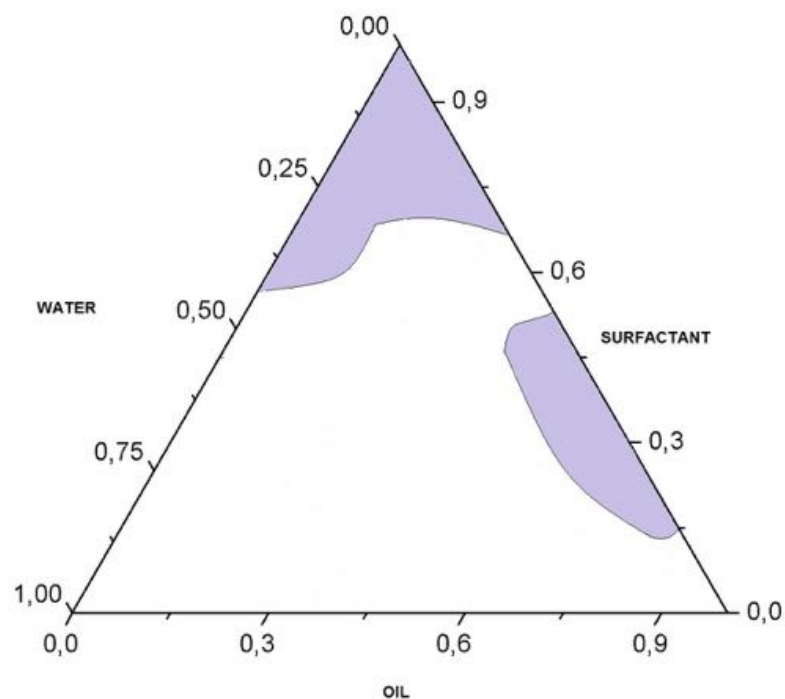


FIGURE 2: Pseudo-ternary phase diagram highlighting the microemulsion area.

CONCLUSION

This study formulated a new phytopharmaceutical form with the pequi oil. The methods used here were essential for the determination of the required HLB values of the natural oil. With this result, a microemulsion system could be done by mixing the surfactants, Pequi oil and aqueous phase, as described above. Usually, the choice of the surfactants is based on the HLB value of the oil, hence the importance of this study. Now, this new drug delivery system could be tested by its anti-inflammatory activity.

ACKNOWLEDGEMENTS

Acknowledgements to Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), CETENE, UEPB and UFPE.

REFERENCES

- BATISTA, J.S. et al. Avaliação da atividade cicatrizante do óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm) em feridas cutâneas produzidas experimentalmente em ratos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.3, p.441-447, 2010.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. 1.ed. Brasília: Anvisa, 2004. 34-35p.
- FORMARIZ, T.P et al. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 41, n.3,p.301-313, 2005.
- LEAL,L.B. et al. Determination of the critical hydrophile-lipophile balance of licuri oil from *Syagrus coronata*: application for topical emulsions and evaluation of its hydrating function. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 1, 2013.
- ORAFIDIYA,L.O; OLADIMEJI,F.A. Determination of the required HLB values of some essential oil. **International Journal of Pharmaceutics**.v.237,p.241-249,2002.
- SANZ,J.E. F.; LAHITTE,J.F. REMIGY,J.C. Membrane synthesis by microemulsion polymerization stabilised by commercial non-ionic surfactants. **Desalination**,v.199,p. 127–129,2006.
- SCHIMIDTS,T.; DOBLER,D., GULDAN,A.C.; PAULUS,N. RUNKEL,F. Multiple W/O/W emulsions—Using the required HLB for emulsifier evaluation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 372,p. 48–54,2010.

VERDINELLI,V.; MESSINA,P.V.; SCHULZ,P.C.; VUANO,B. Hydrophile–lipophile balance (HLB) of *n*-alkane phosphonic acids and theirs salts. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineer Aspects**, v. 316,p.131–135,2008.

VILELA,A.L.; PEREIRA,L.C.S.; GONÇALVES,C.A.; GRISOLIA,C.K. Pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp oil reduces exercise-induced inflammatory markers and blood pressure of male and female runners. **Nutricion Research**, v.29,p.850-858,2009.



INFLUENCE OF CRYOPROTECTANTS ON THE SURFACE TENSION OF MICROEMULSIONS

¹MORAIS A.R.V.; ²XAVIER-JÚNIOR F.H., ²ALENCAR E.N., ²DANTAS T.R.F.,
²OLIVEIRA C.M., ²NASCIMENTO A.E.G., ²RUTCKEVISKI R. ²DANTAS-SANTOS N., ²EGITO E.S.T.^{1,2}

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Programa de Pós-graduação em Nanotecnologia Farmacêutica, Laboratório de Sistemas Dispersos (LASID).
andrezarochelle@hotmail.com

² UFRN, Departamento de Farmácia, LASID, Natal –RN, Brazil.

Introduction: The use of sugars as cryoprotectants (CPs) in lipid system formulations during the freeze-drying (FD) process has been improving the stability of these pharmaceutical products. The aim of this work was to analyze the influence of Maltose (MT), Mannitol (MN), Sorbitol (SB), Glucose (GC) and Lactose (LT) as CPs on the surface tension (ST) of microemulsion systems (MEs). **Materials and Methods:** The MEs were composed by Miglyol 812[®], phosphate buffer pH 7.4, Lipoid S100[®] and Tween 80[®]. Each CP was added at the concentrations of 5, 10, 15 and 20 %. The ST was evaluated by the pendant drop method. **Results and Discussions:** The addition of CPs caused significant changes in the ST of MEs containing MT 5 % (38.97 dyn/cm ± 0.45), MN 5 % (39.98 dyn/cm ± 0.59) and SB 5 % (39.41 dyn/cm ± 0.22), when compared to the ST of the ME without CPs (36.68 dyn/cm ± 1.02). These CPs may interfered on the surfactant layer conformation leading to the ST increase. The samples containing higher concentrations of sugar as MT 20 % (35.12 dyn/cm ± 1.12) and SB 15 % (35.04 dyn/cm ± 0.39) obtained the lowest values of ST, probably due to their action in the system interface as co-surfactants. **Conclusion:** The results here presented suggest the formation of hydrogen bonds between the polar head of surfactants and the CPs, and by consequence, interference on the ST of MEs. Furthermore, the CPs addition might modify the droplet size of these systems. Therefore, a suitable study of type and concentration of CPs are required before the FD process of ME systems.

Acknowledgments: CNPq and CAPES

Keywords: Drug delivery systems, Cryoprotection, Surface tension.



INFLUÊNCIA DO SEXO NA FARMACOCINÉTICA DA LAMIVUDINA

¹D.E.D. SILVA, T.S. FIGUEIREDO, J.H.S. FILHO, D.P. SANTANA

¹ Centro de Biodisponibilidade e Bioequivalência, Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosméticos, Universidade Federal de Pernambuco. contato@nudfac.com.br

Introdução: A diferença fisiológica entre os gêneros é um dos fatores que influenciam na farmacocinética dos medicamentos. Essa diferença está normalmente relacionada aos hormônios, a motilidade gastrointestinal e a função hepática. Neste trabalho foi avaliada a influência do gênero no perfil farmacocinético do comprimido revestido de Lamivudina.

Métodos: Tratou-se de um estudo de bioequivalência aberto, aleatório, cruzado 2x2, dose única, administração do medicamento em jejum em 26 voluntários saudáveis, adultos com idade de 18 a 45 anos, sendo 13 do sexo masculino e 13 do sexo feminino.

Resultados e Discussão: Verificou-se que as mulheres apresentaram os valores de C_{máx} semelhantes aos dos homens. Já valores de ASC, T_{máx} e CV% foram estatisticamente diferentes, sendo maiores nas mulheres. Como isso podemos observar que as mulheres apresentam uma variação maior nos parâmetros farmacocinéticos quando comparadas aos homens. As alterações devem-se provavelmente as características intrínsecas das mulheres, como sua menor motilidade gastrointestinal, metabolismo e características hormonais.

Conclusão: Com os dados obtidos podemos concluir que existem alterações nos parâmetros farmacocinéticos da lamivudina de acordo com o gênero do voluntário. Devendo ser avaliadas para condução de um estudo de bioequivalência seguro e utilizando uma menor quantidade possível de voluntários. Já na clínica médica devem ser observados para ajustar a dose do medicamento de acordo com o gênero do paciente.

Palavras-chave: farmacocinética, lamivudina, gênero.



INTRAMYOCARDIAL DELIVERY OF VEGF FROM POLYMERIC MICROPARTICLES INDUCES TISSUE REVASCULARIZATION IN A MYOCARDIAL INFARCTION RAT MODEL

F. R. FORMIGA^{1,2}; B. PELACHO³; J.J. GAVIRA³, G. ABIZANDA³, F. PRÓSPER³,
M.J. BLANCO-PRIETO¹

¹ University of Navarra - Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, Pamplona, Spain.

² Universidade de Pernambuco (UPE), Campus Garanhuns - Laboratório de Biotecnologia e Inovação Terapêutica, Garanhuns-PE, Brazil.

³ University of Navarra - Hematology, Cardiology and Cell Therapy, Clínica Universidad de Navarra and Foundation for Applied Medical Research, Pamplona, Spain.

ABSTRACT

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) has been identified as factor involved in cardiac repair after myocardial infarction (MI). However, its therapeutic value has important limitations *in vivo*, related to its short-lived effect and high instability after systemic delivery. We have developed Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microparticles (MP) loaded with VEGF, which released the bioactive factor in a sustained manner for up to 28 days *in vitro*. In a rat model of MI, an increase in vascularization and positive remodeling of the heart was observed in animals treated with VEGF-MP, but not in the control groups. In summary, PLGA-MP is a feasible and promising cytokine delivery system for treatment of MI.

INTRODUCTION

Myocardial infarction (MI) is a great threat to life in the developed countries, and therefore, research efforts are focused on development of new therapies. Therapeutic angiogenesis induced by exogenous administration of growth factors is a promising treatment for MI. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) has been identified as factor involved in cardiac repair after myocardial infarction (MI). However, its therapeutic value has important limitations *in vivo*, related to its short-lived effect and high instability after systemic delivery [1]. To circumvent these limitations, we hypothesized that Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microparticles (MP) would be a useful platform for controlled delivery of VEGF.

OBJECTIVES

We hypothesized that Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microparticles (MP) would be a useful platform for controlled delivery of VEGF. Next, we evaluated the therapeutic potential of VEGF encapsulated into PLGA-MP to repair the myocardium after a MI.

MATERIALS AND METHODS

PLGA-MP were prepared by Total Recirculation One-Machine System (TROMS) [2]. MP were characterized in terms of VEGF loading and *in vitro* release of VEGF by ELISA and Western blot assays. Also, the bioactivity of the VEGF released from the MP was evaluated by determining the proliferative capacity of an endothelial cell line (HIAEC). Next, we compared the effect of delivery of VEGF-MP with free VEGF or control non-loaded microparticles (NL-MP) in a rat model of ischemia-reperfusion. Particle biodegradation over time and myocardial tissue response upon MP administration were also studied by routine staining and confocal microscopy.

RESULTS AND DISCUSSION

MP with a diameter of 5 μm were found to be compatible for intramyocardial administration in terms of injectability through a 29-gauge needle and tissue response. Particles were present in the heart tissue for up to 3 months post-implantation. Importantly, no particle migration toward other solid organs was observed, demonstrating remarkable myocardial retention. CD68 immunolabeling revealed 31%, 47%, and below 4% microparticle uptake by macrophages 1 week, 1 month, and 3 months after cardiac injection, respectively ($P < 0.001$). PLGA-MP released bioactive VEGF in a sustained manner for up to 28 days *in vitro*. An increase in vascularization was observed in animals treated with VEGF-MP, but not in the NL-MP or free-VEGF groups at 30 days follow-up (NL-MP: 579.5 ± 33.8 ; VEGF-MP: 704.9 ± 31.7 , $P < 0.05$; Free-VEGF: 571.6 ± 37.3 , $P = \text{NS}$, capillaries/ mm^2). Also, a positive remodeling of the heart was detected in the VEGF-MP group with a significantly greater left ventricle wall thickness (NL-MP: 1.07 ± 0.02 mm; VEGF-MP: 1.30 ± 0.05 mm, $P < 0.01$; Free-VEGF: 1.07 ± 0.10 mm, $P = \text{NS}$). Importantly, no hemangioma formation or leaking vessels were detected in the VEGF-MP group in the analysis of hematoxylin-eosin stained sections and confocal 3D analysis of caveolin-1⁺ stained vessels.

CONCLUSIONS

Taken together, these findings support the feasibility of PLGA-MP as VEGF delivery platform in the infarcted myocardium.

ACKNOWLEDGEMENTS

European Union Framework Project VII (INELPY), Ministerio de Ciencia e Innovación de España, Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID), Instituto de Salud Carlos III, Comunidad de Trabajo de los Pirineos (CTP). All animal procedures were approved by the University of Navarra Institutional Committee on Care and Use of Laboratory Animals as well as the European Community Council Directive Ref. 86/609/EEC.

REFERENCES

- [1] F.R. Formiga et al. Heart Fail Rev, 17 (3):449-473 (2012)
- [2] F.R. Formiga et al. Eur J Pharm Biopharm, in press (2013)



MICROEMULSÃO O/A CONTENDO UM NOVO ANTIFÚNGICO

^{1,3}Y.B.G PATRIOTA, ^{1,3}N.E.S SILVA, ^{1,3}G.P. GUIMARÃES, ²F.J.B. MENDONÇA-JR, ^{1,3}J.A. SILVA, ^{1,3*}B.P.G.L DAMASCENO

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), 58429-600, Campina Grande-PB.

²Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus V, João Pessoa/PB, Brasil

³UEPB, CCBS, Departamento de Farmácia, Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDCPF), 58429-600, Campina Grande-PB.

^{*}bolivarpd@pq.cnpq.br e yuribgp@hotmail.com

RESUMO

As microemulsões (ME) são sistemas termodinamicamente estáveis e excelentes veículos para solubilização e transporte de fármacos insolúveis em água, tornando-se uma alternativa para a melhora da sua eficácia e redução da sua toxicidade. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma ME O/A de 5CN06-LSVM e caracterizá-la físico-quimicamente. MEs-5CN06-LSVM foram desenvolvidas por três métodos e caracterizadas através das medidas do pH, condutividade e calorimetria exploratória diferencial (DSC). A análise de pH mostrou que a microestrutura das MEs não foram alteradas pelo fármaco e a condutividade sugeriu uma ME O/A confirmada pela análise de DSC. Portanto, a microestrutura das MEs foi confirmada como ME O/A, facilitando o seu uso oral ou intravenoso.

INTRODUÇÃO

A maioria dos fármacos é veiculada em formas farmacêuticas convencionais, nas quais não consegue atingir concentrações apreciáveis no tecido alvo, ocasionando baixa eficácia terapêutica e maior toxicidade (SILVA et al., 2010). Com isso, o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos, principalmente as microemulsões (MEs), vem ganhando destaque na literatura. As microemulsões (MEs) são sistemas termodinamicamente estáveis e excelentes veículos para solubilização e transporte de compostos ativos insolúveis em água e/ou em óleo (ASERIN, 2006).

Fármacos fracamente solúveis em água estão tornando-se cada vez mais prevalentes (LIPINSKI et al., 2000) e, associado com as limitadas opções disponíveis para a terapêutica e com a crescente resistência dos fungos surge a necessidade do desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos capazes de melhorar a solubilização e, consequentemente, a biodisponibilidade destes fármacos (CASTON-OSORIO, 2008).

Houve recentes avanços no desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos na terapêutica antifúngica com fármacos potentes existentes no mercado, como é o caso da anfotericina B que devido aos seus efeitos tóxicos limitava o seu uso na terapêutica (DAMASCENO et al., 2012).

OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram desenvolver uma ME óleo em água (O/A) contendo o derivado tiofênico 2-[(2,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta [B] tiofeno-3-carbonitrila (5CN06-LSVM) e caracterizá-la físico-quimicamente.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

O fármaco 2-[(2,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6-diidro-4-ciclopenta [b] tiofeno-3-carbonitrila (5CN06-LSVM) foi sintetizado no Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM) da UEPB. O miristato de isopropila (MI) utilizado como fase oleosa (FO) da ME foi adquirido da Via Farma, o Labrasol® (PEG-8 cáprico/caprílico glicerídeo) (LAS), tensoativo (T) da preparação, foi adquirido da Brasquim e a água (A) utilizada foi purificada por um sistema de osmose reversa.

Construção do diagrama de fase ternário (DFT)

O DFT foi construído para verificar a existência de áreas de MEs. Utilizou-se o T e adicionou-se a FO, nas proporções de 9:1 a 1:9. Adicionou-se A, sob agitação magnética, à temperatura ambiente.

Preparação da microemulsão incorporada com o fármaco 5CN06 (ME-5CN06-LSVM)

As MEs foram obtidas misturando a FO e o T e adicionando A sob agitação à temperatura ambiente A incorporação do 5CN06-LSVM deu-se por três métodos com concentração final na ME de $200\mu\text{g.mL}^{-1}$. No método 1, o fármaco foi incorporado diretamente na ME-B (ME sem fármaco). No método 2 e 3, o fármaco foi solubilizado na FO e, em seguida, o T e A foram adicionados e agitados em agitador magnético e sonificador, respectivamente.

Caracterização físico-química da microemulsão

Os valores de pH, condutividade foram determinados colocando diretamente o eletrodo nas amostras. Para as análises de Calorimetria Exploratória diferencial (DSC), as amostras foram resfriadas a uma taxa de $5^{\circ}\text{C.min}^{-1}$, mantidas por 3 minutos a -50°C . Em seguida, aqueceu-se até 200°C a uma taxa de $5^{\circ}\text{C.min}^{-1}$. Realizaram-se análises do fármaco, dos componentes dos sistemas, bem como a ME-B e ME-5CN06-LSVM.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O DFT está apresentado na Figura 1. As regiões de ME encontram-se identificadas, bem como a formulação (F1).

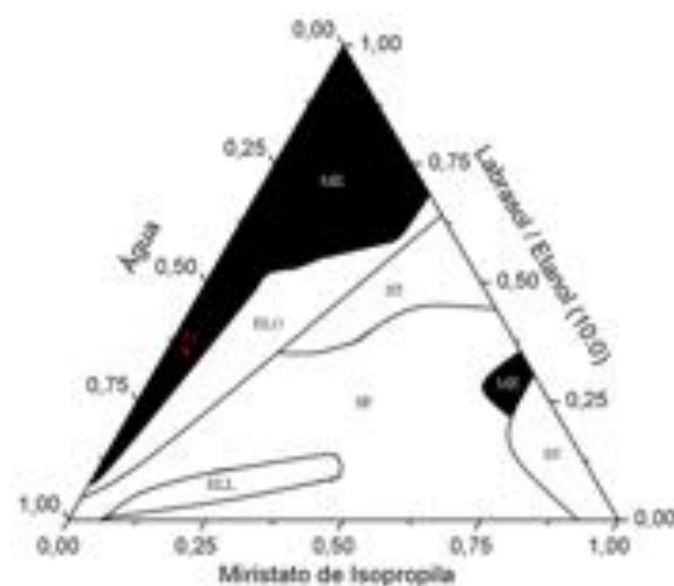


FIGURA 1: DFT com as regiões de ME em negrito e em vermelho (F1) indicando a localização do ponto escolhido.

Preparação da ME-5CN06-LSVM

A ME-B apresentou-se como um sistema límpido, translúcido e homogêneo. Pelos métodos M1 e M2 de incorporação verificou-se a precipitação do fármaco, enquanto que pelo M3 não ocorreu devido ao fenômeno de cavitação do sonicador.

Caracterização físico-química da ME

Os resultados das análises do pH e condutividade das ME-B e ME-5CN06-LSVM (M1, M2 e M3) apresentaram-se bem semelhantes, pH em torno de 3 e condutividade entre 120 e 135 $\mu\text{S}/\text{cm}$, não apresentando mudanças significativas após a incorporação do fármaco.

Os valores de condutividade foram elevados sugerindo uma microestrutura O/A, conforme determina Michniak-Kohn e Zhang (2011).

O termograma A apresenta dois picos endotérmicos (1 e 2) que representam os pontos de fusão (PF) do 5CN06-LSVM, indicando um possível polimorfo em concordância com Oliveira (2011). O termograma B apresenta um pico endotérmico (pico 3) em torno de 150°C . Nos termogramas D e E, os picos 4 e 5 representam o congelamento e o PF da água livre, respectivamente. O pico 6 é atribuído ao LAS devido suas características semelhantes nos demais termogramas. Além disso, não foi observado o pico do 5CN06-LSVM, indicando que o mesmo poderia estar incorporado na gotícula da ME.

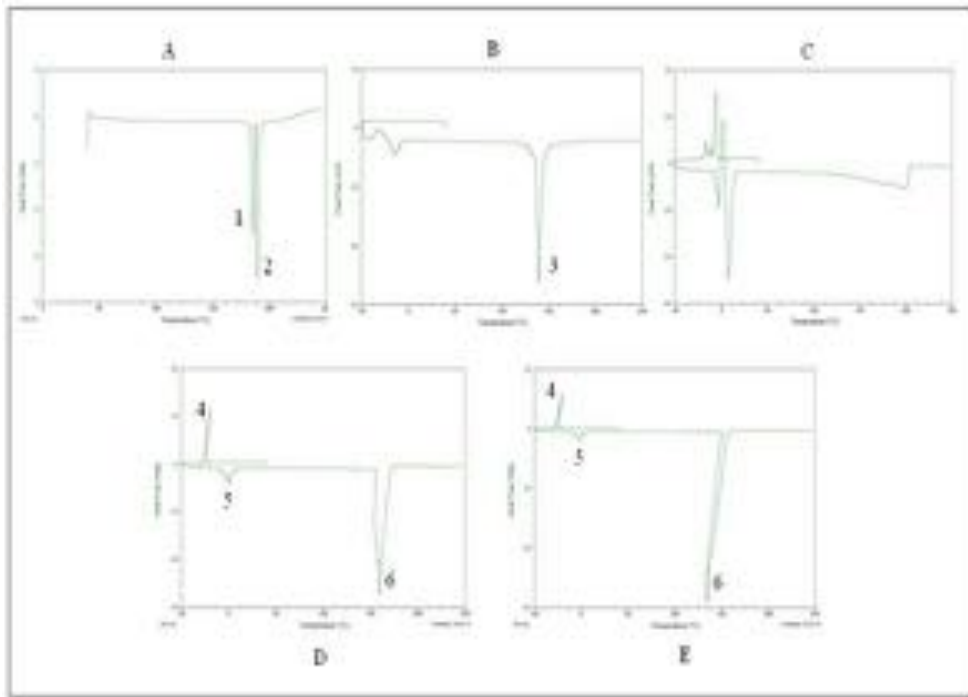


FIGURA 2: Termogramas: A.5CN06-LSVM, B. LAS; C. MI; D. ME-B e E.ME-5CN06-LSVM.

CONCLUSÕES

As MEs foram obtidas com sucesso através da metodologia do DFT. Além disso, pela análise do pH e condutividade podemos inferir que o fármaco não interferiu na microestrutura das MEs, produzindo ME O/A, o que foi confirmado pela análise de DSC, gerando um sistema que pode ter o seu uso através de diversas vias de administração, como a intravenosa e a oral.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Programa de Incentivo à Pós-Graduação e Pesquisa (PROPESQ - 2011/2012) pelo suporte financeiro prestado para o desenvolvimento da pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASERIN, A.; SPERNATH, A.. Microemulsions as carriers for drugs and nutraceuticals. **Advances in Colloid and Interface Science**. Vol.128, n.130 p. 47–64 ,2006.

CASTÓN-OSORIO, J.J.; RIVERO, A.; TORRE-CISNEROS J.. Epidemiology of invasive fungal infection. **International Journal of Antimicrobial Agents**. Córdoba, Vol. 32, n.2, 2008.

CASTRO, R.D; LIMA, E. O. Atividade antifúngica in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L. sobre *Candida* spp. **Revista de Odontologia da UNESP**, Araraquara, Vol. 39, n.3, p. 179-184, 2010.

DAMASCENO, B.P.G.L. et al.. Amphotericin B Microemulsion Reduces Toxicity and Maintains the Efficacy as an Antifungal Product. **Journal of Biomedical Nanotechnology**. V. 8, p. 290-300, 2012.

LIPINSKI, C.A. Drug -like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**. V. 44, p.235-249.

MICHNIAK-KOHN, B. ZHANG, J. Investigation of microemulsion microstructures and their relationship to transdermal permeation of model drugs: Ketoprofen, lidocaine, and caffeine. **International Journal of Pharmaceutics**, n.421, p.34– 44, 2011.

OLIVEIRA, J.G.B. **Síntese, purificação, caracterização estrutural e avaliação da citotoxicidade de novos derivados 2-amino-5,6-diidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3-carbonitrila em bioensaios de *Artemia salina***. 2011. Trabalho de Conclusão de

Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa, Paraíba.

SILVA, J. A., et al. Physicochemical characterization and development of a microemulsion system for transdermal use. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v.31, n.1, p.1-8. 2010.



**NANOENCAPSULAÇÃO DA QUERCETINA EM LIPOSSOMAS:
USO TERAPÊUTICO NO COMBATE À OBESIDADE**

**¹CALAÇA-MENEZES, T. G.; ¹PEREIRA, M. A.; ¹CORDEIRO, R. B. S.;
¹CADENA, P. G.; ¹SANTOS-MAGALHÃES, N. S.**

¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco.
E-mail: tgcalaca@gmail.com

Introdução: A obesidade está entre os principais problemas de saúde pública e é caracterizada pelo aumento do tecido adiposo, o que resulta também no aumento das células e em sua quantidade, mas pode ser regulada pela inibição da adipogênese e pela indução de apoptose. Recentemente descobriu-se que flavonoides como a quercetina (QUE) possuem esta ação em tecido adiposo, porém a QUE não pode ser aplicada diretamente *in vivo*, pois é rapidamente metabolizada sendo necessário a sua incorporação em sistemas de liberação controlada para protegê-la da destruição. Diante do exposto, o presente trabalho tem por objetivo a nanoencapsulação de quercetina em lipossomas. **Metodologia:** A interação de QUE com ciclodextrinas, quantificação em HPLC, a nanoencapsulação de QUE e de seus complexos de inclusão e caracterização das formulações foram estudados. **Resultados:** Observou-se que a melhor formulação obtida apresentou os seguintes resultados: tamanho de 149,43 nm; índice de polidispersão de 0,295, potencial zeta de -13,95 mV e EE% de 97,76%. A concentração de QUE encapsulada foi 23x maior que a concentração que possui efeito apoptótico e antiadipogênico (100 µM). O tamanho obtido é satisfatório para a injeção por via subcutânea e sua permanência no tecido alvo (>100 nm). **Conclusão:** Desta forma, podemos concluir que a quercetina foi satisfatoriamente nanoencapsulada em lipossomas obtendo altos valores de eficiência de encapsulação com características físico-químicas adequadas.

Apoio: FACEPE, CNPq.

Palavras-chave: Quercetina, Lipossomas, Ciclodextrina.



OBTENÇÃO E ANÁLISE DE TAMANHO E POTENCIAL ZETA DE NANOEMULSÕES O/A COMO POTENCIAL SISTEMA DE LIBERAÇÃO PARA FÁRMACOS COM BAIXA SOLUBILIDADE AQUOSA

^{1,2}I. DE SOUZA, ³M.M. ARAÚJO, ¹S.R.A. SANTOS, ^{1,2}L. STRECK, ^{1,2*}A. A. S. JÚNIOR

¹Laboratório de Tecnologia e Biotecnologia Farmacêutica - TecBioFar, Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Rio Grande do Norte, UFRN.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN.

³Programa de Pós-graduação em Nanotecnologia aplicada às Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, USP.

Introdução: Sistemas nanoemulsionados óleo em água (O/A) compostos por água, polissorbato 80 (Tween 80), monooleato de sorbitano (Span 80) e óleo de soja foram investigados como potencial sistema de liberação para fármacos com baixa solubilidade em água. **Métodos:** Utilizando um aparelho que promove cavitação ultrassônica, um diagrama pseudoternário, foi construído por meio de titulação e as proporções de massa óleo-tensoativos que exibem maior interação com a água foram encontrados. Foram escolhidas 9 formulações encontradas na região de sistemas líquidos translúcidos no diagrama as quais foram caracterizadas por potencial zeta (PZ) e por espalhamento de luz dinâmica (ELD). **Resultados e discussão:** Foi visto através de ELD que o tamanho das gotículas aumentava à medida que a quantidade de óleo de soja aumentava e que o tamanho de gotícula diminuía a medida que aumentava a quantidade de tensoativos. Em todos os casos o potencial zeta se manteve abaixo de $|-40 \text{ mV}|$, indicando tendência à estabilidade do sistema. **Conclusão:** Os resultados obtidos sugerem que os sistemas formados possuem uma viabilidade inicial para sistema de liberação, faltando apenas um estudo de estabilidade para certificar qual a melhor proporção de componentes. As nanoemulsões investigadas mostram-se muito interessantes como novos sistemas de liberação para fármacos de baixa solubilidade aquosa.

Apoio: CNPq, CAPES, PPgCF, UFRN.

Palavras-chave: nanoemulsão, óleo de soja, sistema de liberação.



OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CATIÔNICAS APLICADAS COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DE DOENÇAS NEGLIGENCIADAS

I.R. BARBOZA*, ¹L.B. CALAND, ¹A.L.P.F. CARONI, ¹A.A. SILVA JÚNIOR

¹Departamento de Farmácia, UFRN – RN (*iaponirabarboza@yahoo.com.br)

Introdução: Os sistemas de liberação controlada de fármacos vêm recebendo atenção especial com o desenvolvimento de estratégias para a veiculação de agentes bioativos e vacinas tais como lipossomas, nanopartículas e micropartículas. Dentre os métodos empregados para a preparação de nanopartículas poliméricas, destaca-se o método de nanoprecipitação. Neste trabalho preparou-se e caracterizou-se nanopartículas catiônicas aplicadas no tratamento de doenças negligenciadas. **Métodos:** As amostras foram preparadas adicionando a fase orgânica gota-gota na fase aquosa sob agitação magnética constante e com uma subsequente evaporação do solvente. Avaliou-se o efeito das variáveis como: concentração do PVA, do polímero e solvente orgânico (acetona: álcool etílico e álcool isopropílico) na obtenção dessas nanopartículas. **Resultados e discussão:** A influência dos constituintes da fase orgânica, bem como a influência dos constituintes da fase aquosa e solvente orgânico no processo de obtenção das nanopartículas foram avaliados quanto às características de superfície (potencial zeta) e tamanho das partículas. **Conclusão:** Os sistemas obtidos se apresentaram dentro da escala nanométrica e mostraram ser potencialmente úteis para os fins farmacêuticos pretendidos.

Apoio: CAPES, CNPq, UFRN

Palavras-chave: Nanopartículas catiônicas, biotecnologia, tamanho de partícula, potencial zeta



OPTIMIZATION OF LYOPHILIZATION PROCESS OF MICROEMULSION CONTAINING LACTOSE AND GLUCOSE BY EXPERIMENT DESIGN

¹MORAIS A.R.V., ²XAVIER-JUNIOR F.H., ²ALENCAR E.N., ²MACHADO L.A., ²OLIVEIRA C.M., ²DANTAS T.R.F., ²DANTAS-SANTOS N., ²EGITO E.S.T.

¹: Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Programa de Pós-graduação em Nanotecnologia Farmacêutica, Laboratório de Sistemas Dispersos (LASID).

andrezarochelle@hotmail.com

²: UFRN, Departamento de Farmácia, LASID, Natal –RN, Brazil.

ABSTRACT

Introduction: Microemulsions (ME) may present microbiological instability due the aqueous media. Throught the design of experiment (DOE) the optimal lyphilization (LY) conditions may be obtained. **Purpose:** To determine the LY optimal conditions for ME using DOE. **Methods:** The cryoprotectant (Lactose-LT and Glucose) concentration, freezing temperature (FT) and LY time (LYT) of the samples were chosen as independent variables. A 2³ design with 3 centre points was performed and the droplet size was the dependent variable. **Results:** Only the sample with LT produced dry powders. Furthermore, it was observed that the ME droplet size increased with increasing of LYT and LT concentration. **Conclusion:** The statistical results showed an optimal LY process with -88 °C of FT, 5% of LT and 24 h of LYT.

INTRODUCTION

Microemulsions (MEs), optically transparent systems with low viscosity, are thermodynamically stable dispersions of oil and water and have been investigated for drug delivery systems ¹. Nevertheless, in aqueous media these systems have some disadvantages such as risk of microbiological contamination and degradation by hydrolysis. As an alternative to solve such problems, the use of lyophilization as a drying method has been suggested. Various stresses are generated during this process, mainly during the freezing and drying steps. However, cryoprotectants (CP) can be used in order to protect the integrity of these systems against damages ².

The quality of the final lyophilized product might be influenced by several factors relating to the formulation, the container, the equipment and the freeze-drying process³. Statistical experimental designs (SED), such as response surface methodology, allows finding the optimal working conditions, by combining a small number of variables, resulting in fewer experiments ⁴.

OBJECTIVE

The aim of this work was to establish the optimal lyophilization conditions for MEs using SED. Important parameters such as concentration of CP, Lactose (LC) and Glucose (GC), freezing temperature and freeze-drying time, which might influence the droplet size of this system, were also evaluated.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Miglyol 810[®] was obtained from CONDEA Chemie GmbH (Hamburg, Germany). Lipoid S100[®] was purchased from LIPOID GMBH (Ludwigshafen, Germany), Tween 80[®], MN and MT were obtained from Sigma Aldrich Inc (St. Louis, USA). Na₂HPO₄ and NaHPO₄ were purchased from Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, Brazil).

Methods

ME preparation - The MEs were prepared by mixing phosphate buffer pH 7.4, Tween 80[®], Lipoid S100[®] and Mygliol 810[®] using magnetic stirring, following by three cycles of sonication process (1.5 min) and ultrasound bath (3 min). The LT and GC were added to the MEs prior lyophilization.

SED methodology - The LT and GC concentrations, freezing temperature and freeze-drying time were chosen as independent variables and the ME droplet size after freeze-drying process as the dependent output response variable. A two-level three-factor full-factorial design with three centre points leading to 11 experimental randomizations runs were performed (Table 1). The effects of the studied variables were graphically and statistically interpreted using the Statistic (Version 7.0, StatSoft Inc., USA) software. The statistical significance was evaluated using Fisher's F-test and ANOVA.

Dynamic light scattering - After the lyophilization, the MEs were reconstituted by adding the same amount of water followed by vortex and sonication stirring. Then, their droplet size distribution was measured by dynamic light scattering using a ZetaPlus (Holtsville, NY, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

All MEs remained transparent after the addition of GC. On the other hand, the LT appeared turbid over 12.5 %, showing that it does not have a good solubility in this ME system. Moreover, after lyophilization, MEs-LT produced dry powders. Disaccharides, such as LT, are more effective freeze-drying protectants than others type of CP because they form an amorphous sugar glass³.

The use of the monosaccharide GC resulted in a freeze-dried cake, which might

be occurred due to the temperature of primary drying, during the lyophilization process, to be above of the glass transition temperature of MEs-GC, causing the collapse of the product ⁵. Therefore, only ME-LT had its droplet size measured (Table 1).

Table 1: SED of ME-LT droplet size

	Freezing (°C)	% CP	Freeze-drying	Droplet size ME-LT(nm)
1	-20	5.0	24 h	23.7
2	-196	5.0	24 h	24.4
3	-20	20.0	24 h	38.1
4	-196	20.0	24 h	32.8
5	-20	5.0	48 h	24.9
6	-196	5.0	48 h	23.3
7	-20	20.0	48 h	40.9
8	-196	20.0	48 h	63.4
9	-80	12.5	36 h	32.1
10	-80	12.5	36 h	31.7
11	-80	12.5	36 h	29.0

Based on probability values less than 0.05, statistical significance was indicated for quadratic term of freezing. Furthermore, the treatment combinations are highly significant and the model was predictive. The value of the determination coefficient ($R^2 = 0.9120$) showed the significance of the model.

It was observed that the ME droplet size decreased with decreasing of freeze-drying time and CP concentration at linear form. However, when it was compared freezing time to others independent variables there were no direct linear relationship among them. Nevertheless, it was possible to identify the smaller droplet size values of MEs-LT at - 80 °C of freezing temperature (Figure 1).

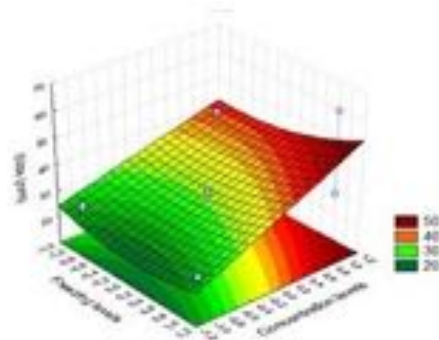


Figure 1: Response surface plot of the effect freezing and concentration on the MEs-LT size.

CONCLUSIONS

The optimal freeze-drying conditions for MEs, concerning type and concentration of CP, freezing temperature and freeze-drying time and analyzed by the evaluation of the smallest droplet size, were obtained with 5% of LT as CP, -80 °C of freezing temperature and 24 h of freeze-drying time. Therefore, MEs lyophilized at these conditions is an alternative to solve problems related to the aqueous media, improving the system stability.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by CNPq and CAPES.

REFERENCES

- ¹ DATE, A. A.; NAGARSENKER, M. S. Parenteral microemulsions: An overview. **Int J Pharm**, v. 355, n. 1–2, p. 19-30, 2008. ISSN 0378-5173. Available in: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517308000227>>.
- ² LEE, M. K. et al. Cryoprotectants for freeze drying of drug nano-suspensions: Effect of freezing rate. **J Pharma Sci**, v. 98, n. 12, p. 4808-4817, 2009. ISSN 1520-6017. Available in: <<http://dx.doi.org/10.1002/jps.21786>>.
- ³ ABDELWAHED, W. et al. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 58, n. 15, p. 1688-713, Dec 30 2006. ISSN 0169-409X (Print) 0169-409X (Linking). Available in: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17118485>>.
- ⁴ YETILMEZSOY, K.; DEMIREL, S.; VANDERBEI, R. J. Response surface modeling of Pb(II) removal from aqueous solution by Pistacia vera L.: Box-Behnken experimental design. **Jof Hazard Mater**, v. 171, n. 1-3, p. 551-562, Nov 15 2009. ISSN 0304-3894. Available in: <<Go to ISI>://000271165100071>.
- ⁵ HIRJARVI, S.; PELTONEN, L.; HIRVONEN, J. Effect of sugars, surfactant, and tangential flow filtration on the freeze-drying of poly(lactic acid) nanoparticles. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 2, p. 488-94, 2009. ISSN 1530-9932 (Electronic) 1530-9932 (Linking). Available in: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19381823>>.



POLY(ANHYDRIDE) NANOPARTICLES FOR ALLERGY IMMUNOTHERAPY

J. de S. Rebouças¹, N. S. Santos-Magalhães¹, C. Gamazo², J. M. Irache²

¹ Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami, Grupo de Sistemas de Liberação Controlada para Vacinas, UFPE, Recife, Pernambuco.

² Unidade de Adjuvantes, Universidad de Navarra, Departamento de Farmácia e Tecnologia Farmacêutica, Pamplona, Espanha.

ABSTRACT

Poly(anhydride) nanoparticles loaded with peanut proteins were prepared using the solvent displacement method. The resultant nanoparticles were dried by either freeze-drying or spray-drying, respectively. Nanoparticles were successfully developed, achieving both high encapsulation efficiency and manufacturing yield. After intradermal immunization in mice with peanut proteins incorporated into nanoparticles, a strong mixed TH1/TH2-type immune response was observed. Of note, we provide for the first time, clear evidence of the influence of formulation design on the immunostimulatory properties of nanoparticles. These findings indicate that poly(anhydride) nanoparticles are efficient stimulators of immune responses and allergen delivery systems.

INTRODUCTION

Peanut allergy is reaching epidemic proportions, with important socioeconomic consequences. Besides, peanuts are the most common cause of food related anaphylaxis and death (1). In recent years, different strategies for allergen immunotherapy have been sought. In this context, a promising strategy is the use of polymeric nanoparticles (NP) as antigen delivery systems. NP acts increasing the immunogenicity of encapsulated allergens but also may present immunomodulatory activity in order to elicit a balanced immune response (2). A wide range of methods for encapsulating antigens into NP have been described, which could affect the activation and modulation of immune system (3). In this study, we prepared poly(anhydride) nanoparticles loaded with peanut proteins (raw or roasted) by either lyophilization or spray-dried methods. The developed formulations were characterized for production yield, size, morphology, surface charge and encapsulation efficiency. Finally, an immunogenicity study was performed in C57BL/6J mice in order to determine the influence of formulation method on the elicited immune response.

MATERIALS AND METHODS

Peanut extracts

Peanut extracts were obtained from Diater Laboratories (Madrid, Spain). Shelled peanuts were roasted and processed as previously published (4).

Preparation of Nanoparticles

Poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride)] or poly(anhydride) nanoparticles were prepared by a solvent displacement method (5).

Lyophilized Nanoparticles (NP-LF)

In order to prepare NP loaded with peanut proteins, 3 mg of raw or roasted peanut extract (PE) was dispersed in 100 μ l of deionized water (pH 3.0) by ultrasonication (Microson™) and resuspended in 1 ml of acetone. Next, PE dispersion was incorporated into 4 ml of acetone containing 100 mg PVM/MA. Then, the mixture was stirred (45 min, RT) and the polymer was desolvated by the addition of 20 ml ethanol-water mixture (1:1). The organic solvents were eliminated under reduced pressure (Buchi® R-144, Switzerland). Finally, NP suspension was purified by two consecutive centrifugal filtration (3000 \times g, 20 min) and lyophilized using an aqueous solution containing sucrose (5%, p/v) as cryoprotector (Genesis 12EL, Virtis®, USA). Control lyophilized NP were prepared in the same way, in the absence of PE.

Spray-dried Nanoparticles (NP-SD)

NP-SD were prepared as NP-LF, with some modifications. After incubation with peanut proteins, polymer desolvation was performed by incorporation of a solution containing 1 g lactose in 20 ml of deionized-water. All solvents were evaporated under reduced pressure by spray drying (mini-spray dryer; Büchi, Switzerland). Controls spray-dried NP were prepared in the same way, in the absence of PE.

Characterization of Nanoparticles

Size, Zeta Potential and Surface Morphologies

The size and zeta potential of NP were determined by photon correlation spectroscopy (PCS) and electrophoretic laser Doppler anemometry, respectively, using a Zetamaster analyser system (Malvern® Instruments, UK). Morphologic characteristics of both types of NP were assessed by scanning electron microscopy (SEM).

Loading and Entrapment efficiency

For determine the amount of peanut proteins encapsulated in the NP, 10 mg of formulations were digested by incubation with NaOH 0.1 M by shaking at 37 °C for 1 h. The protein content was measured using the bicinchoninic acid method (6). Encapsulation efficiency was regarding the initial amount of PE per mg of polymer that forms NP.

Structural integrity and antigenicity of the entrapped peanut proteins

Evaluation of the effect of the manufacturing process on the structural integrity and antigenicity of peanut proteins was performed by SDS-PAGE and immunoblotting, respectively. Briefly, for antigen extraction, 10 mg of samples were resuspended in 1 ml of ultrapure water and centrifuged (28,000 \times g, 20 min, 4 °C). Then, the precipitate was dissolved in 2 ml of acetone/DMF (3:1, v/v) and kept for 1 h at -80 °C. Samples were centrifuged at 28,000 \times g for 20 min at 4 °C and the pellet was washed with 1 ml acetone and kept for 30 min at -80 °C. After centrifugation under the same conditions, pellets were resuspended in the electrophoretic sample buffer (Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.8; 10% glycerol; 2% SDS; 5% β -mercaptoethanol and 0.05% bromophenol blue). SDS-PAGE was performed using gels of 15% acrylamide. For the antigenicity studies, immunoblotting was performed using a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Trans-Blot® SD Transfer Cell, BIO-RAD, Hercules, CA, USA).

In vivo studies

Experiments were performed in compliance with the regulations of the Ethics Committee of the University of Navarra in line with the European legislation on animal experiments and the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”.

Experimental immunization

Female C57BL/6J mice (Harlan Interfauna Ibérica, Spain), 8 weeks old, were immunized with a single dose of the following raw or roasted peanut proteins by oral (1000 µg) or intradermal (200 µg) route. Thus, animals were immunised with peanut proteins incorporated in one of the following formulations: (i) lyophilized raw PE-entrapped nanoparticles (NP-RaPE-LF); (ii) lyophilized roasted PE-entrapped nanoparticles (NP-RoPE-LF); (iii) spray-dried raw PE-entrapped nanoparticles (NP-RaPE-SD); or (iv) spray-dried roasted PE-entrapped nanoparticles (NP-RoPE-SD). Non-loaded NP (NP-LF and NP-SD) and free peanut proteins (raw and roasted, Ra-PE and Ro-PE, respectively) were also administered as controls. Blood samples were obtained at weekly intervals and animals were sacrificed five weeks after initial immunization.

Quantification of specific antibodies by indirect ELISA

The presence of PE-specific antibodies was determined in sera (IgG1 and IgG2a) by indirect ELISA. Measurements were performed by triplicate and all plates included negative controls (no mouse serum sample background and no antigen coating control).

RESULTS AND DISCUSSION

The physicochemical properties of poly(anhydride) NP are presented in the Table 1.

Table 1. Physical-chemical characteristics of poly(anhydride) nanoparticles

Formulation^a	Size (nm)	Zeta Potencial (mV)	PE Loading (µg/mg NP)	Encapsulation Efficiency (%)	Yield (%)
NP-LF	196 ± 1	- 54 ± 3	-	-	79
NP-SD	165 ± 1	- 41 ± 4	-	-	65
NP-RaPE-LF	140 ± 3	- 49 ± 2	38 ± 3	76 ± 7	70
NP- RaPE-SD	156 ± 2	- 46 ± 1	36 ± 5	47 ± 5	59
NP- RoPE-LF	144 ± 2	- 54 ± 4	29 ± 2	71 ± 1	74
NP- RoPE-SD	158 ± 3	- 50 ± 1	32 ± 4	43 ± 4	54

Data express the mean ± S.D, *n*=3.

^a*Formulations:* NP-LF: Non-loaded lyophilized nanoparticles; NP-SD: Non-loaded spray-dried nanoparticles; NP-RaPE-LF: Lyophilized nanoparticles loaded with raw peanut proteins; NP-RoPE-LF: Lyophilized nanoparticles loaded with roasted peanut proteins; NP-RaPE-SD: Spray-dried nanoparticles loaded with raw peanut proteins; NP-RoPE-SD: Spray-dried nanoparticles loaded with roasted peanut proteins.

The mean diameter of NP obtained was below 200 nm, displaying homogeneous volume mean diameter with polydispersity index under 0.2 (data not shown). Concerning zeta potential, all NP were negatively charged. The PE loading in the NP ranged from 30 to 40 µg/mg NP. Size and morphology of the vaccine formulations were confirmed by comparing SEM analysis (Figure 1). All systems were found to be homogeneous and spherically shaped.

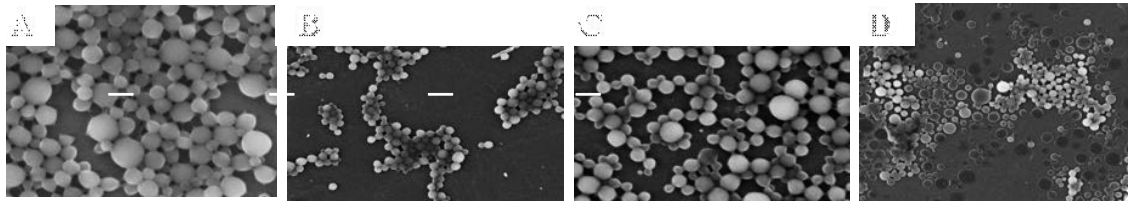


Figure 1. Surface morphologies of non-loaded lyophilized nanoparticles (A), lyophilized nanoparticles loaded with roasted peanut proteins (B), non-loaded spray-dried nanoparticles (C) and spray-dried nanoparticles loaded with roasted peanut proteins (D). Scale bars: 200 nm (A, C) and 1 μ m (B, D).

Evaluation of structural integrity and antigenicity after manufacturing process was analyzed by SDS-PAGE and Western Blot, respectively. A similar protein profile and antigenicity was observed in peanut proteins after encapsulation (data not shown).

After intradermal immunization, all NP formulations induced higher levels of both IgG1 and IgG2a (Th2 and Th1 markers, respectively) than the controls (free PEs and non-loaded NP). However, only spray-dried roasted PE-entrapped nanoparticles (NP-RoPE-SD) were able to induce IgG1 levels after oral immunization.

CONCLUSIONS

This study confirmed the effect of formulation method in the antibody immune response induced by poly(anhydride) nanoparticles, depending of route of immunization. Our findings suggest poly(anhydride) nanoparticles loaded with roasted peanut proteins and prepared by spray-drying, as a promising delivery system for peanut allergen immunotherapy.

REFERENCES

1. Sicherer and Sampson. *J Allergy Clin. Immunol.* 125:116, 2010.
2. Camacho AI, et al. *Vaccine.* [In press], 2011.
3. Schöll I, et al. *J. Control. Release.* 104:1, 2005.
4. Schmitt DA, et al. *J. Agric. Food Chem.* 58:1138, 2010.
5. Arbós P, et al. *J. Control. Release.* 83: 321, 2002.
6. Smith PK, et al. *Anal. Biochem.* 150:76, 1985.

SÍNTESE DE MICROEMULSÕES COM ÓLEO DE BABAÇU (*Orbignya phalerata*) PARA USO TÓPICO

¹D.R. SILVA, ¹G.C.DE L. SILVA, ¹M.Y.F.A. REIS, ¹M.A.A DANTAS, ²M.V. SILVA, ²A.G DA SILVA, ³G. MACHADO, ³J.V. MELO, ^{1*}K.L.A. SARAIVA

¹Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB; ²Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, Recife-PE; ³Laboratório de Microscopia e Microanálise, Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, Recife-PE

*karina.saraiva@gmail.com

RESUMO

O babaçu é uma palmeira de grande porte, encontrada em diferentes regiões do Brasil. Desta planta, se extrai um óleo com propriedades terapêuticas bastante variadas, tais como antifúngica, bactericida e antiviral. Com isso, propõe-se a incorporação desse óleo em sistemas nanoestruturados para liberação controlada na pele e posterior investigação de uma possível atividade anti-inflamatória e/ou antioxidante. Para tal, a determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) do óleo é essencial para seleção dos componentes do sistema microemulsionado. Foram analisados o tamanho de gotículas e a turbidez para identificação do EHL crítico. Com esse resultado, as microemulsões foram formuladas usando os surfactantes Cremophor EL e Span 80, e como fase aquosa, o propilenoglicol e a água.

INTRODUÇÃO

A pele constitui um limite anatômico e uma barreira de proteção contra agentes físicos, químicos e biológicos, sendo imprescindível à existência de vida (ANTONIO, 2007). O estrato córneo, localizado acima da epiderme, é considerado o maior responsável pela promoção da “barreira cutânea” às substâncias ativas. Assim, a maioria dos fármacos utilizados em tratamentos de pele não atinge sua região mais profunda, como por exemplo a derme, onde são encontradas muitas células inflamatórias (MARTINS e VEIGA, 2013).

As microemulsões (ME) são dispersões isotrópicas, transparentes, termodinamicamente estáveis, usualmente formadas pela mistura de água, óleo, tensoativo e co-tensoativo (SILVA et al., 2009). Elas interagem com o estrato córneo desestruturando a bicamada lipídica e aumentando a permeabilidade dos fármacos incorporados. Isto é explicado pela presença de surfactantes anfipáticos em sua formulação (DAMASCENO et al., 2010).

O babaçu é uma palmeira brasileira de grande porte encontrada em nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do país. A partir do fruto desta planta se extrai um óleo rico em ácido láurico, responsável pelas propriedades farmacológicas (GUMIERO,

2011). Diante disso, o presente trabalho destinou-se ao desenvolvimento de uma nova forma farmacêutica contendo o óleo de babaçu para futuras aplicações dérmicas como um anti-inflamatório.

OBJETIVO

Determinar o EHL do óleo de babaçu para o desenvolvimento de microemulsões.

MATERIAIS E MÉTODOS

A partir da mistura dos tensoativos Span 80 e Tween 80 (2%), água destilada (93%) e óleo (5%) foi desenvolvida uma série de emulsões pelo método de inversão de fases (PIT). A água e o óleo foram aquecidos separadamente em banho-maria à 75°C e posteriormente misturados sob agitação em homogeneizador Ultra-Turrax (9000 rpm/5 minutos) à temperatura ambiente. Em seguida, as emulsões foram deixadas em repouso por 24h para posterior avaliação da estabilidade, pH e condutividade. O fenômeno de cremagem foi analisado durante 28 dias. O tamanho de gotículas foi avaliado pela medição do diâmetro, usando um vídeo microscópio (Hiro-X, Japão). Para avaliação da turbidez, 0,25% de emulsão foi submetida à leitura em espectrofotômetro (UV-mini, Schimadzu) em comprimento de onda de 600nm, em triplicata.

Com a determinação do valor de EHL do óleo de babaçu, foi construído um diagrama de fases pseudoternário utilizando o método de titulação de água. Os sistemas foram obtidos com a mistura de Span 80 e Cremophor EL (6:4) em proporções variáveis de óleo (1:9-9:1), seguida da titulação da fase aquosa. As amostras foram classificadas como microemulsões quando se apresentaram translúcidas.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

As emulsões de EHL 6-8 apresentaram um pequeno grau de instabilidade no período de 28 dias de estocagem, que foi detectado através do índice de cremagem de 0,5cm. As demais tiveram índices crescentes de instabilidade. Entretanto, este resultado não pode ser usado isoladamente para predizer o valor de EHL de uma substância, pois não há uma distinção precisa entre a camada aquosa e a cremosa (ORAFIDYA & OLADIMEJI, 2002).

A avaliação do diâmetro das gotículas mostrou que as emulsões nos intervalos de EHL 4,6-8 apresentaram os menores diâmetros. Porém, aquela com EHL 8 mostrou gotículas mais definidas, de tamanho e distribuição uniforme (Figura 1B). Supõe-se que as gotículas menores se agregam às maiores, resultando em coalescência (ZANIN et al., 2002).

A turbidimetria partiu do princípio em que o sistema que apresentar maior valor de transmitância terá o menor diâmetro de gotículas. A emulsão com EHL 8 apresentou as menores gotículas (Figura 1A). O pH e condutividade foram analisados 24h após

preparação das emulsões, bem como após o ciclo gelo-degelo, apresentando uma pequena variação de $6,88 \pm 0,08$ a $7,11 \pm 0,04$ e $20,66 \pm 0,14$ a $25,12 \pm 0,75$, respectivamente, possivelmente relacionado com a perda de água.

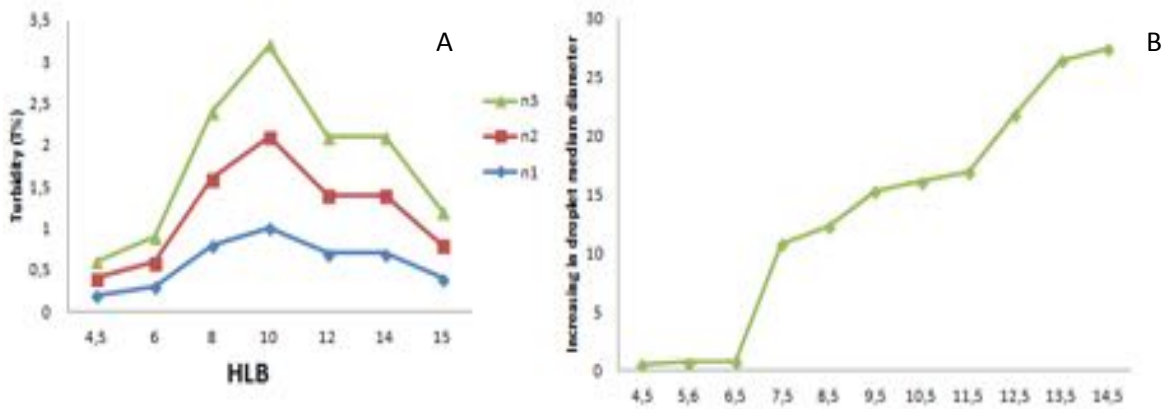


FIGURA 1: Gráficos comparativos da turbidez e tamanho de gotículas para determinação do EHL. A: turbidez em função do EHL; B: tamanho de gotícula em função do EHL.

Uma vez determinado o EHL crítico do óleo de babaçu, construiu-se um diagrama de fases pseudoternário com Span 80, Cremophor EL, propilenoglicol, água e óleo de babaçu, nas proporções acima citadas. Foram obtidas diferentes regiões, classificadas como: emulsão líquida leitosa (ELL), emulsão líquida opaca (ELO) e regiões opticamente transparentes, características das ME's (Figura 2).

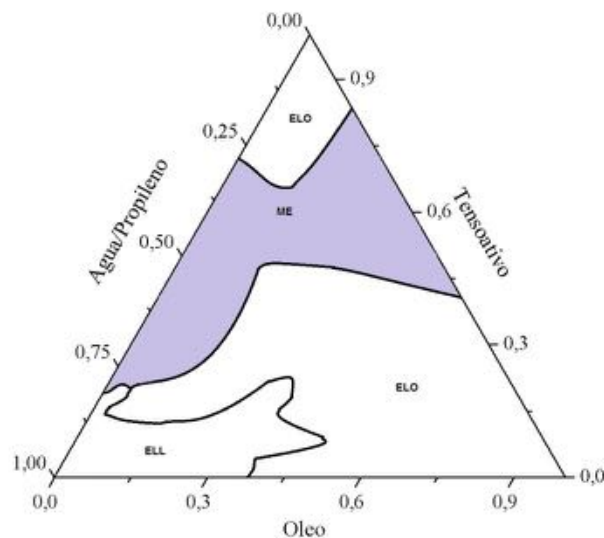


FIGURA 2: Diagrama de fases pseudoternário do óleo de babaçu.

CONCLUSÕES

As técnicas de turbidimetria e tamanho de gotículas foram relevantes na obtenção do valor do EHL do óleo de babaçu. Com isso, foi possível desenvolver um sistema microemulsionado contendo o produto natural para futura aplicação na pele como um fitomedicamento.

AGREDECIMENTOS

Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), CETENE, UEPB e UFPE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTONIO, M.E.C.O. **Permeação cutânea *in vitro* como ferramenta auxiliar para o estudo de formulações semi-sólidas de cetoconazol para aplicações tópicas.** 2007. 147f. Dissertação de mestrado. Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.

DAMASCENO, B.P.G.L.; et al. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.32,n.1,p.9-18, 2010.

GUMIERO, V.C. **Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões à base de óleo de babaçu (*Orbignya oleifera*) e extratos vegetais (*Areca catechu*, *Glycyrrhiza glabra* e *Portulaca oleracea*) para uso pós-sol.** 2011. 153f. Tese de doutorado. Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo,2011.

MARTINS, M.R.F.M.; VEIGA, FRANCISCO. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, n.1,p. 33-54, 2002.

ORAFIDIYA,L.O; OLADIMEJI,F.A. Determination of the required HLB values of some essential oil. **International Journal of Pharmaceutics**,v.237,p.241-249, 2002.

SILVA, J.A.; SANTANA, D.P.; BEDOR, D.G.C.; BORBA, V.F.C.; LIRA, A.A.M.; EGITO, E.S.T. Estudo de Liberação e permeação *in vitro* do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. **Química Nova**, v.32, n.6, p.1389-1393, 2009.

ZANIN, S.M.; MIGUEL, M.D.; CHIMELLI, M.C.; OLIVEIRA, A.B. Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) de óleos de origem vegetal. **Visão acadêmica**, v.3, n.1, p.13-18, 2002.



TOTAL PHENOLS AND FLAVONOIDS OF WASTES FROM *Agave sisalana* DECORTICATION: A PROJECT TO REVITALIZE THE CROP OF SISAL IN THE PARAÍBA

¹C.O. MELO, ²A. C. APOLINÁRIO, ¹M. LOPES, ²J. P. L. VIEIRA, ¹F.F. SANTOS, ²A. CONVERTTI, ³A. PESSOA, ²B.P.G.L DAMASCENO, ²J. A SILVA

¹Department of Pharmacy, State University of Paraíba, Rua Juvêncio Arruda, S/N - Bairro Universitário, 58429-600, Campina Grande, Paraíba, Brazil. camillamello-@hotmail.com

²Graduation Program in Pharmaceutical Sciences, State University of Paraíba, Rua Juvêncio Arruda, S/N - Bairro Universitário, 58429-600, Campina Grande, Paraíba, Brazil

³Department of Civil, Chemical and Environmental Engineering, Chemical Engineering Pole, Genoa University, Via Opera Pia 15, 16145, Genova, Italy

⁴Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580 – Bloco 16, Cidade Universitária, 05508-000, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

Only 5% of the decorticated leaves from *Agave sisalana* is exploited to produce fiber, while the remaining 95% consists of both a solid and a liquid waste (juice) that are normally discarded. The aim of this work was evaluate phytochemical quantitative differences between wastes of decortication from *A. sisalana*. Solid waste was dried in a forced circulation oven at 40°C and extracted with water at 80°C for 2 h (7:1 w/v) to obtain a liquid extract (HDSW-LE) and liquid waste submitted to lyophilization (LLW). Phenolic compounds were determined using the Folin-Ciocalteau's reagent and total flavonoids by the aluminum chloride colorimetric method. Wastes exhibited quantitative differences among them. Wastes of *A. sisalana* may be availed with good perspectives for pharmaceutical industry.

INTRODUCTION

The *Agave* genus, belonging to the Asparagales order and the Agavaceae family, gathers more than 200 monocotyledonous and monocarpic plants that grow mostly in China, Brazil, Mexico, Tanzania, South Africa and Mozambique, although native to the North America, with their center of origin in present-day Mexico (ESCAMILLA-TREMIÑO, 2012). In Brazil, *Agave sisalana* is an important crop in many states (ADE-AJAYI et al., 2011; NARVÁVEZ-ZAPATA & SÂNCHEZ-TEYER, 2009), where it is used mainly for the commercial production of hard fiber.

A. sisalana Perrine, popularly known as sisal is well adapted to the semi-arid region of Northeast Brazil that is currently the largest producer of sisal fiber in the world. Only 5% of the waste resulting from sisal leave decortication is exploited to produce a hard fiber that is used for various purposes; the remaining 95% consists of a

solid waste (bagasse) and a liquid waste (juice of the sisal) that are normally discarded by sisal farms (SANTOS et al., 2009).

Studies showed potential for pharmaceutical applications of products from *A. sisalana* as anti-inflammatory and antimicrobial agents and revealed that different parts of the plant have many secondary metabolites, especially steroidal sapogenins. Moreover, recent researches reported the extraction of carbohydrates of interest for the pharmaceutical industry such as mannitol and pectin from wastes (DEBNATH et al., 2010).

OBJECTIVE

The aim of this work was to analyze and compare the phytochemical profiles of total phenols and flavonoids of wastes resulting from *A. sisalana* leave decortication.

MATERIALS AND METHODS

The botanical material was collected in Monteiro-PB, Brazil (7°52'40.50" and 37°07'34.91" O), in January 2013. A voucher was deposited at the "Manoel de Arruda Câmara" of Campina Grande-PB, Brazil, under the number 210. The liquid and solid wastes utilized in this study were collected directly from a decortication machine in a sisal farm processing leaves of 6-year old sisal plants. One portion of the resulting liquid waste (LW) was separated and submitted to lyophilization, providing the so-called lyophilized liquid waste (LLW). The solid waste was dried in a forced circulation oven at 40°C until constant weight to give the corresponding herbal drug that was named as "herbal drug of solid waste" (HDSW). Figure 1 shows the steps followed to achieve the botanic materials from *A. sisalana*.

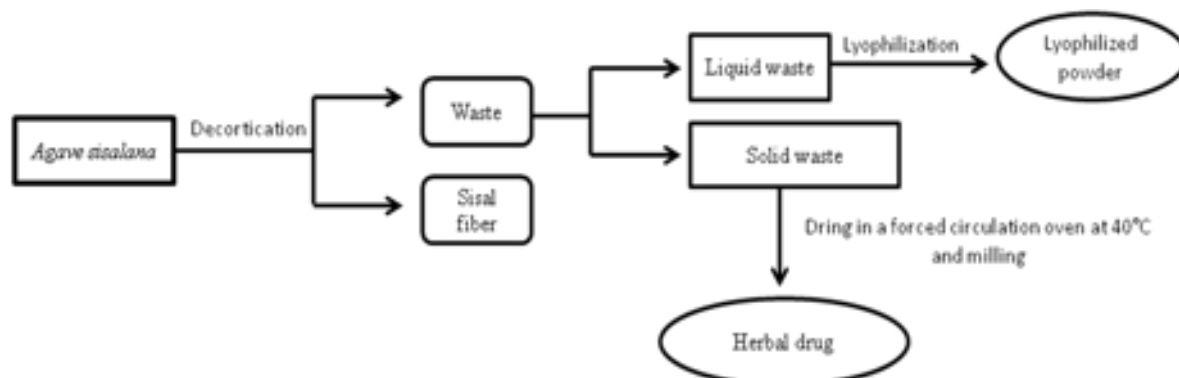


Figure 1. Scheme of achievement of *A. sisalana* wastes.

Portions of HDSW were extracted with distilled water (HDSW-LE) at 80°C for 2 h at a liquid/solid ratio of 7:1, and then samples were filtered. Total phenolics (TP) content of the waste extracts was determined by the colorimetric method adapted by Ben Hamissa et al. (2012) using the Folin-Ciocalteu reagent and gallic acid as a standard. The absorbance was measured at 720 nm. Total flavonoids (TF) content was determined by the colorimetric method of complexation with 2% AlCl₃, using a UV-Vis spectrophotometer, model UV-mini-1240 (Shimadzu, Kyoto, Japan) and quartz cuvettes with 1.0 cm-pathlength.

RESULTS AND DISCUSSION

The TP content of *A. sisalana* wastes, determined by the Folin–Ciocalteu method, was expressed as mg of equivalent gallic acid per gram of dry samples from the calibration curve of gallic acid standard solutions (0–200 mg/L). The TP contents of both the LLW and HDSW-LE samples are listed in Table 1. These results pointed out that the LLW sample had a TP level (60.23 ± 1.93 mg eq. gallic acid/g of herbal drug) almost one order of magnitude greater than the HDSW-LE one (18.69 ± 0.60 mg eq. gallic acid/g of herbal drug).

Table 1- Total phenolics (TP) content of wastes from *A. sisalana*.

Sample	TP (mg eq. gallic acid/g of herbal drug)
LLW	60.23 (± 1.93)
HDSW-LE	18.69 (± 0.60)

The results are expressed as the mean \pm SD (n = 3) P < 0.05

On the other hand, the TF content of the same samples, determined by the colorimetric method of complexation with 2% AlCl_3 and expressed as mg of equivalent quercetin per gram of dry samples from the calibration curve of quercetin standard solutions (0–60 $\mu\text{g}/\text{mL}$), are listed in Table 2. Similarly to TP content, these results, which agree with previous findings, highlighted a TF level in LLW sample (7.92 ± 0.74 mg eq. quercetin/g of herbal drug) that was almost 5-fold that in the HDSW-LE one (1.64 ± 0.74 mg eq. quercetin/g of herbal drug). Taking into account the different methodologies employed to obtain samples and then the different dilution effects on them, these results taken as a whole suggest that the extraction with hot distilled water could have been more selective in respect of flavonoids than in respect of total phenolics.

Table 2- Total flavonoids (TF) content of wastes from *A. sisalana*.

Sample	TF (mg eq. quercetin /g of herbal drug)
LLW	7.92 (± 0.74)
HDSW-LE	1.64 (± 1.10)

The results are expressed as the mean \pm SD (n = 3) P < 0.05

The large differences in the TP and TF contents of the selected wastes could have been due to the fact that the process of manual squeezing to separate juice from bagasse could have dragged more water-soluble components than the lyophilization process. Besides the well-known pharmaceutical applications of *A. sisalana* related to the presence of many secondary metabolites in their different parts, specially steroidal saponin used for the synthesis of corticosteroids, the promising results of this work in terms either of TP or TF confirm the potential also of wastes resulting from decortications of its leaves (DEBNATH et al., 2010).

CONCLUSION

Significant differences were found in total phenolics and total flavonoids profiles of the solid and liquid wastes resulting from decortication of *A. sisalana* leaves. After lyophilization, the liquid waste, the so-called juice of agave, exhibited by far the highest concentrations of both group of metabolites. These preliminary results constitute the first step of a national project aimed at revitalizing the crop of sisal in the Brazilian state of Paraíba.

ACKNOWLEDGMENTS:

This work was supported by Casadinho-PROCAD (CNPQ/CAPES), Project N°: 552652/2011-3, Development of Processes and Pharmaceuticals and Biotechnological Processes Using the Sustainability Potential of Semiarid and PROPESQ-UEPB. The authors also acknowledge the financial support of CAPES for Prof. A. Converti fellowship as Special Visiting Researcher (Science without Borders Program, ref. n. A003_2013).

REFERENCES

- ADE-AJAYI, A.F., HAMMUEL, C.; EZEAYANASO, C.; OGABIELA, E.E.; UDIBA, U.U.; ANYIM, B. & OLABANJI, O. Preliminary phytochemical and antimicrobial screening of *Agave sisalana* Perrine juice (waste). *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, v. 3, n. 7, p. 180-183, 2011.
- BEN HAMISSA, Aïcha Menyar et al. Phenolics extraction from *Agave americana*(L.) leaves using high-temperature, high-pressure reactor. *Food and Bioproducts Processing*, v. 90, n. 1, p. 17-21, 2012.
- DEBNATH, M.; PANDEY, M.; SHARMA, R.; THAKUR, G.S. & LAL P. Biotechnological intervention of *Agave sisalana*: a unique fiber yielding plant with medicinal property. *Journal of Medicinal Plant Research*, v. 4, n. 3, p. 177-187, 2010.
- ESCAMILLA-TREVIÑO, L. L. Potential of Plants from the Genus *Agave* as Bioenergy Crops. *BioEnergy Research*, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2012.
- NARVÁEZ-ZAPATA, J.A. & SANCHEZ-TEYER, L. Agaves as a raw material: recent technologies and applications. *Recent Patents on Biotechnology*, v. 3, n. 3, p. 185-191, 2010.

SANTOS, J.D.G.; BRANCO, A.; SILVA, A. F. PINHEIRO, C.S.R. NETO, A.G.; UETANABARO, A.P.T; QUEIROZ S. R. O. D. & OSUNA J. T. A. Antimicrobial activity of *Agave sisalana*. *African journal of biotechnology*, v. 8, n. 22, P.6181-6184, 2009.



***Vernonia condensata* Baker: UM ESTUDO SOBRE A PERSPECTIVA DE NOVO FITOTERÁPICO**

¹W.T. VILELA, ¹G.S. MARQUES, ²C.B.M. FIGUEIRÊDO, ³C.A.S. ANDRADE

¹Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos - LTM, Universidade Federal de Pernambuco.
grazismarques@hotmail.com

²Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos - NCQMC, Universidade Federal de Pernambuco. bmf.camila@gmail.com

³Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Biofísica, Universidade Federal de Pernambuco. csrandrade@gmail.com

Introdução: *V. condensata* Baker (Asteraceae), boldo baiano, é uma planta medicinal de uso popular, utilizada principalmente para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, apresentando baixa toxicidade. Diante da escassez de estudos sobre a espécie, sobretudo em termos farmacotécnicos, surge o interesse no desenvolvimento de uma forma farmacêutica mais adequada, administrada por via oral, com eficácia, segurança e qualidade para o uso pretendido. **Métodos:** Revisão de literatura nas bases de dados Scielo e Science Direct, entre 1990 a outubro de 2013, envolvendo a espécie e as formas farmacêuticas mais apropriadas. **Resultados e Discussão:** *V. condensata* está presente na RENISUS e no Formulário de Fitoterápicos, onde consta apenas a preparação de infusão. As cápsulas foram definidas como uma forma farmacêutica vantajosa para veiculação de extrato a partir desta espécie, por permitir a administração de doses pré-definidas, ter rápida liberação, fácil produção em pequena escala, menor custo e possuir invólucros facilmente digeríveis. Contudo, todas as exigências normativas devem ser seguidas (RDCs nº10/10, nº17/10, nº14/10, nº13/13, entre outras). **Conclusão:** Observa-se em *V. condensata* uma forma alternativa de tratamento para distúrbios gastrointestinais através da produção de cápsulas, ainda não regulamentadas para a referida espécie. Parâmetros de qualidade para esses produtos devem ser estabelecidos, desde a matéria-prima vegetal até a obtenção do produto final.

Apoio: Pró-reitoria de Extensão (PROEXT) da Universidade Federal de Pernambuco.

Palavras-chave: Cápsulas, Plantas medicinais, Fitoterápicos, *Vernonia condensata* Baker.



3º Encontro Brasileiro
para Inovação Terapêutica

1º Workshop
Rede RISH
Rede de Inovação em Insumos
para Saúde Humana
II Workshop
Estabilidade de Fármacos
e Medicamentos

21 e 22/10/2013
Campus UFPE
23 a 25/10/2013
Dorisol Recife
Grand Hotel

Interligando competências científicas, tecnológicas e industriais em espaços de saúde

CONTROLE DE QUALIDADE DE INSUMOS FARMACÊUTICOS E MEDICAMENTOS



APLICAÇÃO DA ANÁLISE TÉRMICA NO ESTUDO DE COMPATIBILIDADE FÁRMACO – EXCIPIENTE DO ANTIRRETROVIRAL FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA (FTD)

¹V. M. S. SOUZA, ¹J.P. AVELINO, ¹F. A. MARINHO, ¹C.B.M. FIGUEIRÊDO, ¹M.M. ALBUQUERQUE, ²P. J. ROLIM NETO, ¹M. F. R. SOARES, ¹J.L. SOARES SOBRINHO.

¹Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco. E-mail: victormatheus_55@hotmail.com

²Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco.

Introdução: Para o estudo de pré-formulação do FTD torna-se de fundamental importância o estudo de compatibilidade fármaco-excipientes e a análise térmica é o conjunto de técnicas mais amplamente utilizadas, revelando informações valiosas sobre as propriedades físicas dos fármacos (estabilidade, compatibilidade, decomposição, pureza). **Métodos:** Foram preparadas misturas binárias (MB) fármaco/excipientes (1:1) do FTD com os excipientes da formulação comercial do FTD: croscarmelose sódica, lactose monohidratada, estearato de magnésio, celulose microcristalina e amido. As MB foram analisadas por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG/DTG). As curvas DSC (Shimadzu® DSC-60) foram realizadas entre 25–200°C, 10°C.min⁻¹, 2 mg de amostras. Nas análises de TG (Shimadzu®, modelo TGA Q60) utilizou-se 6mg e 12mg (± 0.3) para FTD e MB, respectivamente; entre 25-600°C e 10°C.min⁻¹. **Resultados e Discussão:** Na análise por DSC a maioria das MB apresentaram apenas pequenas mudanças nos picos, a exceção do FTD+Estearato-Mg, que apresentou redução de 19,15°C em relação a fusão de fusão do FTD (116,5°C), indicando possível interação entre essas substâncias dada a provável solubilização do fármaco no excipiente fundido. **Conclusão:** Os resultados indicam cautela quando ao uso do estearato-Mg em formulações com FTD e indicam a utilidade da análise térmica no estudo de pré-formulação. No entanto é aconselhável a utilização técnicas adicionais para interpretação dos resultados.

Apoio: CAPES

Palavras-chave: Fumarato de Tenofovir Desoproxila, Análise Térmica, compatibilidade, estudo de pré-formulação.



**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE FOTOPROTETORES SOLARES
COMERCIALIZADOS EM FARMÁCIAS DE MANIPULAÇÃO NO
MUNICÍPIO DE CARUARU-PE**

**¹T.R.S. BATISTA, ¹A.F. SANTOS, ²R.F. SANTOS, ¹SANTOS M.S.S. ¹C.H.T.P
SILVA**

¹Faculdade ASCES – Caruaru

²Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife

Introdução: O desenvolvimento de formulações estáveis, para veicular os agentes de proteção solar deve levar em consideração a estabilidade das formulações, para que possam ser comercializadas e armazenadas por maior tempo e de forma segura. Dessa forma o trabalho avaliou a estabilidade de diferentes formulações, de protetores manipulados em farmácias de Caruaru-PE. **Métodos** Os protetores foram classificados em G1 e G2. Foi realizado o ciclo gelo-degelo durante 12 dias e testes de estabilidade acelerada nos tempos 0, 7, 15, 30 e 60 dias. Além disso, foram avaliadas as características organolépticas e físico-químicas. **Resultados e Discussão:** Na avaliação, a partir do 2º e 1º dia, G1 e G2, mostraram alteração no ciclo gelo-degelo, respectivamente. Na estabilidade acelerada, a partir do tempo 7 em ambas, houve separação de fases, o que, segundo o guia de estudos de estabilidade (RE nº1, de 29 de julho de 2005) inviabiliza a comercialização por períodos prolongados, o que torna necessário novo estudo de formulação para estes produtos. **Conclusão:** por apresentaram características físicas e organolépticas alteradas, nos testes preliminares de estabilidade, as amostras podem ser comercializadas apenas com prazos de validade muito limitados.

Palavras-chave: Radiação Solar, fotoprotetores, estabilidade.



AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE CRISTALINIDADE DE DUAS MARCAS COMERCIAIS DE QUITOSANA

¹D.G.Oliveira, ¹B.P. Silva, ¹D.M.S Wanderley, ¹J.R.T.L Martins, ¹R. S. C. Lima

¹Laboratório de Avaliação e Certificação de Biomateriais do Nordeste, Universidade Estadual da Paraíba.

Introdução: A quitosana é um polissacarídeo derivado da quitina, muito abundante na natureza e, dentre suas diversas características, ela apresenta baixa toxicidade, é biodegradável e possui propriedades antibacterianas. Seu uso está amplamente difundido em diversas áreas, uma delas é a farmacêutica, sendo muito usada como carreadora de fármacos. Um dos parâmetros para avaliar a qualidade de um fármaco/substância é o grau de cristalinidade. O presente estudo avaliou o índice de cristalinidade de duas marcas de quitosanas comerciais. **Métodos:** As quitosanas utilizadas foram classificadas como Quitosana A e Quitosana B. As amostras em pó foram submetidas à Difração de Raios X (DRX), através de um difratômetro de raios X Shimadzu[®] (modelo XRD 6000) com varredura angular $5^\circ < 2\theta < 35^\circ$, na montagem de Bragg-Brentano, sistema θ - 2θ , utilizando-se radiação de Cu ($K\alpha_1$) com varredura no passo de 0,02 (2θ), com intervalo de 0,6 segundo para cada amostra. A medida de cristalinidade das amostras foi estimada a partir da utilização de uma equação que utiliza a medida das intensidades das regiões cristalina e amorfa, resultando no cálculo do índice de cristalinidade. **Resultados e Discussão:** Os resultados revelam que a Quitosana B tem um índice de cristalinidade (IC) de 60% e a Quitosana A possui um IC de 34,2%. **Conclusão:** Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que a Quitosana B é mais cristalina que a Quitosana A e, portanto sua biodegradabilidade é menor.

Apoio: CNPq, UEPB.

Palavras-chave: Índice de cristalinidade; Marcas de quitosana; Degradação.



CARACTERIZAÇÃO DE POLÍMEROS E SUAS PROPRIEDADES BIOADESIVAS EM COMPRIMIDOS DE APLICAÇÃO TÓPICA

¹L. L. F. SÁ, ²M. S. F. CORDEIRO, ²C. M. B. SILVA, ¹L. M. S. FREIRE, ²J. L.
SOARES-SOBRINHO, ¹L. C. C. NUNES.

¹Núcleo de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal do Piauí

²Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos, Departamento de Farmácia,
Universidade Federal de Pernambuco. marcianacordeiro@hotmail.com

RESUMO

Misturas físicas entre polímeros podem proporcionar alterações nas propriedades em comparação aos componentes isolados, incrementando ou não suas propriedades adesivas. O trabalho analisa a influência da proporção de Carboximetilcelulose Sódica (CMC-Na) e Carbopol[®] 940, com quitosana em suas propriedades adesivas na mucosa bucal, através do tempo e força de mucoadesão e interação por TG e DTA, para os polímeros isolados e para as misturas. Nas curvas em análise observamos modificações nos eventos, que são atribuídos à interação das misturas e presença de determinados grupos funcionais. Os comprimidos bioadesivos em análise possuem incremento de adesão, quando em misturas físicas equimolares, tal achado é de suma importância no desenvolvimento de formulações bioadesivas.

INTRODUÇÃO

A bioadesão é a denominação dada para a ligação entre sistemas transportadores de fármacos e a superfície de uma membrana biológica. Essa propriedade é definida como um sistema de liberação modificado em que fármacos estão dispersos numa matriz hidrofílica polimérica e cuja ação relaciona-se diretamente com a capacidade e velocidade com que aqueles se libertam destes (LYRA et al., 2007). Os comprimidos bioadesivos são formulações sólidas contendo essa matriz polimérica, incrementando sua retenção na mucosa e destinado a dissolver lentamente nesta cavidade, onde liberam o fármaco (AGUIAR, M. M. G. B. 2007).

Essa propriedade adesiva é dada pela capacidade do polímero fazer interações eletroquímicas com o muco da superfície onde ocorrerá a adesão. Dessa forma, quanto maior a proporção de radicais ligantes, maior é a facilidade dessas interações (CID, Y. P. 2009). Polímeros com boas propriedades adesivas são a quitosana, com hidroxilas e aminas ligantes, os derivados celulósicos, como a carboximetilcelulose e os acrilatos, como carbopol[®], que possuem carbonilas e hidroxilas ligantes.

Entretanto, quando se fala em misturas físicas entre estes polímeros, para produção de formulações sólidas, algumas alterações químicas podem ocorrer, prejudicando ou incrementando suas propriedades adesivas.

OBJETIVOS

Comparar a influência da proporção de polímeros adicionados à formulação e sua capacidade adesiva na mucosa bucal, avaliando a presença dessa interação por termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA).

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi utilizado a Carboximetilcelulose Sódica (Fornecedor: Ativos Magistrais, Lote: ACX01122F4) e Carbopol[®] 940 (Fornecedor: Pharma Nostra, Lote: 12672106F). Cada um dos excipientes foi combinado na proporção de 3:1, 2:2 e 1:3 com a quitosana (Fornecedor Polymar, Lote: 20091115), para compressão por via direta (Neuberger de 1 punção e 7mm de diâmetro), obtendo-se comprimidos de 100mg. O tempo de mucoadesão foi realizado em dissolutor Nova Ética com 500mL de tampão fosfato (pH 6.8 ± 0.05), 37 °C e 150 rpm. Em cada cuba, uma mucosa de porco onde os comprimidos foram previamente aderidos, foi inserido para monitoramento (PERIOLI et al., 2004). A força de mucoadesão foi avaliada por meio de um texturômetro da marca TA.XT plus, utilizando a mencionada mucosa de suínos, com metodologia adaptada de PERIOLI, et al.,2004. A termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA) foi realizada em Termobalança Shimadzu[®], modelo DTG-60H, sob atmosfera de Nitrogênio com fluxo 50mL/min⁻¹, razão de aquecimento de 10°C/ min⁻¹, temperatura inicial de 25°C e final de 600°C. Os dados foram analisados por meio do software TA-60WS (Therma Analysis), versão 2.20 da Shimadzu[®].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de mucoadesão apresentaram-se mais favoráveis para formulações desenvolvidas com mesmas concentrações entre quitosana e carbopol[®], e entre quitosana e carboximetilcelulose, ou seja, proporção equimolar entre esses polímeros (2:2). A explicação química conveniente para esse comportamento esta na estrutura molecular desses compostos, as quais possuem grupos funcionais capazes de sofrerem interações eletrostáticas e formarem ligações de hidrogênio entre si. Logo quando estão em uma proporção equimolar, essa interação é maior. Outro fator relevante é a interação dessas misturas com a mucina, substancia que reveste toda a cavidade bucal e é responsável pelas suas propriedades viscoelásticas, devido ao seu elevado peso molecular, ligações peptídicas, pontes dissulfídricas intramoleculares e interações hidrofóbicas.

Para comprovar essas interações foram realizadas TG e DTA. Na termogravimetria obtivemos as temperaturas nas quais há maior perda de massa, nestas também ocorrem os eventos endotérmicos e exotérmicos mais significativos da DTA, o

que direciona as buscas por interações. Nestas curvas devemos observar deslocamentos, surgimento ou desaparecimento em picos para os polímeros isolados em relação aos picos para os polímeros associados.

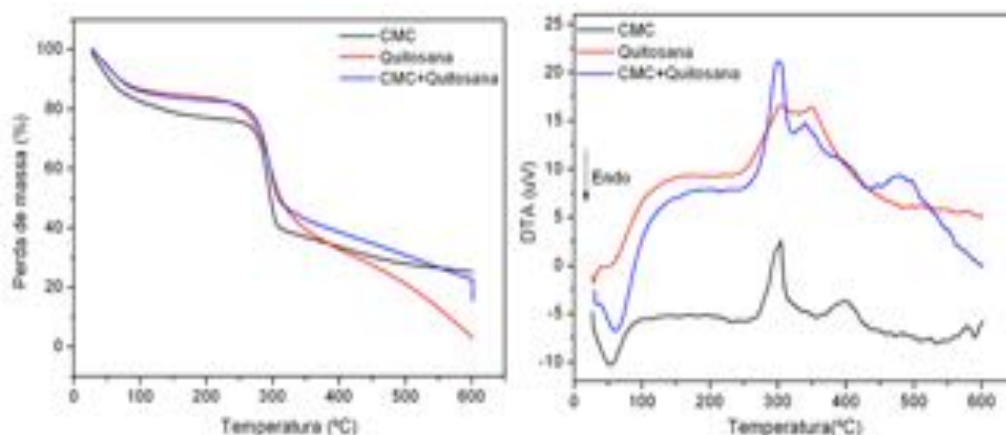


Figura 01- Curva TG e DTA, carboximetilcelulose, quitosana e mistura.

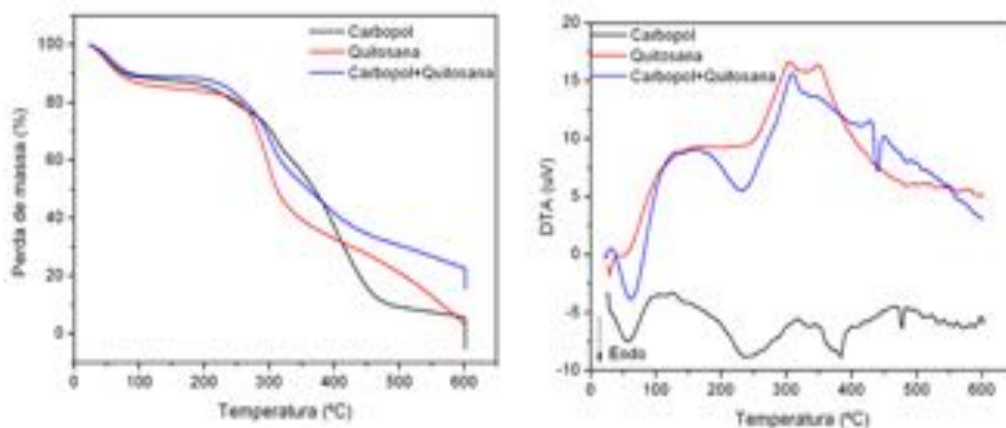


Figura 02- Curva TG e DTA, carbopol[®], quitosana e mistura.

Como é possível identificar nas figuras 01 e 02, houve a interação entre os polímeros com deslocamentos acima de 10°C nos picos endotérmicos para formulações com carbopol[®] e acima de 50°C nos picos exotérmicos para formulações com carboximetilcelulose, o que evidencia a maior interação entre as formulações contendo o segundo polímero, o que resulta em maiores proporções em força e tempo de mucoadesão.

CONCLUSÕES

Comprimidos bioadesivos de quitosana com carbopol[®] ou com carboximetilcelulose possuem incrementos em suas propriedades de adesão quando se encontram em misturas físicas equimolares. Tal achado direciona futuras pesquisas com desenvolvimento tecnológico em formulações bioadesivas.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos à empresa Vegeflora Extrações do Nordeste Ltda, localizada no município de Parnaíba, Piauí, por seu apoio às pesquisas do grupo. Agradecemos também ao CNPQ pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

CID, Y. P. **Desenvolvimento de sistemas de liberação mucoadesivos para o celecoxibe na quimioprevenção do câncer oral: influência da azona como promotor de penetração.** 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

LYRA, M. A. M.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; BRASILEIRO, M. T. Sistemas Matriciais Hidrofilicos e Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy.** v.5, n.26, p. 784-93, 2007.

PERIOLI, V. AMBROGI, L. VENEZIA, C. PAGANO, M. RICCI, ROSSI, C. Chitosan and modified chitosan as agents to improve performances of mucoadhesive vaginal gels. **Colloids and Surface B: Biointerfaces,** v. 66, p. 141–145, 2008.



CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA DO CLORIDRATO DE PILOCARPINA PARA DELINEAMENTO DE NOVAS FORMULAÇÕES

¹C. M. B. SILVA, ¹M. S. F. CORDEIRO, ²L. L. F. SÁ, ²L. M. S. FREIRE, ²L. C. C. NUNES, ¹J. L. S. SOBRINHO

¹ Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos, Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Pernambuco. camilabarros.farma@gmail.com

² Núcleo de Tecnologia de Medicamentos, Universidade Federal do Piauí

RESUMO

O cloridrato de pilocarpina vem sendo pesquisado para o tratamento de patologias ainda pouco exploradas no país. Para direcionar o desenvolvimento de formulações para esses tratamentos é necessário o estudo do comportamento térmico do fármaco. Dessa forma, foi realizada análise térmica diferencial (DTA) e termogravimetria (TG) em termobalança Shimadzu[®]. Com os resultados obtidos conclui-se que o fármaco possui alto ponto de fusão e alta estabilidade térmica 207°C e 281°C, respectivamente. Além disso, possui eventos endotérmicos apenas na faixa de temperatura da decomposição, sugerindo ausência de alterações químicas em temperaturas inferiores. Portanto, a alta estabilidade do fármaco facilita o desenvolvimento de suas formulações.

INTRODUÇÃO

A pilocarpina é um alcaloide colinérgico com estrutura de uma amina terciária, que apresenta ações nicotínicas e muscarínicas, com predominância das últimas, relacionadas à ligação reversível do fármaco aos receptores do tipo M3 (MIURA, 2009). Hoje, sua principal ação, explorada comercialmente, é a atividade hipotensora ocular, que resulta num dos melhores tratamentos para o glaucoma, entretanto, por ser uma substância estimuladora de receptores colinérgicos, ela apresenta ainda outras ações, como estimulação das glândulas secretoras, relaxamento de esfíncteres, estimulação do peristaltismo, dentre outras (PAPPANO, 2006; SANTANA, 2009; MIURA, 2009). Recentemente seu uso vem sendo explorado no campo da pesquisa para o tratamento da xerostomia, caracterizada como uma hipossalivação severa em pacientes com variadas patologias. Seu uso para essa condição é bem estabelecido em alguns países, excluindo o Brasil, que até o presente não possui nenhuma apresentação comercial disponível. Diante da ampliação das pesquisas para novas indicações terapêuticas com esse fármaco e do desenvolvimento de novas formulações para seus tratamentos, é de suma

importância o conhecimento do comportamento térmico de degradação desse princípio ativo para permitir um direcionamento ao delineamento de novas formulações.

OBJETIVOS

Caracterização térmica do cloridrato de pilocarpina para delineamento de novas formulações.

MATERIAIS E MÉTODOS

A caracterização termoanalítica através da termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA) foi realizada em uma Termobalança Shimadzu®, modelo DTG-60H, sob atmosfera de Nitrogênio com fluxo $50\text{mL}/\text{min}^{-1}$, cadinhos de alumínio, razão de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}^{-1}$ a temperatura inicial e final foi de 25°C a 600°C respectivamente. Foram utilizados cadinhos de alumínio e massa de 6mg de cloridrato de pilocarpina. Os dados foram analisados por meio do software TA-60WS (Therma Analysis), versão 2.20 da Shimadzu®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diante das condições em que foi realizada a análise, é observado na figura 01 que o cloridrato de pilocarpina funde em $207,6^\circ\text{C}$ e se decompõe após essa temperatura. A curva DTA, fornece o primeiro evento endotérmico em $202,7^\circ\text{C}$ a $217,1^\circ\text{C}$ com consumo de energia de $154,14\text{ Jg}^{-1}$, que é atribuído ao ponto de fusão do cloridrato de pilocarpina. O processo de decomposição tem início em 281°C ocorrendo em dois eventos endotérmicos, como pode ser observado na figura 01, com respectivamente $\Delta H=685,0\text{ Jg}^{-1}$ e $\Delta H=11,4\text{ Jg}^{-1}$. Resultados semelhantes foram apresentados na literatura (SAKAI et.al, 2012).

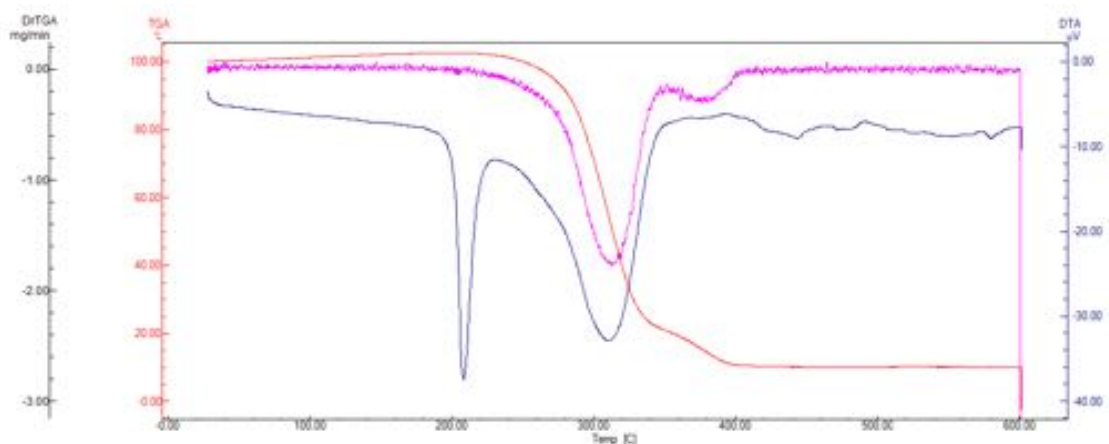


Figura 01: Curva termogravimétrica (TG), primeira derivada (DTG) e DTA do cloridrato de pilocarpina

As curvas de TG/DTG, mostram que o cloridrato de pilocarpina apresenta dois nítidos eventos de decomposição, o primeiro ocorrendo entre 281°C e 327°C, com perda de massa (Δm) de 81,5%, o segundo, entre 361°C e 407°C com perda de massa (Δm) de 10.1%. Logo, pode-se inferir que o cloridrato de pilocarpina permanece estável termicamente até a temperatura de 281°C, uma vez que é nesta onde começa a degradação. Resultados semelhantes foram encontrados na literatura (BLANCO & SIRACUSA, 2013).

Apesar dos resultados mostrarem a alta estabilidade do cloridrato de pilocarpina quanto a perda de massa, com eventos endotérmicos após 200°C, sugerindo ausência de alterações químicas em temperaturas inferiores, algumas referências citam a possibilidade de transformação desse fármaco em isopilocarpina e ácido pilocárpico sobre várias condições de acondicionamento (KREIENBAUM M.A., PAGE D.P., 1986). Não havendo indicações dessas transformações, é aconselhável serem realizados estudos de degradação para complementar os estudos de desenvolvimento de novos medicamentos.

CONCLUSÕES

A TG e DTA são técnicas que fornecem várias informações acerca do cloridrato de pilocarpina, informações estas que ditam seu comportamento térmico. Diante do apresentado, podemos concluir que cloridrato de pilocarpina possui alto ponto de fusão e alta estabilidade térmica, aproximadamente 207°C e 281°C, respectivamente. Conclui-se ainda que sua decomposição ocorra através de processos endotérmicos, evidenciado no DTA. Devido ao seu comportamento, o cloridrato de pilocarpina pode ser utilizado como princípio ativo no desenvolvimento de novas formas farmacêuticas.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos à empresa Vegeflora Extrações do Nordeste Ltda, localizada no município de Parnaíba, Piauí, por seu apoio às pesquisas do grupo. Agradecemos ao CNPQ pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLANCO, I., SIRACUSA, V. Kinetic study of the thermal and thermo-oxidative degradations of polylactide-modified films for food packaging. **J Therm Anal Calorim** (2013) 112:1171–1177.

KREIENBAUM, M. A., PAGE, D.P. Stability of pilocarpine hydrochloride and pilocarpine nitrate ophthalmic solutions submitted by U.S. hospitals. **Am J Hosp Pharm**. 1986 Jan;43(1):109-17.

MIURA, L. M. C. V. **Isolamento do alcalóide epiisopiloturina a partir da biomassa do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) e a avaliação de suas atividades antibacteriana, antileishmania, antiviral, antiesquistossoma e sialagoga.** Trabalho de conclusão de curso (Mestrado) – Faculdade de Biologia, Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2009.

OLIVEIRA, MARCELO ANTONIO DE, YOSHIDAI, MARIA IRENE; GOMES, ELIONAI CASSIANA DE LIMA. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Quim. Nova**, Vol. 34, No. 7, 1224-1230, 2011.

PAPPANO, A. J. **Drogas ativadores dos receptores colinérgicos e inibidores da colinesterase.** In: KATZUNG, B. G. Farmacologia básica e clínica. 10ª Ed. São Paulo: McGRAW-HILL, 2007.

SANTANA, H. A. L. **Efeito de duas formulações de pilocarpina, solução para bochecho e sublingual, no tratamento da xerostomia induzida por radiação.** Trabalho de conclusão de curso (Mestrado) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

SAKAI, V. Y., SHIGUIHARA, A.L., CUNHA, V.R.R., MIURA, L.V., GUIMARÃES, A., LEITE, J.R.S.A., CONSTANTINO, V.R.L. Intercalação do farmoquímico pilocarpina em argilas de uso farmacêutico. 35ª **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.** Águas de Lindóia-SP, 2012.

SOUZA, MARCOS A. F. DE **Avaliação Termoanalítica e Cinética de Medicamentos Antiretrovirais (Estavudina, Lamivudina, Zidovudina) e síntese de novos produtos derivados dos antirretrovirais**-Tese de Doutorado, 142 páginas- João Pessoa – PB, 2008.

STORPIRTIS, S., GONÇALVES, J. E., CHIANN, C., GAI, M. N. **Biofarmacotécnica.** Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2009. Capítulo 4.



DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA ANÁLISE DE FORMOL EM PRODUTOS PARA ALISAMENTO CAPILAR

¹A.L.V. MEDEIROS, ¹T.S. ALMEIDA, ¹C.A. AZEVEDO FILHO

¹Faculdade ASCES. luiza_farmacia@yahoo.com.br

Introdução: A utilização do formaldeído nos produtos para alisamento capilar pode causar intoxicação. Apesar disso, é empregado com função conservante, desde que a concentração não ultrapasse o limite 0,2%, conforme Resolução 162/01 da ANVISA.

Método: Para quantificação de formol, 2g de amostra foram dissolvidos em 50 mL de água destilada. 10 mL desta preparação foi transferido para um Erlenmeyer adicionando-se 5 mL do reagente de derivatização acetilacetona. A curva de calibração com padrão de formol foi realizada fazendo-se uma titulação iodimétrica da solução estoque de formol (0,5% v/v) e, por diluição, estabelecidos os pontos da curva (submetidos ao reagente citado). Foram realizadas também análises semi-quantitativas utilizando-se o reagente de Schiff em meio ácido sulfúrico. **Resultados e Discussão:** Foram utilizados códigos de identificação dos produtos (S, F, M, SL e Z). Para a curva de calibração há cinco pontos (0.37 – 9 µg/mL), obtendo-se um coeficiente linear de $R = 0.9975$. Os limites de detecção e quantificação foram, respectivamente, 0.62 µg/mL e 1.9 µg/mL. Dos cinco produtos analisados, foram obtidas as seguintes concentrações de formol: S = 0.04%; F = 0.5%; M = 0%; SL = 0%; Z = 1.64%. O método semi-quantitativo indicou o F e Z como positivos (concentração $\geq 0.2\%$). **Conclusão:** Os métodos são eficazes na quantificação de formol em produtos para alisamento capilar. Embora a legislação estabeleça o limite máximo permitido, verificou-se que nem sempre é cumprido.

Apoio: Faculdade ASCES.

Palavras-chave: Alisante capilar, análise de formol.



DESENVOLVIMENTO DE UM GEL GENGIVAL A PARTIR DO EXTRATO BRUTO SECO DE *PASSIFLORA EDULIS* SIMS

²T.R.S. BATISTA, R.F. SANTOS¹, A.F. MELO¹

¹Universidade Federal de Pernambuco UFPE, Recife

²Faculdade ASCES - Caruaru

Introdução: A erupção dentária é caracterizada pela movimentação dinâmica e contínua do dente durante a sua formação. Nesse estágio a criança apresenta febre, diarreia, irritabilidade, salivação excessiva, devido ao processo inflamatório que a acomete. Diante disso, por apresentar atividades analgésica, ansiolítica, antiinflamatória, o maracujá, *Passiflora edulis* L. foi selecionado para o desenvolvimento da formulação de um gel gengival que atenda os requisitos necessários para manutenção da estabilidade da fórmula. **Métodos:** Foram realizados estudos de estabilidade acelerada, com 24 horas, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias, em três condições, $\pm 40^{\circ}\text{C}$, $\pm 8^{\circ}\text{C}$ e temperatura ambiente, no gel base contendo o extrato. **Resultados e Discussão:** A formulação do gel de maracujá a 5% (p/p) apresentou excelente estabilidade em temperatura ambiente, mantendo praticamente inalteradas as características organolépticas, pH, viscosidade e espalhabilidade. **Conclusão:** Com os resultados, evidencia-se que o gel deve ser acondicionado em temperatura ambiente para manutenção de suas características, evitando situações de estresse de alta ou baixa temperatura.

Palavras-chave: Fitoterapia, Erupção dental, Inflamação, *Passiflora edulis*.



DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO NO PROCESSO DE IDENTIFICAÇÃO DOS INSUMOS FARMACÊUTICOS ATIVOS BENZINIDAZOL E CAPTOPRIL POR ESPECTROSCOPIA RAMAN NO LABORATÓRIO FARMACÊUTICO DO ESTADO DE PERNAMBUCO GOVERNADOR MIGUEL ARRAES (LAFEPE)

HAMANNA KORALYNA DE ARAÚJO LOPES¹, SEVERINO GRANGEIRO JÚNIOR², FERNANDA VERA CRUZ DE VASCONCELOS³.

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade Pernambucana de Saúde, Recife, 51.200-060, Brasil. Email: hamanndak@yahoo.com.br

²Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade Pernambucana de Saúde, Recife, 51.200-060, Brasil. Email: juniorgrangeiro@yahoo.com.br

³Laboratório Farmacêutico Governador Miguel Arraes (LAFEPE), Recife, 50.740-52, Brasil. Email: nandaveracruz@yahoo.com.br

Introdução: Os compêndios oficiais recomendam os métodos tradicionais para identificação de matérias-primas como: HPLC e MID. Apesar de eficientes, apresentam algumas desvantagens. E a espectroscopia Raman, surge como uma alternativa para eliminar essas desvantagens. **Metodologia:** Na montagem da biblioteca para as matérias-primas analisadas utilizando diferentes lotes aprovados pelo controle de qualidade do LAFEPE. Para realização das medidas foram otimizados os parâmetros: caminho óptico, tempo de exposição do laser e número de exposições. O espectro de referência foi obtido a partir da média de seis espectros, sendo os quatro espectros restantes utilizados para comparação e cálculo do coeficiente de correlação. O método desenvolvido foi validado segundo a RE 899/03. **Resultados e Discussão:** Os parâmetros de medida utilizados para o captopril e benznidazol foram: caminho óptico de 7,0 e 6,00 mm; tempo de exposição de 2,0s e 1,0 s; número de exposições de 4,0 e faixa espectral de 3030-200 cm^{-1} e 3278-200 cm^{-1} , respectivamente. As amostras apresentaram coeficiente de correlação maior que 0,99 corroborando com os resultados obtidos pelo método oficial, infravermelho médio. **Conclusão:** A partir desses resultados foi possível implantar a espectroscopia Raman na identificação de matérias-primas.

Apoio: LAFEPE, FPS e NUQAAPÉ.

Palavras-Chave: Raman, Identificação, Matérias-primas farmacêuticas.



DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLAR DE QUITOSANA COMERCIAL PARA USO FARMACÊUTICO

¹D.G.Oliveira, ¹A.R.S. Freitas, ¹B.P. Silva, ¹D.M.S Wanderley, ¹R. S. C. Lima

¹ Laboratório de Avaliação e Certificação de Biomateriais do Nordeste, Universidade Estadual da Paraíba.

Introdução: A quitosana é obtida a partir da desacetilação da quitina por processo de hidrólise básica. Conhecendo-se a massa atômica de uma substância, sabe-se também a sua massa molar. A produção industrial e o uso de quitina e seus derivados, principalmente a quitosana, encontra-se em constante crescimento por apresentar diversas aplicações biológicas. No mercado, podemos encontrar quitosana de marcas importadas e de marcas nacionais. Desta forma, este trabalho estabelece parâmetros de comparação entre o produto nacional sendo útil para pesquisadores e indústrias farmacêuticas. **Métodos:** Para a determinação da massa molar de quitosana foi seguida a norma: ASTM D2857. Viscosímetro utilizado foi o RHEOTEK RPV-1 PULP. Preparou-se uma solução polimérica com concentração de 1%. Depois de certo tempo a viscosidade intrínseca da solução foi obtida. **Resultados e discussão:** Através dos cálculos foi possível encontrar a massa molar viscosimétrica média das quitosanas A, que foi de 92,97 kda e B 54,94 kda. Segundo dados obtidos no rótulo, a quitosana B é denominada de alta densidade, sendo assim considerada de alto peso molecular, já a amostra A não apresentava critérios do fabricante em relação a sua molaridade. **Conclusão:** Levando em consideração os critérios de Wong, as amostra acima foram classificadas como de baixa massa molar, pois apresentaram valores inferiores a 150kda, contrariando assim as informações do fabricante da amostra B que a classifica como de alta massa molar.

Palavras-chave : Quitosana; Viscosidade; Massa molar.



ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA NO INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO ALBENDAZOL, DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE POR CLAE

¹R.C.L.A. Beltrão; ²B.A. Santos; ³A.K.M. Santana; ⁴F.P.M. Medeiros

Estudante do Curso de Farmácia do Programa Iniciação Científica de 2012/2013 (PIC/FPS) da Faculdade Pernambucana de Saúde (FPS), Recife, PE, Brasil. E-mail: rubiabeltrao@hotmail.com

²Farmacêutico Industrial da Coordenadoria de Pesquisa e Desenvolvimento do LAFEPE®.

³Tutora do Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos do Curso de Farmácia da FPS. Farmacêutica Industrial da Coordenadoria de Pesquisa e Desenvolvimento do LAFEPE®.

⁴Coordenadora do Curso de Farmácia da FPS. Farmacêutica Industrial da Coordenadoria de Pesquisa e Desenvolvimento do LAFEPE®.

RESUMO

Desenvolver e validar um método indicativo para estudo de estabilidade a partir da avaliação dos produtos de degradação do albendazol, nas condições forçadas de estresse hidrolítico e oxidativo. A metodologia utilizou CLAE com detector DAD. A coluna foi Gemini® (5µ;C18;110A; 250 x 4,6 mm) a 25°C. A validação seguiu a RE 899/2003, ANVISA. O ativo albendazol apresentou degradação de cerca de 80,0% na condição de hidrólise alcalina, após 30 dias. Foi totalmente oxidado sob peróxido a 3% após 48 horas. Manteve-se estável na hidrólise ácida, tanto a 0,1M, como a 1,0M e, também na hidrólise neutra. O método proposto como indicativo de estabilidade, é específico, linear e preciso segundo a Resolução 899, 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

INTRODUÇÃO

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) na resolução - RDC N° 45, de 09 de agosto de 2012, no artigo 36, publicou a determinação que os testes de degradação forçada nos insumos farmacêuticos ativos ajudam a identificar seus prováveis produtos de degradação e o procedimento analítico a ser adotado no estudo de estabilidade, sendo que a natureza dos testes depende do tipo de molécula a ser estudada¹.

O teste de estresse é definido como um teste de estabilidade para fármacos e medicamentos sob condições extremas. Este teste mostra-se como uma tendência dentro do planejamento para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica, pois a investigação da estabilidade intrínseca do fármaco fornece abordagens de formulação e indica tipos de adjuvantes, aditivos de proteção específicos e de acondicionamento, que, provavelmente, melhorarão a integridade do fármaco e do produto². Demonstrando-se

assim, que o conhecimento do comportamento químico pode ser usado para garantir a estabilidade da forma farmacêutica desejada. A estabilidade dos produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade, luz e de outros fatores relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas, de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagens².

Torna-se fundamental a execução desta etapa que antecede o desenvolvimento do comprimido revestido de albendazol que tem efeitos (ovocida, larvicida e vermicida) para tratamento das infecções por *Ascaris lumbricoides* muito comuns no Brasil³.

OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver uma metodologia analítica e validá-la para os produtos de degradação do albendazol.

MATERIAIS E MÉTODOS

Substâncias químicas: IFA: Albendazol, LAFEPE[®] L 16271, Fabricante FORMIL[®]; SQR Albendazol e Parbendazol (USP[®]). **Reagentes:** metanol; ácido sulfúrico; peróxido de hidrogênio; fosfato de amônio monobásico; ácido clorídrico; hidróxido de sódio; água purificada. **Equipamentos/Instrumentos:** Balança analítica; sonicador; bomba à vácuo; Sistema de cromatografia líquida Merck[®] Elite LaChrom, composto por bomba L-2130, amostrador L-2200, forno L-2300 e detector diode array L-2455, qualificado. Software Ezchrom Elite[®].

Condições cromatográficas: baseado na monografia do albendazol da Farmacopéia Americana (USP 34, pág 1772, 2011).

Preparo das amostras

Solução padrão misto (albendazol e parbendazol) e curva de linearidade: pesou-se de SQR de albendazol (20mg) e da SQR do parbendazol (30 mg) para balão volumétrico de 10mL. Alíquotas, de 0,5mL; 0,8mL; 0,9mL; 1,0mL; 1,1mL; 1,2mL; 1,5mL foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL e aferidos com metanol obtendo-se para o albendazol as concentrações de 100ppm, 160ppm, 180ppm, 200ppm (conc média), 220ppm, 240ppm e 300ppm e, para o parbendazol, as concentrações de 150 ppm, 240 ppm, 270 ppm, 300 ppm (conc média), 330 ppm, 360 ppm e 450 ppm.

Amostras sob estresse: pesou-se, em triplicatas autênticas, 100mg do IFA albendazol, o qual foi transferido para balão volumétrico de 50mL. Adicionou-se 5mL da solução de degradação em teste (NaOH, HCl, água, H₂O₂) e 20mL de metanol. Sonicou-se por 15 minutos. Completou-se o volume com a solução de degradação em teste. Em seguida, as amostras foram amostradas e analisadas em tempos específicos (0, 24, 48 e 72horas, 7dias, 15 dias e 30 dias). As amostras foram mantidas a temperatura ambiente, em frascos de vidro âmbar, e a solução de peróxido de hidrogênio, em recipiente fechado de plástico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudo de degradação forçada

O albendazol, após estresse alcalino a 0,1M, apresentou decaimento em torno de 75,00% em 30 dias, quando comparado a exposição no tempo zero. Para o estresse alcalino mais concentrado a 1,0M, confirmou-se a degradação do albendazol, porém esta degradação foi de 80,00% (figura 01). Para o albendazol, sob estresse ácido a 0,1M, o decaimento após 30 dias de exposição foi de aproximadamente 3,00%, quando comparado a exposição no tempo zero. Na condição de estresse ácido 1,0M foi confirmado esta degradação incipiente do albendazol, visto que o decaimento permaneceu sendo em torno de 3,00%, o que parece indicar estabilidade do IFA frente à condição ácida, quando comparada à hidrólise alcalina. Após estresse neutro, o albendazol não apresentou decaimento após 30 dias, apesar do aparecimento de pequenos sinais ao longo do cromatograma. O albendazol, após estresse oxidativo, apresentou decaimento após 24 horas de exposição em torno de 10,88%, quando comparado a exposição no tempo zero de amostragem. Essa amostra só foi analisada até 24 horas, pois após esse tempo não mais foi registrado o pico do albendazol.

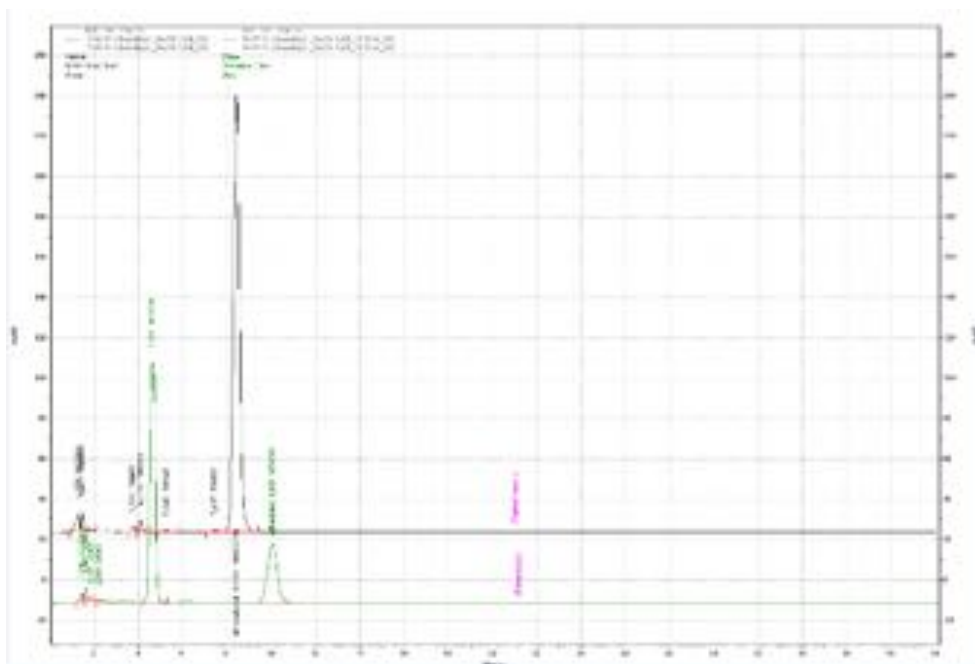


Figura 01: “Overlay” dos cromatogramas das amostras do albendazol em solução de hidrólise alcalina a 1,0M, no tempo zero e após 30 dias

Validação

O método foi linear para a solução de padrão misto (figura 02). A equação da reta para o albendazol foi $y = 93417x + 1E+06$ e $R^2 = 0,9934$ e para o parbendazol foi $y = 67074x + 1E+06$ e $R^2 = 0,9912$. O método foi preciso atendendo ao preconizado pela resolução com $CV < 5,0\%$. A especificidade do método foi observada com os estudos

de degradação forçada, os quais demonstraram a seletividade para quantificar o decaimento do albendazol e o registro de potenciais produtos de degradação, sendo estes identificados através do seu tempo de retenção relativo.

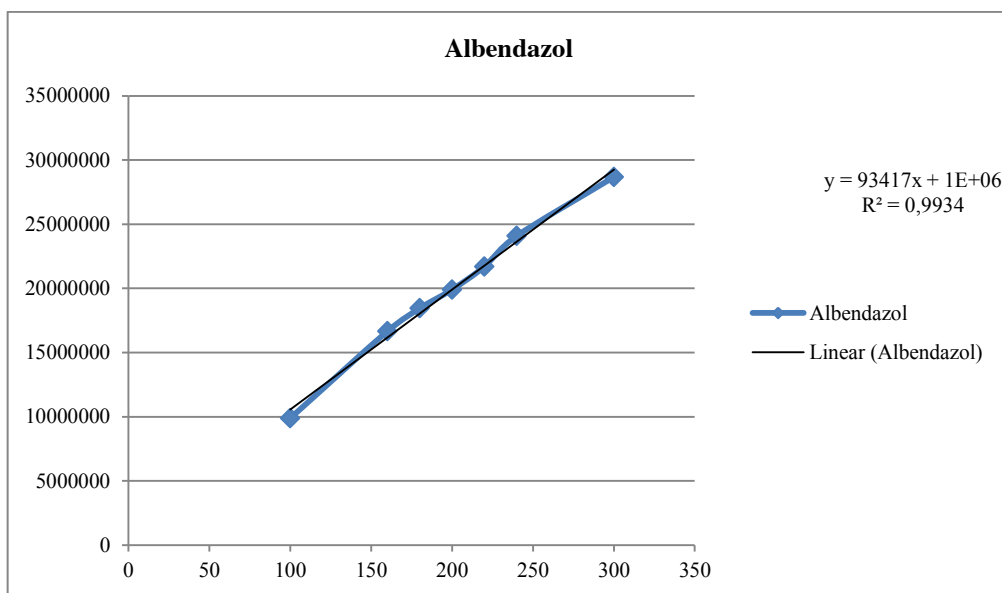


Figura 02: Avaliação da curva de linearidade para o Insumo Farmacêutico Ativo Albendazol

CONCLUSÕES

Foi desenvolvido um método indicativo para estudo de estabilidade a partir do insumo farmacêutico ativo albendazol, sob condições de hidrólise (ácida, alcalina e neutra), oxidação e protegidos da luz. O albendazol se mostrou sensível a condição de hidrólise alcalina, degradando 80% após 30 dias, no entanto, mostrou-se estável na hidrólise ácida e na hidrólise neutra. Após 24h, foi totalmente oxidado em solução de peróxido de hidrogênio a 3%. A validação está em andamento, conforme a RE nº 899, 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, já se apresentando linear, específico e preciso.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco “Governador Miguel Arraes” (LAFEPE) e a Faculdade Pernambucana de Saúde (FPS).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brasil, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária RESOLUÇÃO - RDC Nº 45, DE 9 DE AGOSTO DE 2012.

2. Brasil. Resolução nº 01, de 29 de julho de 2005. Guia para a realização de estudos de estabilidade. [Internet]. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Brasília, DF, Diário Oficial da União, 01 ago. 2005. [citado 2009 jun 25] Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18109&word>.

3. Guia de Bolso 11_06_2010.indd - Ministério da Saúde



IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE LORATADINA EM COMPRIMIDOS E XAROPES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

¹D.J.F. DE SOUZA, ²C.A. AZEVEDO FILHO, ³F.G. FREIRE, ⁴W.T.S. DE BRITO

¹Laboratório Central Química de Alimentos, Medicamentos e Suplementos, Núcleo de pesquisa em Nutrição Parenteral, Departamento de Nutrição e Farmácia, Universidade Federal de Pernambuco.

Diogo_fragoso@hotmail.com

²Laboratório Central Química de Alimentos, Medicamentos e Suplementos, Núcleo de Pesquisa em Nutrição Parenteral, Universidade Federal de Pernambuco, Faculdade ASCES.

^{3,4} Faculdade ASCES. Caruaru- PE, Brasil

RESUMO

Loratadina é um fármaco anti-histamínico indicado para o tratamento de alergias. Várias técnicas analíticas são utilizadas no seu controle de qualidade, dentre elas a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método por CLAE para quantificação da Loratadina em comprimidos e xaropes. A análise utilizou uma coluna C18 (150 x 4.6mm) e eluente tampão fosfato 0.05 mol.L⁻¹ pH 4.75 e metanol. Repetibilidade e precisão intermediária foram determinadas em dois dias a 100% da concentração e os resultados comparados com os valores dos rótulos. O método mostrou-se adequado para a análise quantitativa de Loratadina.

INTRODUÇÃO

Loratadina é um fármaco anti-histamínico, de segunda geração, antagonista dos receptores H1 que apresenta elevada potência e tempo de ação, e poucos efeitos adversos devido à baixa permeabilidade sobre a barreira hematoencefálica (GARCIA, 2005). É indicado para aliviar sintomas de reação de hipersensibilidade incluindo alergia crônica, rinite e urticária. Como medicamento, a loratadina apresenta-se somente em formulações de administração oral na forma de xarope e comprimido, utilizada como única substância ativa ou em associação com outros ativos (AMARO et al., 2007).

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método por CLAE para quantificação da Loratadina em comprimidos e xaropes.

MATERIAIS E MÉTODOS

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada na Central de Caracterização de Alimentos, Medicamentos e Suplementos (CQ-AMOS). O sistema cromatográfico utilizado foi um Shimadzu Prominence (Shimadzu), com um detector por arranjo de diodo (DAD) modelo SPD-20AV, bomba quaternária modelo LC-20 AT, forno modelo CTO-20AC, autoinjeter modelo SIL-20AC. O sistema foi controlado por um módulo controlador modelo CBM-20A e operado pelo *software* LC Solution™ (versão 1.25, Shimadzu). A eluição da loratadina foi realizada em uma coluna Zorbax SB C18 150mm × 4.6mm 3.5µm (Agilent). Os padrões e amostras foram monitorados em comprimentos de onda entre $\lambda = 190$ and 400nm. A fase móvel utilizada para análise da loratadina foi tampão fosfato 0.05 mol.L⁻¹ pH 4.75 e metanol 65:35 v/v, em eluição isocrática e tempo total de corrida de 5 min. O fluxo da corrida foi mantido em 1mL/min e a temperatura da coluna em 35°C. O volume da amostra injetado foi de 20µL.

A solução estoque da loratadina foi preparada dissolvendo 0,01g do padrão em 25 mL de metanol. A solução padrão (10µg/mL) foi obtida por diluição a partir da solução estoque e utilizada para realizar os testes de adequabilidade do método. Comprimidos e xaropes (um genérico e um similar de marca de cada forma farmacêutica. O pré-tratamento para a quantificação da loratadina em comprimidos foi conduzido da seguinte maneira: Pesou 10 comprimidos, calculando o peso médio a quantidade de loratadina de um comprimido; em seguida adicionados 4mL de HCL 0,05M e deixado sob constante agitação por 40 minutos, em um agitador magnético (modelo 752A - Fisatom); transferiu-se a preparação para um balão volumétrico de 10ml e completou-se o volume com metanol; desta solução preparada transferiu-se 1ml para balão volumétrico de 25ml. Completando o volume com metanol, filtrado (em membrana de 0,22µm de Teflon) e transferido 1 ml para um *vial*.

Para as amostras de xarope, agitou-se vigorosamente o frasco e transferiu-se 1mL (volume equivalente a 1mg) para um balão volumétrico de 25mL.

Para o desenvolvimento da metodologia analítica utilizou-se uma coluna de fase reversa e foram testadas diferentes composições de fases móveis a fim de obter separação e tempo de retenção satisfatório da loratadina. utilizando com fase móvel solução tampão fosfato 0,01M pH 3.0 – metanol na proporção 65:35 (v/v) e fluxo de 1 mL/min. A curva de calibração foi construída a partir de cinco pontos, em concentrações entre 1 e 106µg/mL. Os parâmetros de validação foram determinados seguindo as recomendações da ANVISA (2003), que compreende: linearidade, intervalo, limite de quantificação (LQ), repetibilidade e precisão intermediária.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros avaliados na determinação da loratadina foram precisão, e linearidade e presença do pico e tempo de retenção.

Segundo Brittain (2008), a linearidade do método corresponde à habilidade do mesmo em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame dentro de uma determinada variação, sendo que, a linearidade está relacionada com a variação da inclinação da reta de regressão. Abaixo, segue tabela com os resultados (equação da reta, R² e LQ).

Tabela 1: Resultados da linearidade do método indicativo para estudo de quantificação da Loratadina

SQR	Equação da reta	R ²	LQ (PPM)
Loratadina	$y = 43574X + 31650$	0,9997	0,001280

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra.. Na tabela 2, seguem os resultados da repetitividade.

Tabela 2. Valores de quantificação dos comprimidos e xaropes de loratadina.

	DIA 1				DIA 2			
	Comp Gen.	Comp Sim.	Xpe Gen.	Xpe Sim.	Comp Gen.	Comp Sim.	Xpe Gen.	Xpe Sim.
	9.44	9.42	1.03	1.01	9.5	10	0.97	0.98
	9.96	9.43	1.01	0.96	9.49	9.23	1.05	0.99
	10.24	10	1.08	0.97	9.34	9.21	1.06	0.97
Média	9.96	9.43	1.03	0.97	9.49	9.23	1.05	0.98
Desvio Padrão	0.41	0.33	0.04	0.03	0.09	0.45	0.05	0.01
Coefficiente de Variação (%)	4.08	3.52	3.50	2.73	0.94	4.88	4.70	1.02

As unidades dos comprimidos (Comp.) são dadas em mg. O valor de referência para os comprimidos é 10 mg.

As unidades dos xaropes (Xpe) são dadas em mg/mL. O valor de referência para os xaropes é 1mg/mL.

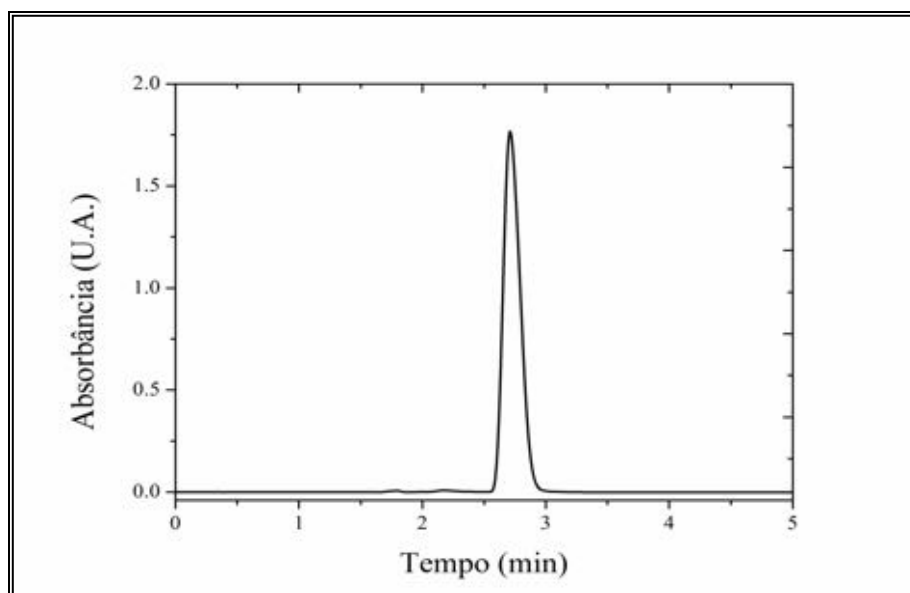
Gen = genérico. Sim = Similar de marca.

Estatisticamente para a repetibilidade foi apresentado um CV(%) = 0.94 e 4.88%. Esses valores mostram que o método foi preciso e apresentou alta repetibilidade, uma vez que o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas efetuadas nas mesmas condições apresentou coeficientes de variações abaixo de 5% em ambos os dias.

testes por ANOVA mostraram que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os resultados obtidos para comprimidos e xaropes genéricos e similares e as variações encontradas entre os valores dos rótulos e experimentais não foram significativas, uma vez que, os comprimidos de loratadina devem ter no mínimo 90,0% e no máximo 110,0% da quantidade declarada de loratadina. Para xaropes, esses valores devem ser no mínimo 94,0% e, no máximo 105,0% da quantidade declarada no rótulo.

As condições cromatográficas foram selecionadas para assegurar uma adequada separação da loratadina em condições isocráticas com baixo consumo de solventes. A Figura 1 mostra o cromatograma da loratadina na melhor condição de análise encontrada. O tempo de retenção médio registrado foi de $t_r = 2,74 \pm 0,00$ min.

Figura 1. Cromatograma da solução padrão de loratadina 10 μ g/mL



CONCLUSÕES

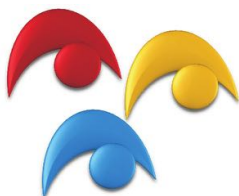
O método da análise da loratadina de acordo com a RE nº 899 (ANVISA), mostrou-se linear, preciso.

AGRADECIMENTOS

Ao CQ-AMOS do departamento de nutrição da UFPE, por disponibilizar o laboratório para realização das pesquisas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. TELLO, M. E., et. al. **VALIDACION DE LAS METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE TABLETAS DE LORATADINA**. Rev. Col. Cienc. Quím. Farm. No. 26, 43-47, (1997).
2. GARCÍA, A. L. **A DESARROLO Y VALIDACIÓN DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LORATADINA EM TABLETAS**. Guatemala, Febrero 2005.
3. AMARO, T. L. **MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN PARA EL ESTUDIO DE ESTABILIDADE DEL JARABE DE LORATADINA 0,1%**. Rev Cubana Farm v.41 n.1 Ciudad de La Habana ene.-abr. 2007.
4. RUPÉREZ, F.J., et al. **LC DETERMINACION OF LORATADINE AND RELATED IMPURITIES**. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 29 (2002) 35-41.
5. Shan-Yang LINA, S. A., et. al., **CURVE-FITTING FTIR STUDIES OF LORATADINE/HYDROXYPROPYL- β -CYCLODEXTRIN INCLUSION COMPLEX INDUCED BY CO- GRINDING PROCESS**. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Volume 53, Issue 3, 2 November 2010, Pages 799–803.
6. RIBANI, M., et. al. **VALIDAÇÃO EM MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E ELETROFORÉTICOS**. Quim. Nova, Vol. 27, No. 5, 771-780, 2004
7. ANVISA. Resolução RE 899 de 29 de maio de 2003
8. BRITTAIN, HG.. **VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS NÃO-CROMATOGRÁFICOS**. PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY, Vol 2, 4 – 9, Brasil, 2008.



VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE TANINOS TOTAIS EM EXTRATO SECO DE ESPINHEIRA SANTA (*Maytenus ilicifolia* Mart.) POR ESPECTROFOTOMETRIA UV/VIS

¹D.I.A.F. ARAÚJO, ²T.R.R. TIMÓTEO, ²T.M.A.S. MELO, ²J.R.A. ROCHA, ¹A.P.L.A. SILVA, ²T.S. SOUZA, ²H.M. ALVES, ²C.L.S. VIGO

¹Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba.

araujodiaz@yahoo.com.br

²Laboratório de Controle de Qualidade, Indústria Química e Farmacêutica Nacional.

Introdução: A *Maytenus ilicifolia* Mart. é conhecida popularmente como espinheira santa, cancerosa, maiteno, dentre outros. Pertence à família Celastraceae. Apresenta atividades tônica, analgésica, antisséptica, cicatrizante, diurética e laxativa. O seu principal uso medicinal é no tratamento de gastrites, úlceras e dispepsias. Em sua composição fitoquímica, destacam-se os terpenoides, taninos, flavonoides e alcaloides. **Métodos:** O extrato seco padronizado em 5% de taninos foi submetido ao processo de validação por espectrofotometria UV/VIS seguindo o princípio da metodologia descrita na monografia da espinheira santa na Farmacopéia Brasileira 5ª Ed. Foram avaliados os parâmetros especificidade, linearidade, precisão, intervalo, exatidão e robustez. **Resultados e Discussão:** O método foi linear ($r^2 > 0,993$) para o ácido pirogálico (0,0016 – 0,0024mg/mL), preciso (RSD <5%), específico com pico máximo de absorvância em 745nm, exato com recuperação nos três níveis de concentração propostos: 80% (101,75%), 100% (102,00%) e 120% (98,4%). E também apresentou robustez frente à variação de pH da solução estoque, temperatura de extração, fabricantes de solvente e comprimento de onda. **Conclusão:** O método submetido à validação é apropriado e reprodutível para a quantificação de taninos totais. O extrato seco de espinheira santa analisado apresentou resultados condizentes à sua especificação.

Palavras-chave: Validação, Espinheira Santa, Espectrofotometria.



**VALIDAÇÃO E DOSEAMENTO DE ÁCIDOS SESQUITERPÊNICOS TOTAIS
CALCULADOS COMO ÁCIDO VALERÊNICO EM EXTRATO SECO DE
VALERIANA (*Valeriana officinalis* L.) POR CLAE**

**¹D.I.A.F. ARAÚJO, ²T.R.R. TIMÓTEO, ²T.M.A.S. MELO, ²J.R.A. ROCHA,
¹A.P.L.A. SILVA, ²T.S. SOUZA, ²H.M. ALVES, ²C.L.S. VIGO**

¹Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba.

araujodiaz@yahoo.com.br

²Laboratório de Controle de Qualidade, Indústria Química e Farmacêutica Nacional.

Introdução: A *Valeriana officinalis* L. é conhecida popularmente como valeriana-comum e erva-dos-gatos. Pertence à família Valerianaceae. Apresenta atividades ansiolítica, anti-inflamatória, diurética, antiespasmódica e hipnótica. O extrato utilizado na terapia é obtido a partir das raízes da planta. Em sua composição fitoquímica, destacam-se o GABA, ácidos sesquiterpênicos (ácido valerênico, ácido acetoxivalerênico), valepotriatos (isovaltrato, valtrato), flavonoides (hesperidina) e alcaloides (valerianina). **Métodos:** O extrato seco padronizado em min. 0,8% de ácidos sesquiterpênicos foi submetido ao processo de validação por CLAE com fase móvel em modo isocrático, comprimento de onda 225nm, fluxo 1,0mL/min e temperatura de forno 40°C. Foram avaliados os parâmetros especificidade, linearidade, precisão, intervalo, exatidão e robustez. **Resultados e Discussão:** O método foi linear ($r^2 > 0,99$) para o ácido valerênico (0,024 – 0,036mg/mL), preciso (RSD < 5%), seletivo, exato com recuperação nos três níveis: 80% (99%), 100% (96%) e 120% (97%). E apresentou robustez frente à variação de pH da fase móvel, temperatura do forno, fluxo, coluna e composição da fase móvel. Como resultado do doseamento, obtivemos 0,88% de ácidos sesquiterpênicos. **Conclusão:** O método submetido à validação é apropriado e reprodutível para a quantificação dos ácidos sesquiterpênicos calculados como ácido valerênico. O extrato seco de valeriana analisado apresentou resultados condizentes à sua especificação.

Palavras-chave: Validação, CLAE, Valeriana.



3º Encontro Brasileiro
para Inovação Terapêutica

1º Workshop
Rede RISH
Rede de Inovação em Insumos
para Saúde Humana

II Workshop
Estabilidade de Fármacos
e Medicamentos

21 e 22/10/2013
Campus UFPE

23 a 25/10/2013
Dorisol Recife
Grand Hotel

Interligando competências científicas, tecnológicas e industriais em espaços de saúde

BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA



BIOPOLÍMERO DA GOMA DO CAJUEIRO (*ANACARDIUM OCCIDENTALE* L.) COMO POTENCIAL EXCIPIENTE FARMACÊUTICO

Í. M. M. RAMALHO, ²D. R. SILVA, ^{1,2}J. A. SILVA, ³T. NAGASHIMA JR,
^{1,2*}B. P. G. L. DAMASCENO

¹Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), Departamento de Farmácia, Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDCPF), 58429-600, Campina Grande-PB.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da UEPB, CCBS, 58429-600, Campina Grande-PB.

³Unidade Acadêmica de Saúde, UAS-CES, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité- PB, Brazil.
*bolivarpagd@pq.cnpq.br.

RESUMO

Os biopolímeros têm sido cada vez mais empregados na produção de diversas formas farmacêuticas. Uma fonte de extração de biopolímero é a resina do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.). O objetivo deste trabalho foi avaliar a goma de cajueiro como matéria-prima promissora para o uso farmacêutico. As etapas de extração e purificação da goma foram realizadas em solução aquosa até a obtenção de sal de sódio, que foi, posteriormente, liofilizada. A caracterização da goma de cajueiro foi feita por análises térmica (TGA-DTG) e das propriedades reológicas. Diante disso, a goma de cajueiro mostrou-se um potencial excipiente farmacotécnico com propriedades semelhante à goma arábica. Além de ser de fácil obtenção, extração, purificação e sem gerar resíduos para o meio ambiente.

INTRODUÇÃO

Polímeros naturais têm sido objeto de investigação por pesquisadores em todo o mundo, devido seu grande campo de aplicações, particularmente como substitutos de polímeros sintéticos, por eles apresentarem diversas vantagens, como baixo custo, baixa toxicidade, boa disponibilidade, excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade (TANG, DOU, SUN, 2006).

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é uma espécie extensivamente cultivada no Brasil, Índia, Kenia, dentre outros países. O exsudato produzido no tronco e galhos da árvore que consiste em um complexo de polissacarídeo/proteína, solúvel em água, com características físico-químicas semelhantes à goma arábica. Sendo uma alternativa para o uso farmacêutico/ cosmético, agindo como um aglutinador para cápsulas e comprimidos (BUDD, PAULA, HEATLEY, 1998).

O exsudato do cajueiro pode ser obtido naturalmente, por incisões no tronco e ramos da árvore ou por introdução de agentes químicos no tronco apresentando-se como

resina de coloração amarelada e solúvel em água (MENESTRINA et al., 1998). Sabe-se que os polissacarídeos naturais, como o exsudato do cajueiro, apresentam misturados a sua composição sais inorgânicos e outros materiais de baixo peso molecular e, também, substâncias como proteínas, ligninas e ácidos nucleicos (KENNEDY, WHITE, 1983). Logo, o processo de purificação para goma de cajueiro (GC) é fundamental, pois esta é constituída de unidades de galactose, arabinose, glicose, ácido urônico, manose e xilose, em proporção variável de acordo com a região geográfica e a época de extração (SARUBBO et al., 2007).

OBJETIVOS

Coletar a resina do cajueiro, extrair e purificar a goma do cajueiro para posterior caracterização das suas propriedades reológicas e térmicas.

MATERIAIS E MÉTODOS

A extração foi feita pela dissolução da resina em água, filtração, neutralização e precipitação da goma em solução etanol 70%/acetona PA. Esta foi purificada como um sal de sódio, posteriormente, liofilizada e calculado o seu rendimento pesando-se o material inicial (resina caju triturada) e o produto final correspondente à GC seca e pulverizada.

As curvas termogravimétricas (TG/DTG) foram obtidas em SDT Q600 da TA Instrument, usando cadinho de alumina, amostra com massa de 8mg, razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, no intervalo de temperatura de 35-900°C e em atmosfera de nitrogênio ($100\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$).

Quanto às propriedades reológicas utilizaram-se métodos diretos e indiretos para caracterizar o fluxo da GC. Calculou-se a densidade bruta e de compactação para determinação do Fator de Hausner (FH) e do Índice de Compressibilidade ou de Carr (IC). O índice de compactabilidade foi calculado por meio da diferença entre volumes ocupados após 10 e 500 quedas do volúmetro de compactação utilizando uma alíquota de 10 g. O ângulo de repouso foi determinado após escoamento de uma alíquota de 9g de resina purificada, através do método altura fixa de cone (GUYOT et al., 1995).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A goma obtida tinha aspecto de um pó branco, fino e seco, semelhante à cânfora, e o rendimento foi de $59,01 \pm 7,8\%$ (n=3).

Baseando-se nas curvas termogravimétricas e suas derivadas (TG/DTG) da resina e da goma de cajueiro em atmosfera de nitrogênio (Figuras 1), pode-se inferir que resina de caju e a goma purificada apresentam o primeiro estágio de decomposição próximo a 100°C ($125,95^{\circ}\text{C}$ e $70,73^{\circ}\text{C}$) e perda de massa igual a 11,93% e 2,864%, respectivamente.

Os segundo e terceiro estágios de decomposição, provavelmente é devido a despolimerização com formação de água, CO e CH_4 , ocorrendo em $284,64^{\circ}\text{C}$ e

314,76°C para a resina e 269,29°C e 320,85°C para a goma de cajueiro, semelhantes a Silva et al. (2007).

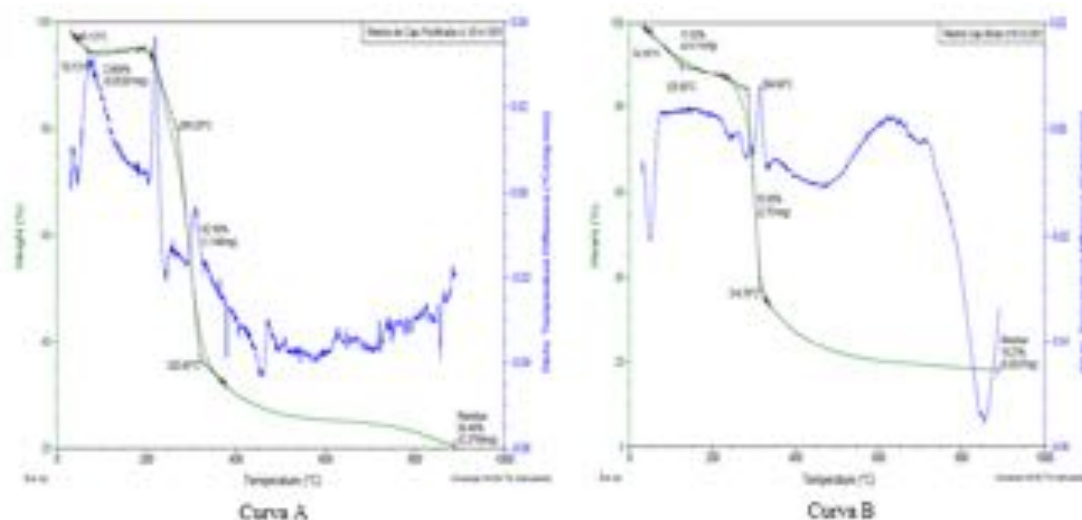


Figura 1 - Curvas de TG/DTG obtidas em atmosfera de nitrogênio: curva A da goma de cajueiro e curva B da resina de cajueiro.

As densidades médias bruta e de compactação do polímero foram $0,30 \pm 0,03$ g/mL e $0,45 \pm 0,04$ g/mL, respectivamente. O valor do FH para GC caracteriza-o como um pó de difícil compressão/compactação e o IC demonstra que a goma apresenta baixa tendência à fluidez (Tabela 1). O valor médio de compactabilidade encontrado foi de $43 \pm 2,08$ mL, caracterizando-o como um pó de difícil compactação. O ângulo de repouso encontrado para a goma foi de 23° , caracterizando-o como um pó de boas características de fluxo.

Tabela 1 - Propriedades reológicas da amostra da goma de cajueiro em pó extraída do exudato do cajueiro.

PROPRIEDADES	VALOR MÉDIO \pm DP
Densidade bruta (g/cm ³)	$0,3022 \pm 0,0315$
Densidade de compactação (g/cm ³)	$0,4571 \pm 0,0417$
Índice Carr (%)	$51,43 \pm 2,36$
Índice de compactabilidade (mL)	$4,3 \pm 2,08$
Fator de Hausner	$1,5 \pm 0,02$
Ângulo de repouso (°)	$23 \pm 3,6$

DP: Desvio Padrão da média (n=3).

CONCLUSÕES

Desta forma, a goma do cajueiro é um material de baixa densidade, com propriedade deficiente de compactação/compressão e propriedades de fluxo livre.

Sugerindo que ela pode ser usado como aglutinante na produção de formas farmacêuticas sólidas, sendo uma alternativa para a produção destas, uma vez que suas características farmacotécnicas são comparadas às da goma arábica. Além disso, é um polímero natural, biodegradável, estável, barato e de fácil cisalhamento, disponível a partir de recursos renováveis agrícolas abundante no Brasil.

AGRADECIMENTOS

Aos PROPESQ-UEPB, CAPES, CNPq pelo suporte financeiro para o desenvolvimento deste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BUDD, P.M.; PAULA, R.C.M.; HEATLEY, F. Characterization of *Anacardium occidentale* Exudate Polysaccharide. **Polymer International**, v.45, n.1, p.27-35, 1998.

SILVA, E.C.; PAOLA, M.V.R.V; MATOS,J.R.M. Análise térmica aplicada à cosmetologia. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 3, p.347-356, 2007.

GUOYT,J.C. et al. Commentaires relatives aux methods generals d'analyse des forms orales solids récemment introduits dans les pharmacopées françoise et européenne. Rapport d'une commission. SFSTP.**STP Pharma Pratiques**, v.5,n.6,p.-482-494,1995.

KENNEDY, J.F.; WHITE, C.A. **Chemistry, Biochemistry and Biology**. London: Ellis Horwood, 1983. cap. 4.

MENESTRINA, J. M. et al. Similarity of monosaccharide, oligosaccharide and polysaccharide structures in gum exudate of *Anacardium occidentale*. **Phytochemistry**, v. 47, p. 715-721, 1998.

SARUBBO, L.A. et al. A goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) como sistema inovador de extração líquido-líquido. **Exacta**, v.5, p.145-54, 2007.

TANG, M; DOU,H; SUN,K. One-step synthesis of dextran-based stable nanoparticles assisted by self-assembly. **Polymers**, v. 47.p. 728–734, 2006.



DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROEMULSÕES BICONTÍNUAS PARA USO TÓPICO

¹N.E.S SILVA, ¹Y.B.G PATRIOTA, ¹G.P GUIMARÃES G.P, ^{1,2}J.A. SILVA,
^{1,2*}B.P.G.L DAMASCENO

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), 58429-600, Campina Grande-PB.

² UEPB, CCBS, Departamento de Farmácia, Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDCPF), 58429-600, Campina Grande-PB.

[*bolivarpqld@pq.cnpq.br](mailto:bolivarpqld@pq.cnpq.br); natan.farmacia@gmail.com

RESUMO

Novas formas farmacêuticas tem sido buscadas a fim de facilitar e otimizar o uso de fármacos que possuem limitações farmacocinéticas e/ou farmacodinâmicas. Devido a sua versatilidade e estabilidade, as microemulsões vem ganhando destaque. Neste trabalho objetivou-se o desenvolvimento, caracterização e avaliação da estabilidade de um sistema microemulsionado. As formulações microemulsionadas foram obtidas a partir da produção de diagramas de fase pseudo-ternário e submetidas à avaliação de estabilidade preliminar e parâmetros físico-químicos. As microemulsões bicontínuas obtidas se mostraram estáveis e compatíveis com a administração tópica. Concluindo-se que as formulações propostas possuem potencial futuro para a terapêutica.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos está bastante em evidência, pois estes sistemas apresentam várias vantagens. Entre elas, podem aumentar a adesão de pacientes em relação às vias parenteral e tópica, além de proporcionar uma farmacocinética mais adequada (KAYSER et al, 2003).

Destacam-se as microemulsões (ME) por apresentarem excelente taxa de penetração em camadas profundas do estrato córneo quando comparadas a formulações convencionais, sendo consideradas como sistema terapêutico nanotecnológico bastante promissor na permeação e direcionamento eficiente de fármacos através da pele (SILVA et al, 2010).

Estruturalmente, existem três tipos de ME: óleo em água (O/A), água em óleo (A/O) e bicontínuas. Nas ME do tipo bicontínuas, os componentes lipofílicos e hidrofílicos se caracterizam por canais adjacentes alongados com nanogotículas contendo volumes semelhantes entre a fase aquosa e oleosa. Estes tipos estruturais de microemulsões podem ser utilizadas como sistemas transportadores de fármacos, tanto hidrofílicos quanto lipofílicos (FORMARIZ et al, 2005).

OBJETIVOS

No presente trabalho objetivou-se desenvolver e caracterizar microemulsões bicontínuas para uso tópico local.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a produção dos diagramas de fase pseudo-ternário (DFPT), Cremophor® EL (tensoativo) e álcool etílico (cotensoativo) foram misturados nas proporções 10:0 e 9:1, respectivamente, seguindo da adição de miristato de isopropila (MI) nas proporções de 1:9 à 9:1 à cada proporção de tensoativos. Volumes fixos de água foram adicionado com pipeta automática a temperatura ambiente. A cada adição de água o sistema foi submetido a um ciclo de 1 min em sonicação e 3 min em banho de ultrassom. A transição de fases entre os sistemas foi analisada macroscopicamente contra um fundo preto. Para os sistemas selecionados, foram analisados pH e condutividade.

A análise da estabilidade das formulações foi avaliada conforme o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (BRASIL, 2004) e o Guia para Realização de Estudos de Estabilidade (ANVISA, 2005), contemplando os ensaios de centrifugação (89, 559, 1095, 2236 e 4382 g), ciclo quente/frio (6 ciclos de 48h- 24h na geladeira/24h na estufa) e o estresse térmico (40°C a 80°C).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 ilustram os DFPT obtidos neste estudo, utilizando as proporções 10:0 e 9:1 de tensoativo:co-tensoativo.

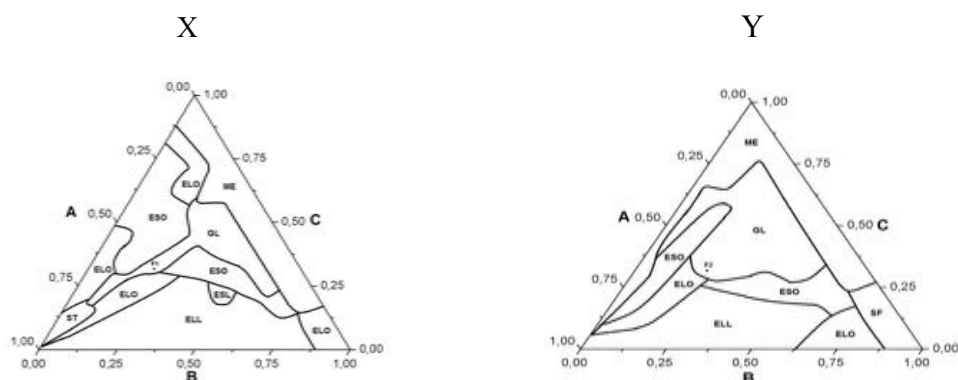


Figura 1 - Diagramas de fase pseudo-ternário contendo água (A), miristato de isopropila (B) e a mistura de tensoativos (C) na proporção de 10:0 (X) e 9:1 (Y) de Cremophor® EL e álcool etílico, no qual ESO (Emulsão semi-sólida opaca), ELO (Emulsão líquida opaca), ELL (Emulsão líquida leitosa), ME (Microemulsão), GL (Microemulsão gel-like) e SF (Separação de fases).

A partir desses diagramas pode-se selecionar a região desejada, bem como estabelecer a proporção para as duas formulações (F1 e F2) contendo 21,2% de MI,

47,1% de água e 31,7% de Cremophor[®] EL para a F1 e 28,5% de Cremophor[®] EL e 3,2% de álcool etílico para F2.

A Tabela 1 apresenta os resultados da determinação do pH e da condutividade elétrica das formulações.

Tabela 1 -Análise de pH e condutividade elétrica das formulações F1 e F2:

Formulação	Parâmetro físico- químico	
	pH	Condutividade (σ)
F1	6,31 \pm 0,03	49,46 \pm 0,19
F2	6,41 \pm 0,04	36,23 \pm 0,03

De forma geral, o pH ideal de uma formulação é padronizado de acordo com o pH de estabilidade dos componentes ativos utilizados e o de tolerância biológica, que para produtos cutâneos varia de 5,5 a 8,0 (SILVA et al, 2010). O pH final das formulações F1 e F2 encontra-se dentro da faixa de compatibilidade cutânea (Tabela 1). Nas formulações propostas, os valores de condutividade elétrica obtidos eram esperados devido à proporção de água (47%) no sistema.

Em todos os ensaios de estabilidade preliminar (centrifugação, estresse quente/frio e estresse térmico) as formulações permaneceram estáveis, não sofrendo danos como turvação do sistema ou separação de fases.

CONCLUSÕES

Os DFPT produzidos possibilitaram a seleção de pontos mais adequados para o desenvolvimento de formulações compatíveis com o uso tópico local, mostrando que estes sistemas têm um grande potencial a incorporação de fármacos e serem realizados estudos mais aprofundados para serem uma alternativa farmacêutica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA, Resolução RE n. 1, de 01 de agosto de 2005. **Guia para realização de estudos de estabilidade**. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 13 de novembro de 2012.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília: ANVISA, 2004. p.21-22.

FORMARIZ, T.P; URBAN, M.C.C.; JÚNIOR, A.A.S.; GREMIÃO, M.P.D.; OLIVEIRA, A.G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 03, p. 301 – 313, jul./set. 2005.

KAYSER, O.; OLBRICH, C.; YARKEY, V.; KIDERLEN, A.F.; CROFT, S.L. Formulation of amphotericin B as nanosuspension for oral administration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 254, p.73-75, 2003.

LAWRENCE, M.J.; REES, G.D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.45, n.1, p.89-121, 2000.

SILVA, J.A.; APOLINÁRIO, A.C.; SOUZA, M.S.R.; DAMASCENO, B.P.G.L.; MEDEIROS, A.C.D. **Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas**. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v. 31, n. 3, p.125-134, 2010.



DETECÇÃO IMPEDIMÉTRICA DE AFLATOXINA B1 ATRAVÉS DO USO DE FILMES AUTOMONTADOS DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

^{1,*} E. P. SIMÃO, ^{1,2}G. J. L. DA SILVA,
¹M. D. L., OLIVEIRA, ^{1,2}C. A. S. ANDRADE

¹Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco. *estefani_p_s@hotmail.com

²Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco

RESUMO

No presente trabalho foi descrito o desenvolvimento de um imunossensor para detecção de aflatoxina B1 baseado em anticorpos monoclonais anti-AFB1 quimicamente ligadas em SAM de cisteína (Cys). O sistema cisteína-carbodiimida:n-hidroxisuccinimida (Cys-EDC:NHS) foi utilizado para promover imobilização do anticorpo anti-aflatoxina B1 (AAFB1) ao eletrodo. A modificação do eletrodo foi caracterizada através das técnicas de voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). As medidas de VC e EIE mostraram que a ligação da aflatoxina B1 (AFB1) ao imunossensor promove à formação de uma camada isolante na superfície do eletrodo que gera um bloqueio a passagem de elétrons na interface eletrodo/solução. Em adição, o imunossensor apresentou uma boa sensibilidade e especificidade, sendo um dispositivo útil na identificação de AFB1.

INTRODUÇÃO

Os biossensores são dispositivos que possuem o objetivo de produzir um sinal eletrônico proporcional em magnitude e/ ou frequência à concentração do analito que interagem com o elemento biossensível (VELASCO-GARCIA e MOTTRAM, 2003). Imunossensores utilizam anticorpos imobilizados a um transdutor (LUPPA, et al, 2001). Na construção de biossensores têm sido empregadas modificações químicas no eletrodo, como monocamadas automontadas (SAM) de cisteína, com o objetivo de promover uma ligação estável entre os anticorpos e transdutor (MOCCELINI, 2011).

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) por ser um método simples, específico, sensível tem sido utilizada na construção de biossensores. Esta técnica consiste na aplicação de um potencial AC entre os eletrodos dispostos em uma amostra e na mensuração da corrente elétrica resultante. Em adição, pode-se evidenciar que a técnica de voltametria cíclica (VC) também é uma ferramenta que nos fornece informações da interface do eletrodo modificado biologicamente, permitindo deste modo o acompanhamento da taxa de transferência de carga entre o eletrodo e a solução que o rodeia (YANG et al, 2001).

As aflatoxinas (AFB) são um grupo de micotoxinas produzidas naturalmente pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. A AFB1 é a mais tóxica das AFB, sendo encontrada principalmente em amendoim e milho. Esta micotoxina

apresenta propriedades carcinogênica, teratogênica, imunossupressora, sendo o seu estudo de grande interesse em garantir a saúde humana e dos animais (LAZZARI, 1993). Desta forma, no presente trabalho foi desenvolvido um imunossensor impedimétrico baseado em SAM de anticorpo monoclonal anti-AFB1 quimicamente ligado ao aminoácido cisteína (Cys).

OBJETIVO

Desenvolver um imunossensor baseado em camadas automontadas de anticorpo monoclonal anti-AFB1 ligado a cisteína para detecção de aflatoxina B1.

MATERIAIS E MÉTODOS

Modificação da superfície do eletrodo

2 μ L de 25mM de Cys diluída em tampão fosfato foram adicionadas a superfície do eletrodo de ouro. Posteriormente, sobre o eletrodo modificado com Cys, foram depositados 0.4M de carbodiimida (EDC) e 0.1M de N-hidroxisuccinimida (NHS) numa proporção de 1:1. Em seguida, 2 μ L de uma solução do Anti-AFB1 (AAFB1) foi depositada na superfície do eletrodo. Para bloquear os sítios ativos remanescentes foi adicionada a superfície do eletrodo soroalbumina bovina.

Medidas de Impedância eletroquímica

As medidas eletroquímicas foram realizadas numa solução de 10mM de ferro-ferricianeto de potássio (1:1) em NaCl numa faixa de frequência entre 100 mHz a 100 KHz com o potencial de amplitude alternada de 10 mV.

Medidas de Voltametria Cíclica

Os experimentos de VC foram realizados após cada etapa da montagem do eletrodo na presença de uma solução de 10mM de ferro-ferricoaneto de potássio (1:1) como indicador redox em NaCl.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Fig. 1a demonstra os voltamogramas cíclicos do biossensor para detecção de AFB1 após cada passo de montagem do sistema. É possível visualizar no gráfico que a formação da camada automontada de Cys sobre a superfície do eletrodo de ouro promove uma redução nas correntes de pico anódica (ipa) e catódica (ipc). Em seguida, a adição de EDC:NHS ao eletrodo modificado com Cys, acarreta em um aumento da resposta amperométrica. Após a imobilização do AAFB1 ao eletrodo modificado com Cys-EDC:NHS, e adsorção de BSA foi observada a interação com AFB1. Essa sequência de reações promove uma diminuição dos ipa e ipc e um aumento na separação dos picos. Essas alterações na forma das curvas correspondem a mudanças ocorridas no processo de transferência de elétrons na interface eletrodo/solução.

No diagrama de Nyquist, o diâmetro do semicírculo corresponde à resistência de transferência de carga (R_{ct}). Na Fig. 1b podemos visualizar que o reconhecimento da AFB1 pelo imunossensor promove um crescimento bastante expressivo no diâmetro do semicírculo e conseqüentemente aumento R_{ct} . Este processo é devido a biointeração específico do anticorpo ao seu antígeno.

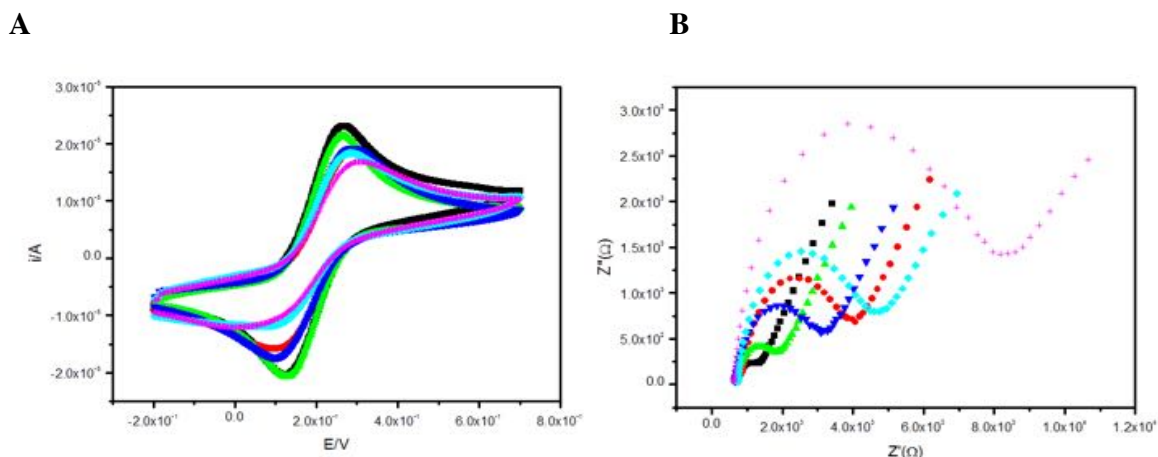


Figura 1. Voltamograma cíclico (A) e Diagrama de Nyquist (B). Legendas: eletrodo de ouro limpo(■); cys (●); cys-EDC:NHS(▼); cys-EDC:NHS-AAFB1(▲); cys-EDC:NHS-AAFB1-BSA(◆); cys-EDC:NHS-AAFB1-BSA-AAFB1(+).

CONCLUSÕES

No presente trabalho foi desenvolvido um imunossensor para detecção de aflatoxina B1. O sistema Cys-EDC:NHS-AAFB1-BSA foi capaz de detectar a AFB1, demonstrando uma boa sensibilidade e especificidade. Desta forma, o sistema biossensível proposto constitui uma ferramenta valiosa na análise da micotoxina AFB1.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, FACEPE e CAPES por fomentar o desenvolvimento desta pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

LAZZARI, F. A. 1993. Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade se sementes, grãos e rações, Curitiba: edição do autor. 140p.

LUPPA, P. B.; SOKOLL, L. J.; CHAN, D. W. Imunosensors – principles and applications to clinical chemistry. Clinica Chimica Acta. v. 314, p. 1-26, 2001.

MOCCELINI, S. K. Sensores modificados com monocamadas autoorganizadas de tióis para determinação de dopamina, tiodicarbo e catequina. 2011. 138p. Tese. Universidade Federal de Santa Catarina.

VELASCO-GARCIA, Maria N.; MOTTRAM, Toby. Biosensor Technology addressing Agricultural Problems. Biosystems Engineering. v. 84, n.1, p. 1-12, 2003.

YANG, W.; GOODING, J.J.; HIBBERT, D. B. Characterisation of Gold Electrodes Modified with Self Assembled Monolayers of L-Cysteine for the Adsorptive Stripping Analysis of Copper. Journal of Electroanalytical Chemistry.v. 516, p. 10-16, 2001.



IMUNOSSENSOR NANOESTRUTURADO BASEADO EM NANOPARTÍCULAS DE OURO MODIFICADAS COM CISTEÍNA PARA DETECÇÃO DE AFLATOXINA B1

^{1,2}G. J. L. DA SILVA, ¹M. D. L., OLIVEIRA, ^{1*}E. P. SIMÃO, ^{1,2}C. A. S.
ANDRADE

¹Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco. * estefani_p_s@hotmail.com

²Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco

RESUMO

Este trabalho descreve o desenvolvimento de um imunossensor para detecção de aflatoxina B1 (AFB1). O sistema ácido mercaptobenzóico-nanopartículas de ouro modificadas com cisteína (APB-NPsAuCys) foi utilizado como suporte para a imobilização do anticorpo anti-aflatoxina B1 (AcAFB1) ao eletrodo. A modificação do eletrodo foi avaliada através das técnicas de voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). As medidas de VC e EIE mostraram que a detecção de AFB1 pelo imunossensor gera um bloqueio à passagem de elétrons na interface eletrodo/solução. Adicionalmente, o imunossensor demonstrou uma excelente capacidade de detecção da AFB1, representando uma ferramenta valiosa no controle de qualidade de alimentos.

INTRODUÇÃO

Os imunossensores são dispositivos analíticos que incorporam um anticorpo conectado ao um transdutor. O princípio de funcionamento baseia-se na interação antígeno/anticorpo que produz um sinal elétrico que é proporcional à concentração do antígeno. Bioensaios baseados em imunossensores são bastante atrativos, pois apresentam diversas vantagens rapidez, baixo custo, possibilidade de miniaturização (FANG et al, 2010).

A voltametria cíclica (VC) é uma técnica utilizada para adquirir informações qualitativas sobre processos eletroquímicos (BRETT e BRETT, 1996). Dados adicionais podem ser fornecidos através da espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), pois a EIE constitui um método simples, específico, sensível e tem sido utilizada na construção de imunossensores. Esta técnica consiste em um processo faradáico onde a transferência de carga ocorre através de uma interface (BONANNI e del VALE, 2010). Na construção de sistemas biossensíveis têm sido utilizados materiais nanométricos com a finalidade de melhorar a biocompatibilidade, aumentar a área superficial e consequentemente a resposta eletroquímica do eletrodo. Desta forma, as nanopartículas

de ouro modificadas quimicamente têm sido alvo de estudos. No presente trabalho nós utilizamos nanopartículas de ouro modificadas com cisteína (NPsAu-Cys).

AFB1 é uma micotoxina produzida principalmente pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, sendo encontrada especialmente em amendoim e milho. A AFB1 é considerada a mais tóxica de todas as aflatoxinas e apresenta propriedades carcinogênica, teratogênica, mutagênica, imunossupressora, sendo reconhecida pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) como um carcinógeno humano (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1993).

OBJETIVOS

O presente trabalho apresenta como objetivo o desenvolvimento de um imunossensor baseado em NPsAuCys modificadas com anticorpo monoclonal para a detecção de aflatoxina B1.

MATERIAIS E MÉTODOS

A cisteína, aflatoxina B1, imunoglobulina e albumina de soro bovino (BSA; 98% de pureza) foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). Todos reagentes e solventes são de grau analítico.

Medidas de Impedância eletroquímica

As medidas eletroquímicas foram realizadas numa solução de 10mM de ferro-ferricianeto de potássio (1:1) em NaCl numa faixa de frequência entre 100 mHz a 100 KHz com o potencial de amplitude alternada de 10 mV.

Medidas de voltametria cíclica

Os experimentos de VC foram realizados após cada etapa da montagem do eletrodo na presença de uma solução de 10mM de ferro-ferricianeto de potássio (1:1) como indicador redox em NaCl.

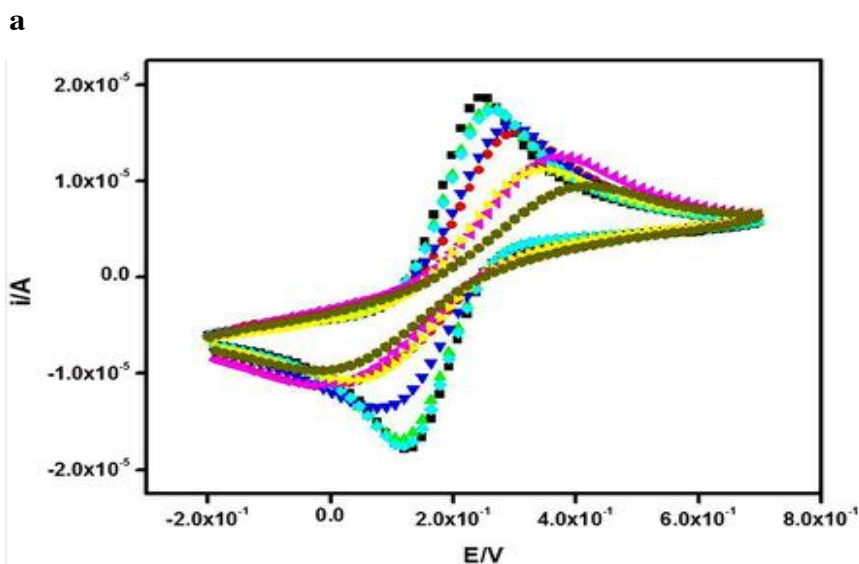
Preparação da NpsAuCys e sistema biossensível

Inicialmente, o eletrodo de ouro foi limpo utilizando uma solução de hipoclorito de sódio e posteriormente lavado com água ultrapura. O composto NpsAuCys foi obtido de acordo com Oliveira et al (Oliveira et al, 2011). 25µl de uma solução de cisteína (10^3 M) foi misturada com 450 µl de NpsAu por 12 h. Posteriormente, foi realizado a modificação química do eletrodo de ouro adicionando 2µl de cada reagente no intervalo de 15 min cada, na seguinte ordem: ácido mercaptobenzóico (APB) (5%); 0.4M de carbodiimida (EDC) e 0.1M de N-hidroxissuccinimida (EDC:NHS); NpsAu-Cys; EDC:NHS; anticorpo anti-aflatoxina B1 (100µg/ml); BSA (10%). Após a obtenção do sistema biossensível NPsAuCys-AcAFB1, 4µl de AFB1 (20µg/ml) foi adicionado a superfície do eletrodo modificado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas análises de VC o processo de transferência de elétrons do ferro-ferricianeto de potássio é uma valiosa ferramenta para monitorar todo o processo de fabricação do eletrodo. Na Fig. 1a pode-se observar as alterações no formato das curvas a cada passo de modificação do eletrodo. A primeira etapa de modificação do eletrodo consiste na adição de APB, que promove uma diminuição dos picos de corrente anódica (ipa) e catódica (ipc), em seguida a adição de EDC:NHS gera um aumento dos picos. A adição das NPsAuCys gera novamente uma diminuição da resposta amperométrica do sistema como pode ser observado no gráfico. Após a imobilização do AcAFB1 ao eletrodo modificado com APB-NPsAuCys e em seguida incubação com BSA foi observada uma diminuição gradativa da resposta amperométrica do sistema. Além disso, é possível observar na Fig.1a o processo de interação do biosistema APB-NPsAuCys-AcAFB-BSA com AFB1, onde é evidenciada uma diminuição acentuada dos ipa e ipc, seguida de uma separação dos picos após o processo de reconhecimento.

A EIE é uma técnica que permite investigar processos de interação entre diferentes moléculas através das mudanças nas propriedades elétricas da superfície em estudo. Na EIE o diâmetro do semicírculo corresponde à resistência de transferência de carga (R_{ct}). Na Fig. 1b, podemos visualizar que após a interação do imunossensor à AFB1 foi observado um aumento significativo no R_{ct} . Este fenômeno é decorrente do processo de interação específica entre anticorpo-antígeno na superfície do eletrodo, o que gera um bloqueio na passagem de elétrons na superfície do eletrodo. Desta forma, os resultados obtidos estão de acordo com os dados de VC e demonstram que o imunossensor foi capaz de reconhecer a AFB1 através das análises de VC e EIE.



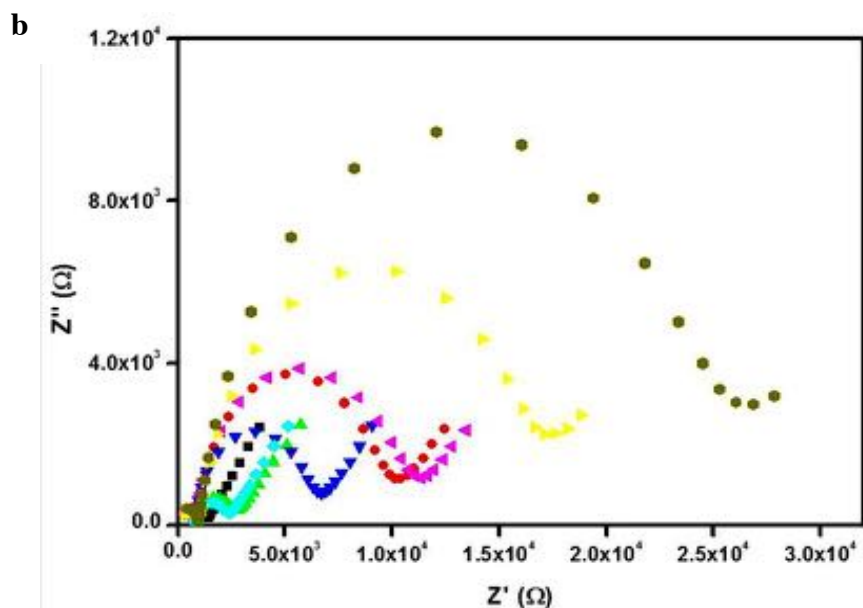


Figura 1 – Voltamograma cíclico (a) e diagrama de Nyquist (b) do eletrodo limpo (■), APB (●), APB-EDC:NHS (▲), APB-NPsAuCys (▼), APB-NPsAuCys-EDC:NHS (◆), APB-NPsAuCys-AcAFB1 (◄), APB-NPsAuCys-AcAFB-BSA(►), APB-NPsAuCys ED-AcAFB-BSA-AFB1 (●).

CONCLUSÕES

No presente trabalho, foi desenvolvido um imunossensor para detecção da micotoxina, AFB1. VC e EIE foram utilizadas para avaliar o processo de construção do biossensor sendo evidenciada uma diminuição da resposta amperométrica e aumento na Rct. O sistema APB-NPsAuCys-AcAFB-BSA foi capaz de detectar a AFB1, e desta forma, pode ser uma ferramenta útil no controle de qualidade de alimentos.

AGRADECIMENTOS

FACEPE, CNPq e CAPES.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BONANNI, A., DEL VALLE, M. Use of nanomaterials for impedimetric DNA sensors: A review. *Analytica Chimica Acta*. v. 678, n. 1, p. 7-17, 2010.

BRETT, A. M. O., BRETT, C. M. A. Cyclic Voltammetry and Linear Sweep Techniques. *Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications*. Oxford University Press, 1996, Cap. 9, p. 174.

FANG, X.; TAN, O. K.; TSE, M. SIU; OOI, E. E. A label-free immunosensor for diagnosis of dengue infection with simple electrical measurements. *Biosensors and Bioelectronics*. v. 25, p. 1137–1142, 2010.

International Agency for Research on Cancer, IARC Monogr. Evaluations Carcinog. Risks Humans. IARC Lyon. v. 56, p.489, 1993.

OLIVEIRA, M. D. L; ANDRADE, C. A. S.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B; SLINGH, P. R.; ZENG, X. Impedimetric biosensor based on self-assembled hybrid cystein-gold nanoparticles and CramoLL lectin for bacterial lipopolysaccharide recognition. *Journal of Colloid and Interface Science*. v. 362, p. 194-201, 2011.



MICROPARTÍCULAS DE DICLOFENACO DE SÓDIO A BASE DE ACETATO DE CELULOSE DA *Opuntia ficus indica* (L) Miller: SISTEMA POLIMÉRICO PROMISSOR PARA INCORPORAÇÃO DE FÁRMACOS

¹I.M.M. RAMALHO, ²J.P.T. MALHEIRO, ¹E.E.P. SANTOS, ^{1,2}J.A SILVA, ^{1,2}B.P.G.L DAMASCENO.

¹UEPB, CCBS, Departamento de Farmácia, Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDCPF), 58429-600, Campina Grande-PB.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), 58429-600, Campina Grande-PB.
bolivarpqld@pq.cnpq.br e izola.ramalho@hotmail.com

RESUMO

A utilização de micropartículas poliméricas como sistema carreador ou modificador de liberação de fármacos tem favorecido avanços importantes na área farmacêutica. Este estudo teve como objetivo produzir uma matriz polimérica, utilizando acetato de celulose obtido a partir da *Opuntia ficus indica* (L.) Miller. As micropartículas vazias e com fármaco foram produzidas por emulsificação/evaporação de solvente. O sistema foi avaliado quanto à morfologia, perfil de cristalinidade e resistência à erosão. Os resultados mostraram um sistema microparticulado esférico, com rugosidades na superfície, estável na forma de pó ou em suspensão, resistente a erosão e com características amorfas. Observa-se, portanto, que o sistema foi viável e apresenta boas perspectivas para aplicações biofarmacêuticas.

INTRODUÇÃO

Uma ampla variedade de sistemas, visando oferecer proteção, otimizar a velocidade e o local de liberação dos fármacos, tem sido objeto de pesquisa na área farmacêutica (STORPIRTIS et al., 2011). Estes Novos Sistemas de Liberação de Fármacos (NDDS) oferecem inúmeras vantagens quando comparados a formas convencionais de administração, incluindo a proteção dos fármacos veiculados no núcleo, biocompatibilidade, redução na toxicidade, melhor perfil de liberação e de eficiência terapêutica (RODRIGUES FILHO, G. et al., 2011).

De maneira particular, a utilização de micropartículas é opção interessante como sistema matricial para vetorização de fármacos, pela facilidade de obtenção e versatilidade. Diferentes polímeros vêm sendo investigados como matrizes para produção destes sistemas, e um dos aspectos de maior importância na sua produção é o material de partida empregado (ASSUNÇÃO, R. M. N. et al., 2011).

Dentre os derivados celulósicos, o acetato de celulose assume grande importância econômica e industrial. É obtido pela substituição dos grupos hidroxila das unidades de glicose, da celulose, por grupos acetila em uma reação que utiliza ácido

acético, anidrido acético na presença de ácido sulfúrico (FISCHER S. et al., 2008; BRUM, S. S. et al., 2012).

Neste trabalho, o acetato de celulose foi obtido a partir da celulose extraída da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* (L.) Miller), uma cactácea amplamente cultivada nas zonas áridas e semiáridas do mundo, utilizada na indústria alimentícia, na produção de corantes, na conservação e preservação de solos, e no Nordeste do Brasil, principalmente, como forragem animal, não tendo suas potencialidades exploradas plenamente.

OBJETIVOS

Desenvolver e caracterizar micropartículas de acetato de celulose como sistema de liberação controlada de fármacos, utilizando diclofenaco de sódio como fármaco modelo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para obter o acetato de celulose, seguiu-se o método proposto por Meireles et al., (2010). Amostras de 2g de celulose da palma forrageira, foram tratadas com 50mL de ácido acético PA e mantidas sob agitação mecânica por 30min a temperatura ambiente. Em seguida, 0,32g de H₂SO₄ e 18mL de ácido acético glacial foi adicionado a mistura e agitado por mais 25min.

Submeteu-se a mistura a filtração a vácuo, adicionando 64mL de anidrido acético ao filtrado sob agitação e, em seguida, mantendo em repouso por 14h. A reação foi cessada com adição de água ao filtrado. O material foi seco em estufa por 3h a 105°C.

As micropartículas foram produzidas pela adaptação do método emulsificação/evaporação de solvente descrito por Salaun et al., (2010) e Assunção et al., (2011). Inicialmente solubilizou-se 0,1g do polímero em 15mL de diclorometano (Fase I, ou Orgânica) e preparou-se 100mL de uma solução de álcool polivinílico 1% (Fase III). A fase II foi composta por 2mL de água (micropartículas vazias), ou 2mL de água e 0,01g de fármaco (micropartículas com fármaco).

A Fase I foi agitada com aparelho de Ultra-turrax (4.000rpm); a Fase II foi gotejada lentamente sobre a Fase I, mantendo a agitação por 5min, favorecendo a formação de uma emulsão A/O. A dispersão resultante foi novamente emulsificada vertendo-se a Fase III sobre a primeira emulsão (mistura das Fases I e II), sob agitação a 5.000rpm, formando uma emulsão múltipla A/O/A. As micropartículas são precipitadas depois da evaporação do solvente na interface água/ar e secas em estufa/dessecador a 45°C.

O material foi analisado quanto a morfologia por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), perfil de cristalinidade por Difractometria de Raio-X (DRX) e resistência a erosão por agitação e exposição a diferentes pH em Incubadora.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As fotomicrografias obtidas por MEV para as micropartículas com fármaco e vazias, são mostradas na Figura 1 A e B, respectivamente. Percebe-se que ambas as micropartículas, exibem estruturas de formato predominantemente esférico, em escala micrométrica (2-5 μ m), com a presença de rugosidades na superfície.

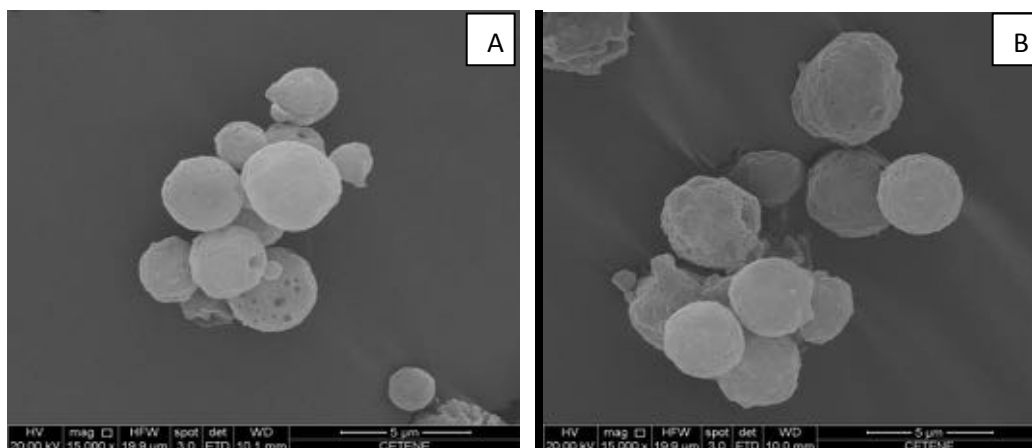


Fig. 1. Micrografias obtidas por MEV para as micropartículas com diclofenaco de sódio (A) e vazias (B). 15.000X.

Pela técnica do MEV foi possível avaliar também a composição elementar da superfície dos sistemas através da Energia Dispersiva de Superfície (EDS). Os resultados mostraram para ambos os sistemas a presença dos elementos carbono (C) e Oxigênio (O). A ausência de elementos químicos específicos do fármaco nos permite inferir que o mesmo não esteja na superfície.

O DRX é uma técnica de caracterização microestrutural de materiais. De acordo com os difratogramas apresentados na Figura 2 (A - micropartículas vazias; B - micropartículas com diclofenaco de sódio), o sistema polimérico é caracterizado como amorfo com uma pequena região cristalina, e revela a não interferência do fármaco na microestrutura do sistema pela sobreposição dos perfis.

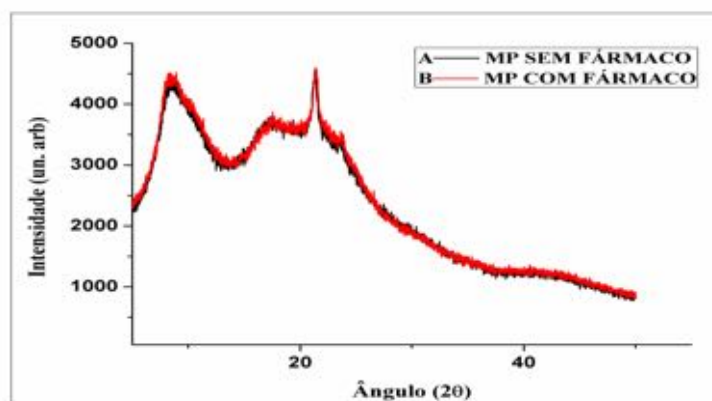


Fig. 2. Difratoograma de Raio-X para as Micropartículas com diclofenaco de sódio e vazias. 15.000X.

Amostras de 0,2mg de micropartículas quando expostas a 10mL de água e soluções tampões de pH= 1,2 e 7,4 por até 4h, simulando as condições do suco gástrico e fluido intestinal, não sofreram erosão ou ruptura da matriz quando observadas por

microscopia. Quando secas em estufa/dessecador, ou mantidas suspensas em solução aquosa, permaneceram estáveis por um período superior a 90 dias.

CONCLUSÕES

A técnica de emulsificação/evaporação de solvente para produção das micropartículas mostrou viabilidade e praticidade. O sistema matricial apresentou características favoráveis a sua utilização para veicular fármacos com propriedades biofarmacêuticas semelhantes ao diclofenaco de sódio. Além disso, o polímero obtido a partir da palma forrageira apresentou características favoráveis a microencapsulação. Estudos posteriores poderão quantificar a liberação do fármaco e, desta forma, agregar valor de mercado a esta espécie do semiárido, como fonte alternativa de excipientes farmacêuticos.

AGRADECIMENTOS

PROCAD

Instituto Nacional do Semiárido (INSA)

Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio em Medicamentos (LABDEM/UEPB)

Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (CERTBIO/UEPB)

Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSUNÇÃO, R. M. N. et al., Utilização do acetato de celulose produzido a partir da celulose extraída do caroço de manga como matriz para produção de sistemas microparticulados. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 385-389, 2011.

BRUM, S. S. et al. Síntese de Acetato de Celulose a partir da Palha de Feijão utilizando *N*-bromossuccinimida (NBS) como Catalisador. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 22, n. 5, p. 447-452, 2012.

FISCHER, S. et al.. Properties and Applications of Cellulose Acetate. **Macromolecular Symposia**, v. 262, p. 89–96, 2008.

MEIRELES, C. da S. et al. Characterization of asymmetric membranes of cellulose acetate from biomass: Newspaper and mango seed. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 954–961, 2010.

RODRIGUES FILHO, G. et al., Release of doxycycline through cellulose acetate symmetric and asymmetric membranes produced from recycled agroindustrial residue: Sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p.566–571, 2011.

SALAUN, F. et al., Influence of the solvent on the microencapsulation of an hydrated salt. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 964–974, 2010.

STORPIRTIS, S. et al. **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 321 p.

PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E CITOTOXICIDADE DO CANDIDATO A FÁRMACO ANTITUMORAL DERIVADO DO 2-AMINO-5,6,7,8-TETRAIDRO-4H-CICLOHEPTA[B]TIOFENO

¹D. D. DAVID; ¹A.F.F. SILVA; ¹J. E. GUIMARÃES; ¹C. C. AMORIM; ¹F. J. B. M. JUNIOR; ¹E. A. M. MENDONÇA

¹ Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas, UEPB – Campus V, João Pessoa 58.020-540, Brasil; dani_milkjp@hotmail.com

RESUMO

Nanopartículas poliméricas são utilizadas em sistemas de liberação controlada de fármacos e podem ser direcionadas para tumores sólidos. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a preparação e caracterização do candidato a fármaco antitumoral derivado do 2-amino-tiofeno. Os nanosistemas foram preparados pelo método de nanoprecipitação, foi feita posteriormente a avaliação da citotoxicidade preliminar dos sistemas. Os resultados mostraram que a taxa de encapsulação das nanocapsúlas varia em função da quantidade de fármaco. Diante das formulações líquidas, observou-se toxicidade para *Artemia salina* nos nanosistemas quando comparado ao fármaco livre.

INTRODUÇÃO

Nanopartículas poliméricas biodegradáveis são utilizadas em sistemas de liberação controlada, demonstram maior especificidade, segurança, biocompatibilidade, redução da toxicidade e um potencial terapêutico significativo. O Poli-ε-caprolactona (PCL) é um dos polímeros mais utilizados para a produção de nanopartículas, uma vez que aumenta a produção de partículas estáveis com um pequeno tamanho e distribuição uniforme.¹ Esses sistemas podem direcionar fármacos para os tumores sólidos, possibilitando uma liberação prolongada no sítio de ação, ampliando a utilidade da quimioterapia antineoplásica.² Neste sentido, o planejamento racional de fármacos é um dos métodos mais vantajosos que vem sendo bastante empregado pelos químicos medicinais e pesquisadores de áreas afins. O SBB44 é um candidato a fármaco antitumoral recém sintetizado. Os estudos *in vitro* e *in vivo* são bastante limitados devido à sua fraca solubilidade em água. Para superar estes problemas e aumentar a biodisponibilidade, uma estratégia poderia ser a associação do SB44 em nanopartículas coloidais que podem ser eficazes para solubiliza-lo e entregá-lo para tumores sólidos.

OBJETIVOS

Avaliar a preparação e caracterização do candidato a fármaco antitumoral derivado do 2-amino-5,6,7,8-tetraidro-4H-ciclohepta[b]tiofeno.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os nanosistemas foram preparados pelo método de nanoprecipitação, com caracterização das nanopartículas contendo o fármaco encapsulado em PCL-nanocápsulas (PCL-NC), foi avaliado o teor do fármaco encapsulado nas suspensões expressos em concentração percentual. A taxa de recuperação do fármaco foi calculada como sendo a diferença percentual entre a quantidade inicialmente adicionada e aquela encontrada nas suspensões. Foram preparadas diversas formulações alternando a quantidade de fármaco, foram avaliados o diâmetro de partículas, polidispersão (PDI), pH, e taxa de encapsulação. Os ensaios *in vitro* utilizando a *Artemia salina* Leach foram realizados com intuito de avaliar a citotoxicidade preliminar dos sistemas. O procedimento empregado foi a quantificação da concentração letal 50 % (CL₅₀)³ calculados através do método estatístico PROBIT.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que o teor das NCs varia em função da quantidade de fármaco de acordo com a tabela 1. A diminuição da taxa de encapsulação pode ser atribuída à formação de nanocristais do fármaco, durante a formação das nanoestruturas.⁴ O PDI menor que 0,3 pode ser associado à um sistema monodisperso, com alta homogeneidade na população de partículas, sugerindo uma distribuição de tamanho monomodal.⁵ As suspensões de nanopartículas preparadas com PCL apresentaram variações dos valores de pH, devido à exposição de maior número de grupos ácidos carboxílicos terminais, quanto à hidrólise, em função do tempo, promovida pela relaxamento das cadeias poliméricas.

Tabela 1. Características físico-químicas de nanocápsulas

Formulações	7CN (mg)	Tamanho de partícula (nm)	PDI *	pH	Taxa de encapsulação (%)
NC-7CN	2,5	151,8	0,3	6.36	116%
NC-7CN	5	137,2	0,28	5.65	99.25%
NC-7CN	7	117,4	0,25	6.48	98.89%
NC-7CN	10	127,6	0,3	5.74	81.80%

*PDI: Índice de polidispersão

O bioensaio foi realizado em triplicata com sete concentrações diferentes e apresentou-se tóxico. Os nanosistemas com 5mg de fármaco apresentaram uma elevada toxicidade para *Artemia salina*, com (CL₅₀) inferior a 50 µg/mL.

CONCLUSÕES

Foi evidenciado que a quantidade de fármaco exerceu influência significativa nas formulações, principalmente no que se refere a taxa de encapsulação. Diante das formulações líquidas, observou-se alta toxicidade para *Artemia salina* nos nanosistemas contendo maior quantidade do fármaco quando comparado ao fármaco livre que não foi observado nenhuma morte. Pretende-se continuar os estudos *in vitro* e *in vivo* e determinar o mecanismo exato de ação envolvido na toxicidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

¹ OLIVEIRA, L.C.; TAVEIRA, E.J.F; SOUZA, L.G.; MARRETO, R.N.; LIMA, E.M.; TAVEIRA, S.F. Aplicações das Nanopartículas Lipídicas no Tratamento de Tumores Sólidos: Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de cancerologia**. Edição 58, pág. 695-701, 2012.

² TORCHILIN, V. P. Multifunctional nanocarriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 1532-1555, 2006.

³ MEYER, B. N. et al. Brine shrimp : A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 45, p. 31-4,1982.

⁴ GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 1 – 9 2008.

⁵ FESSI H., PUISIEUX F., DEVISSAGUET J.PH., AMMOURY N. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, October 1989.



DESENVOLVIMENTO DE DUAS PLATAFORMAS BIOTECNOLÓGICAS PARA PRODUÇÃO DE ESTRATÉGIAS VACINAIS CONTRA O PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

¹F.C. MARIZ, ²L. M. NASCIMENTO, ³A. C. FREITAS

¹Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco. filipe.mariz@ufpe.br

²Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, FIOCRUZ-PE.

³Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco

RESUMO

A infecção pelo Papilomavírus humano (HPV) representa um grave problema de saúde pública devido à sua comprovada associação com lesões genitais e cânceres. Embora eficazes, as vacinas profiláticas anti-HPV atualmente licenciadas são incapazes de combater infecções ou lesões já estabelecidas no indivíduo. Além disso, seus custos proibitivos impedem sua disponibilização em programas de vacinação. Neste trabalho, duas plataformas biotecnológicas foram desenvolvidas a partir da modificação genética de linhagens da levedura *Pichia pastoris* e do protozoário *Leishmania tarentolae*. Ambas as plataformas são capazes de produzir antígenos virais e representam atrativas candidatas para o desenvolvimento de vacinas profiláticas e terapêuticas contra as doenças associadas ao HPV.

INTRODUÇÃO

O HPV é um vírus reconhecidamente oncogênico responsável por 5% de todos os cânceres em humanos [1]. O impacto estimado das vacinas anti-HPV é comprometido pelos seus altos custos, o que impede sua disponibilização nos países em desenvolvimento, onde ocorrem 80% das mortes decorrentes da infecção pelo HPV [2]. Estudos que visem o desenvolvimento de novas abordagens vacinais ainda são, portanto, prioridade [1].

Resultados prévios demonstram que células de *P. pastoris* modificadas geneticamente são capazes de produzir a proteína L1 do capsídeo do HPV, a qual é capaz de se autoconformar em partículas semelhantes ao vírus – VLPs (*virus-like particles*) [3, 4]. Essas partículas são imunogenicamente indistinguíveis dos vírions nativos e são a base das vacinas anti-HPV atuais [2].

Por outro lado, vacinas baseadas em vetores vivos representam atrativas alternativas para o desenvolvimento de terapias anti-câncer [5]. Vetores vivos apresentam eficientemente antígenos para células do sistema imune e também atuam

como adjuvantes. Nesse interesse, células de *L. tarentolae* são potenciais vetores vacinais porque ativam células e respostas imunes profilático-terapêuticas sem causar toxicidade tecidual [5, 6]. Esses protozoários são incapazes de infectar humanos e já foram avaliados satisfatoriamente contra a leishmaniose visceral [6] e a imunodeficiência humana [7].

Neste trabalho, avaliamos o desenvolvimento de um sistema genético não comercial para produção da proteína L1 do HPV em *P. pastoris*. Em paralelo, linhagens de *L. tarentolae* recombinantes foram utilizadas para produção de antígenos baseado na oncoproteína E5 do HPV, o que constitui a base para o desenvolvimento de um vetor vacinal vivo com propriedades terapêuticas contra os cânceres associados ao HPV.

OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivos:

- I. desenvolvimento de linhagens recombinantes de *P. pastoris* expressando a proteína L1 a partir de um sistema genético não comercial;
- II. desenvolvimento de linhagens recombinantes de *L. tarentolae* expressando antígenos baseados na oncoproteína E5 do HPV como vetor vacinal vivo.

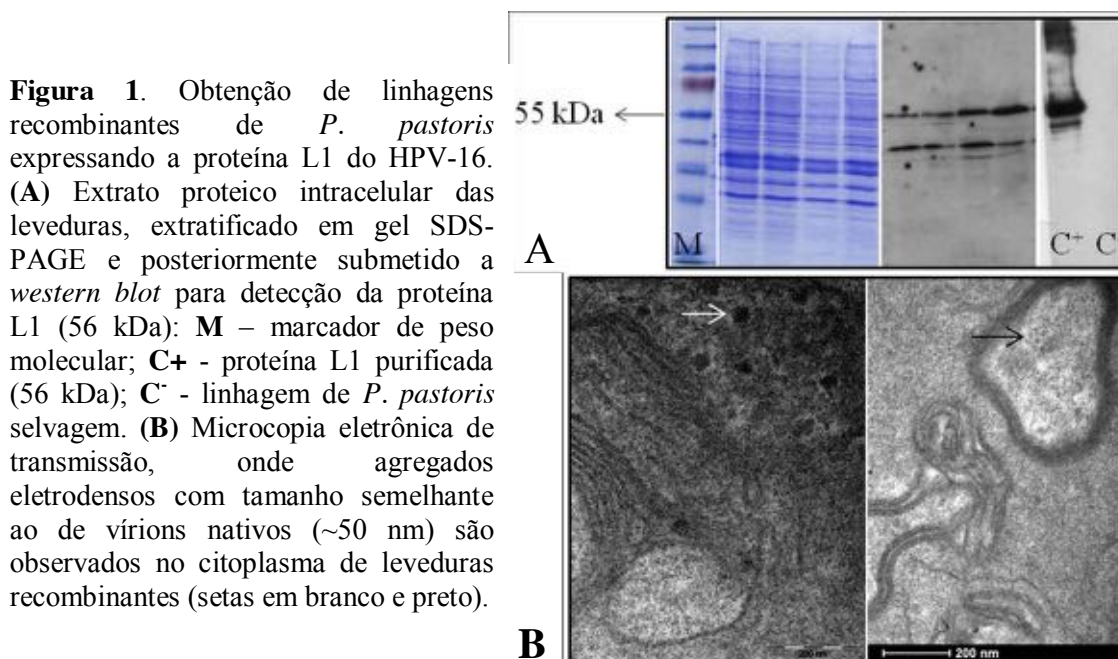
MATERIAIS E MÉTODOS

Para produção da proteína L1 do HPV-16 em *P. pastoris*, inicialmente desenvolvemos um sistema genético não comercial denominado pPGK Δ 3-L1H16, o qual se baseia no gene L1 do HPV e no promotor PGK de *P. pastoris* descrito por Almeida et al [8]. A correta construção desse sistema foi analisada por sequenciamento de DNA, PCR e digestão enzimática. O referido sistema foi posteriormente utilizado para inserção do gene L1 no genoma de *Pichia* mediante eletroporação. As linhagens recombinantes obtidas foram cultivadas e a expressão da proteína L1 foi avaliada por *western blot* através do emprego do anticorpo monoclonal anti-L1 no extrato proteico das células. A presença de VLPs de HPV no citoplasma das leveduras recombinantes foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão.

As linhagens recombinantes de *L. tarentolae* foram desenvolvidas a partir de dois sistemas genéticos construídos como descrito a seguir: o gene E5 de HPV-16 e o gene E5m - baseado em epitopos da oncoproteína E5 – foram fusionados ao epitopo HA e posteriormente clonados em plasmídeo pSPBT1 não comercial para expressão no referido protozoário. Esses sistemas foram respectivamente denominados pSPBT1-E5ot e pSPBT1-E5m e submetidos a sequenciamento de DNA, PCR e digestão enzimática para confirmação da correta obtenção. Células de *Leishmania* foram transfectadas com os referidos sistemas e cultivadas para expressão dos antígenos virais. Ensaios de *western blot* com anticorpos monoclonais anti-HA foram executados para detecção dos antígenos do HPV a partir do extrato proteico das linhagens recombinantes de *L. tarentolae* desenvolvidas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises através de sequenciamento de DNA, PCR e digestão enzimática confirmaram a correta construção do plasmídeo pPGK Δ 3-L1H16. O referido sistema foi utilizado para obtenção de linhagens recombinantes de *P. pastoris* através de eletroporação. Os clones foram posteriormente selecionados mediante crescimento em antibiótico de seleção e submetidos a cultivo para produção da proteína do capsídeo viral. Os ensaios de imunodeteção por *western blot* com o anticorpo anti-L1 revelaram a presença da proteína L1 (~56 kDa) no extrato das leveduras recombinantes (figura 1A). Os controles utilizados – alíquotas da proteína L1 purificada previamente e uma linhagem selvagem de *P. pastoris* - asseguram que a reação observada no ensaio é específica para a proteína viral. Em paralelo, as análises por microscopia eletrônica de transmissão sugerem a montagem de VLPs no citoplasma das linhagens desenvolvidas (figura 1B).



A construção dos vetores pSPBT1-E5ot e pSPBT1-E5m foi confirmada por sequenciamento de DNA, PCR e digestão enzimática (figura 2A). Células de *L. tarentolae* transfectadas com os referidos sistemas genéticos foram cultivadas e os antígenos virais foram detectados por *western blot* a partir do extrato proteico celular mediante emprego de anticorpo anti-HA (figura 2B). Embora o controle utilizado assegure que a reação observada é específica para as linhagens recombinantes, os resultados sugerem que os antígenos virais estejam possivelmente complexadas a estruturas ou proteínas nativas de *Leishmania*. A superagregação da proteína E5 em estruturas maiores ou em membranas celulares já foi descrita na literatura e é resultado da sua alta hidrofobicidade [9]. Novas análises serão realizadas para elucidação detalhada do ocorrido.

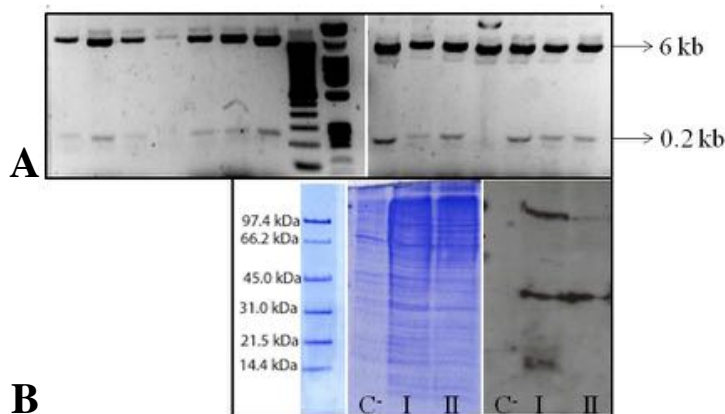


Figura 2. Obtenção de linhagens recombinantes de *L. tarentolae* expressando os antígenos E5ot e E5m de HPV-16. (A) Digestão enzimática confirmando a correta obtenção dos plasmídeos pSPBT1-E5m (esquerda) e pSPBT1-E5ot (direita) mediante liberação dos genes E5m e E5ot (0.2 kb), bem como do plasmídeo pSPBT1 (6 kb). (B) Extrato

proteico intracelular dos protozoários, extratificado em gel SDS-PAGE e posteriormente submetido a *western blot*: C - linhagem selvagem e *L. tarentolae*; I e II - clones de *L. tarentolae* expressando os antígenos E5m e E5ot, respectivamente.

CONCLUSÕES

Os resultados parciais demonstram que as linhagens de *P. pastoris* e *L. tarentolae* recombinantes desenvolvidas são atrativas para o estabelecimento de plataformas vacinais com finalidades profilático-terapêuticas. Estudos futuros serão desenvolvidos para purificação e caracterização final das VLPs produzidas. Em paralelo, animais serão imunizados com as linhagens de *L. tarentolae* recombinantes para avaliação da resposta imune produzida contra os antígenos de HPV. A produção de novos antígenos virais a partir de *L. tarentolae* também está em fase de avaliação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Prof. Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto do Departamento de Microbiologia e ao Núcleo de Inovação Tecnológica da FIOCRUZ-PE, à Plataforma de Sequenciamento do LabCen/UFPE e ao Laboratório de Microscopia e Microanálise do CETENE pelo suporte técnico essencial ao desenvolvimento deste trabalho. Agradecemos ao Prof. Dr. Paulo Lee Ho do Instituto Butantan pela alíquota gentilmente cedida da proteína L1 purificada. À CAPES e ao CNPq, agradecemos pelo suporte financeiro e credibilidade concedidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. STANLEY, M. A. Genital Human papillomavirus infections: current and prospective therapies. *J Gen Virol*, v. 93, p. 681-91, 2012.
2. WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Cancers in World. Summary Report 2010. Disponível em: <www.who.int/hpvcentre>. Acesso em: 26 set. 2011.

3. HANUMANTHA, R. N.; BABU, P. B.; RAJENDRA, L.; SRIRAMAN, R.; PANG, Y.S.; SCHILLER, J.T.; SRINIVASAN, V.A. Expression of codon optimized major capsid protein (L1) of human papillomavirus type 16 and 18 in *Pichia pastoris*; purification and characterization of the virus-like particles. *Vaccine*, v. 29, p. 7326-34, 2011.
4. COIMBRA, E.C.; GOMES, F.B.; CAMPOS, J.F.; D'ARC, M.; CARVALHO, J.C.; et al.. Production of L1 protein from different types of HPV in *Pichia pastoris* using an integrative vector. *Braz J Med Biol Res*, v. 44, p. 1209-14, 2011.
5. BOLHASSANI, A.; ZAHEDIFARD, F. Therapeutic Live Vaccines as a Potential Anti-Cancer Strategy. *Int J Cancer*, v. 131, p. 1733-43, 2012.
6. BRETON, M.; TREMBLAY, M.J.; OUELLETTE, M.; PAPADOPOULOU, B. Live nonpathogenic parasitic vector as a candidate vaccine against visceral leishmaniasis. *Infect Immun*, v. 73, p. 6372-82, 2005.
7. BRETON, M.; ZHAO, C.; OUELLETTE, M.; TREMBLAY, M. J.; PAPADOPOULOU, B. A recombinant non-pathogenic *Leishmania* vaccine expressing human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) Gag elicits cell-mediated immunity in mice and decreases HIV-1 replication in human tonsillar tissue following exposure to HIV-1 infection. *J Gen Virol*, v. 88, p. 217-225, 2007.
8. ALMEIDA, J.R.; MORAES, L.M.; TORRES, F.A. Molecular characterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene (PGK1) from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Yeast*, v. 22, n. 9, p. 725-737, 2005.
9. DIMAIO, D.; MATTOON, D. Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene*, v.20, p. 7866-7873, 2001.



SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE MICROEMULSÕES PARA VEICULAÇÃO TÓPICA DE RNA INTERFERENTE

Rosalina C. Jácome^{1*}, Gisele L. M. Álvares¹, Alessandra B. Matos², Giovanna Machado², Janaína V. Melo², André F. P. Silva³, Rafael Dhalia³, Karina L. A. Saraiva¹

¹Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campina Grande-PB

²Laboratório de Microscopia e Microanálise, Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), Recife-PE

³Laboratório de Virologia e Terapia Experimental, Instituto Aggeu Magalhães, Recife-PE

*rosalina_coelho@hotmail.com

RESUMO

A interferência por RNA é um processo de silenciamento pós-transcricional que requer um sistema de liberação clinicamente adequado para entrega segura do siRNA. Assim, o objetivo do estudo é formular e caracterizar sistemas microemulsionados para veiculação de siRNA na pele. As microemulsões foram avaliadas quanto ao pH, condutividade, índice de Refração (IR), microscopia eletrônica e estabilidade, evidenciando ser uma microemulsão do tipo A/O, uma vez que os valores obtidos aproximaram-se daqueles encontrados em literatura para a fase oleosa. Além disso, o potencial de encapsulação do siRNA foi determinado por eletroforese. Dessa forma, este trabalho propõe o desenvolvimento de uma nova abordagem da nanotecnologia associada à biologia molecular.

Palavras-Chave: Interferência por RNA; Microemulsões; Nanotecnologia

INTRODUÇÃO

A interferência mediada por RNA é um fenômeno que ocorre praticamente em todas as células eucarióticas, podendo exercer um papel importante na eliminação de RNAs mensageiros (mRNA) anômalos através de pequenos RNAs interferentes (siRNA), que promovem o silenciamento gênico pós-transcricional (SUN; TSAO, 2008). O uso clínico de siRNA é dificultado pela sua instabilidade, entrada ineficiente na célula e perfil farmacocinético pobre. O sistema de transporte ideal deve ser capaz de ultrapassar a barreira do estrato córneo, proporcionar proteção contra a degradação e facilitar a absorção e liberação intracelular (GRAMPUROHIT et al., 2011; HUANG & LIU, 2011). Em razão de seu conteúdo de tensoativos, as microemulsões podem interagir com o extrato córneo desestruturando sua bicamada lipídica, além de proporcionar melhorias quanto à liberação, biodisponibilidade e dissolução dos

produtos (ASTIER, 2006). Até o momento, nenhum estudo abordou o tema sobre sistemas microemulsionados para veiculação tópica de siRNA. O estudo inovador será alvo de indústrias farmacêuticas e/ou de cosméticos.

OBJETIVOS

Sintetizar e caracterizar os sistemas microemulsionados para veiculação tópica de siRNA;

Avaliar o potencial de encapsulação de siRNA através da técnica de eletroforese.

MATERIAIS E MÉTODOS

Um diagrama de fases pseudoternário foi obtido utilizando uma fase aquosa de propilenoglicol (PPG) e água (A), Span 80 e Tween 80 como o sistema tensoativo/cotensoativo e o óleo de canola como fase oleosa (O). A microemulsão foi obtida adicionando os seguintes componentes para as percentagens finais indicadas (w / w): 7,4% de uma mistura de propilenoglicol e água (3:1), 55,6% de uma mistura de Tween 80 e Span 80 (3:1) e 37% de óleo de canola. Outro sistema de microemulsão foi formulado através da adição do polímero catiônico, polietilenoimina (PEI) 10%, que é comumente utilizado em aplicações de transporte de genes, na fase aquosa (3:3:1 de PEI, PPG e A, respectivamente). As microemulsões selecionadas foram caracterizadas por seus aspectos macroscópico e morfológico, por microscopia eletrônica de transmissão, e físico-químicos, por meio da análise de pH, condutividade e refratometria. A estabilidade das formulações foi analisada através do estresse térmico em banho termostático, bem como pelo método do congelamento-descongelamento. A presença de siRNA nas microemulsões foi determinada por eletroforese em gel de agarose 0,6% contendo brometo de etídio (0,5mg/mL). Os complexos de ME/siRNA foram preparados para uma concentração final de 65µL com tempo de incubação de 10 minutos. A eletroforese foi realizada a 45V, com amperagem aberta, por 120 min.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Macroscopicamente, as formulações apresentaram-se como um líquido amarelado, translúcido e ligeiramente viscoso. A microscopia eletrônica de transmissão demonstrou gotículas (n = 200) com um diâmetro médio de 41.452 ± 14.201 nm sem PEI e $125,42 \pm 28.383$ nm, com o polímero catiônico. Os valores de pH, condutividade e índice de refração são mostrados na tabela 1. Estes resultados são indicativos de uma microemulsão A/O, visto que o baixo valor de condutividade está relacionado com a fase externa oleosa e o índice de refração é próximo daquele descrito para o óleo de canola (1,465 - 1,467 µs). Além disso, o pH obtido é aceitável para aplicação tópica. As amostras mostram-se estáveis quanto à aparência física e composição química das formulações, apresentando resultados de pH e condutividade próximos aos estudos iniciais descritos na tabela 1. Na eletroforese (figura 1), foi avaliada a interação entre a

microemulsão e o siRNA. Pode-se observar a presença das moléculas regulatórias nas bandas marcadas pelo brometo de etídio. Sugere-se que o PEI exerce fortes ligações com o siRNA e compactação, demonstrado pela banda menos intensa (banda 3), quando comparado àquele complexo sem o polímero catiônico (banda 4).

Tabela 1: Valores de pH, Condutividade e Índice de refração.

Amostras	Análise físico-química das microemulsões (média de valores)		
	pH	Condutividade (μScm^{-1})	Índice de Refração (μs)
Microemulsão	7,16	1,22	1,4663
Microemulsão + PEI	7,52	1,54	1,467

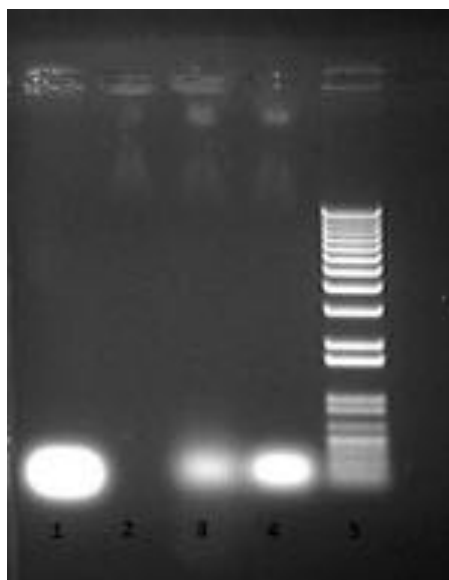


Figura 1: Eletroforese do complexo de microemulsão-siRNA. Banda 1: siRNA livre; Banda 2: Microemulsão; Banda 3: Microemulsão catiônica com siRNA; Banda 4: Microemulsão sem PEI e com siRNA; Banda 5: Padrão de peso molecular.

CONCLUSÕES

Este trabalho propõe o desenvolvimento de uma nova forma farmacêutica para liberação de siRNA na pele. Um sistema microemulsionado catiônico foi formulado e pode ser útil para encapsulação de moléculas carregadas negativamente, aumentando a permeação e liberação cutânea. O desenvolvimento futuro de um nanocosmético RNA interferente terá um significativo impacto tecnológico e sócio-econômico, podendo despertar o interesse das indústrias farmacêuticas nacionais/internacionais.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), CETENE e UEPB.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASTIER, A. Formes galéniques nouvelles en cancérologie. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, v.64, n.1, p.23-35, 2006.

DEPIERI, L. V. Desenvolvimento e Caracterização de Sistemas de Liberação Tópica a Base de Cristais líquidos para Veiculação de siRNA na Terapia Gênica (Reduzida). 2012. 27 f. Tese (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2012.

GRAMPUROHIT N; RAVIKUMAR P; MALLYA R. Microemulsions For Topical Use – A Review. *Ind J Pharm Edu Res*, Vol. 45, p.100-07, 2011.

HUANG, L. LIU, Y. In vivo delivery of RNAi with lipid-based nanoparticles. *Annu Res Biomed Eng*, V.13, p. 507-530, 2011.

REISCHL, D. ZIMMER, M.S.A. Drug delivery os siRNA therapeutics: potentials and limits of nanosystems. *Nanomedicine*, v.5, p. 8-20, 2009.

SUN, B.K. TSAO, H. Small RNAs development an disease. *J Am Acad Dermatol*, V.59, p. 725-737, 2008.



3º Encontro Brasileiro
para Inovação Terapêutica

1º Workshop
Rede RISH
Rede de Inovação em Insumos
para Saúde Humana

II Workshop
Estabilidade de Fármacos
e Medicamentos

21 e 22/10/2013
Campus UFPE

23 a 25/10/2013
Dorisol Recife
Grand Hotel

Interligando competências científicas, tecnológicas e industriais em espaços de saúde

ANÁLISES TOXICOLÓGICAS, FARMACOLOGIA E FARMACOGÊNOMICA



***Annona vepretorum* MART. (ANNONACEAE) APRESENTA ATIVIDADE HEPATOPROTETORA EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM CCL₄**

¹E.M. LAVOR, ¹M. G. SILVA, ¹J.C. SILVA, ¹L.A.R.O. MACÊDO, ¹J.R.G.S. ALMEIDA, ¹R.L. MENDES

¹Núcleo de Pesquisas e Estudos em Plantas Mediciniais - NEPLAME, Universidade Federal de do Vale do São Francisco. rosemary.mendes@univasf.edu.br

RESUMO

Muitos produtos naturais que apresentam propriedades antioxidantes tem sido utilizados para a prevenção e tratamento dos danos induzidas por estresse oxidativo. Objetivou-se avaliar a atividade antioxidante *in vivo*, do extrato etanólico bruto de *Annona vepretorum* (AvEt-OH) na hepatotoxicidade induzida por CCl₄. Trinta camundongos foram divididos em seis grupos experimentais, sendo 3 grupos controles e 3 tratados com o AvEtOH nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg. Sete dias após o início do tratamento, os órgãos foram processados para análise histopatológica. A análise microscópica mostrou que o Av-EtOH apresentou atividade hepatoprotetora compatível com o controle positivo (vitamina E) em todas as doses, protegendo o fígado dos danos causados pelo radical livre formado a partir do CCl₄.

INTRODUÇÃO

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são produtos do metabolismo oxidativo e sua formação pode ser estimulada pela radiação e por agentes xenobióticos derivados da poluição do ar ou de produtos químicos tais como tetracloreto de carbono (CCl₄) (YUAN; KITTS, 1996). O CCl₄ é uma potente droga hepatotóxica que ocasiona dano hepático principalmente por intermédio dos radicais livres triclorometil ($\cdot\text{CCl}_3$) e triclorometilperóxil ($\cdot\text{OCCl}_3$), formados durante a sua metabolização (CREMONENSE, et. al., 2001). O estresse oxidativo provocado pelas EROs tem sido relacionado com o desenvolvimento de doenças crônicas e degenerativas incluindo o câncer, patologias do sistema cardiovascular e degeneração neuronal, tais como na doença de Alzheimer e no processo de envelhecimento (WATANBE et al., 2004).

A atividade antioxidante ou a inibição da geração de radicais livres é importante para proporcionar proteção contra danos hepáticos. Algumas plantas tem demonstrado propriedade hepatoprotetora, proteção contra doenças cardíacas e contra o câncer, e dessa forma tem atraído considerável interesse dos pesquisadores. O gênero *Annona* L. pertence à família Annonaceae e compreende cerca de 175 espécies (CHATROU, 2009; FATOPE, 1996). No Brasil, esse gênero possui em torno de 60 espécies, entre elas a *Annona vepretorum* que é popularmente conhecida na região nordeste do Brasil como

araticum ou pinha da caatinga (MENDES, 2010). Estudos farmacológicos e químicos indicaram a presença de compostos bioativos importantes, inclusive com atividade antioxidante (COSTA et. al., 2009) o que indica que espécies desse gênero podem ser alternativas interessantes para o tratamento de doenças degenerativas.

OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito hepatoprotetor do extrato etanólico bruto das folhas de *A. vepretorum* em camundongos Swiss submetidos a hepatotoxicidade aguda induzida por tetracloreto de carbono (CCl₄).

MATERIAIS E MÉTODOS

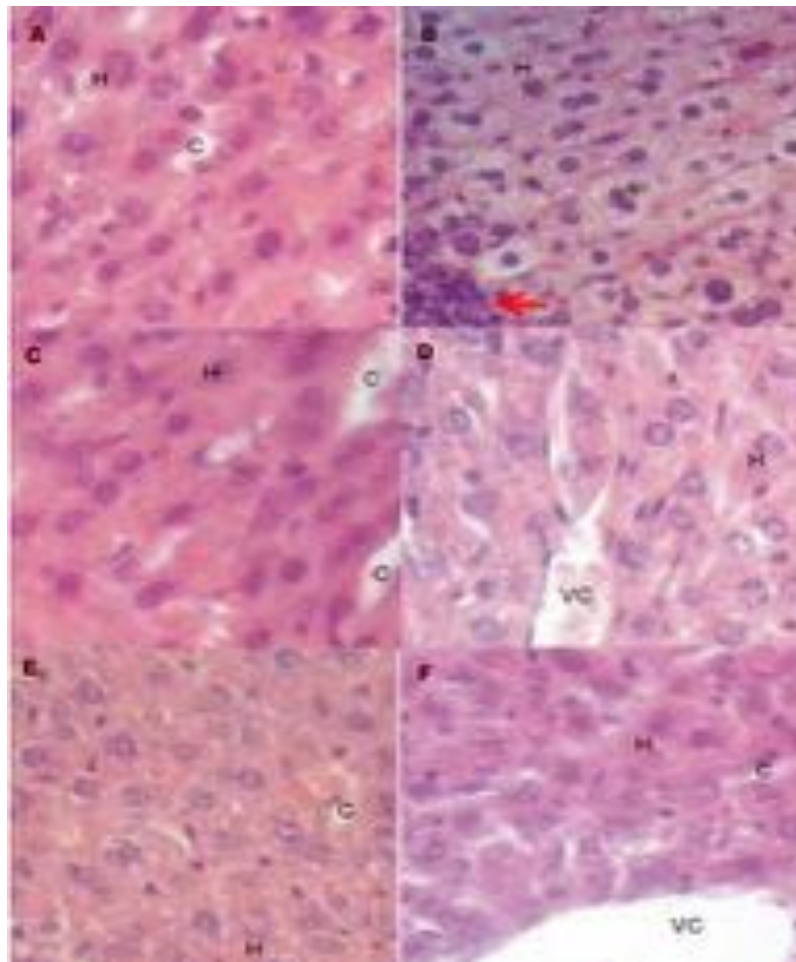
Camundongos da linhagem Swiss com idade entre 4 e 6 semanas foram obtidos do biotério da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF) e mantidos sob temperatura controlada (24°C), com livre acesso à alimentação e água e ciclos claro/escuro de 12 horas. Os animais foram divididos em seis grupos contendo cinco animais cada. O grupo controle normal (G1) recebeu durante o experimento somente o veículo PBS/Tween (10mL/kg, via oral – v.o); o grupo G2, controle positivo, recebeu o veículo por v.o durante seis dias antes da intoxicação; o terceiro grupo (G3) foi tratado com vitamina E (100mg/kg) por v.o durante seis dias; os grupos quatro (G4), cinco (G5) e seis (G6) foram tratados durante seis dias, respectivamente, com as doses de 25, 50 e 100mg/kg do extrato etanólico de *A. vepretorum* (AvEt-OH). No sexto dia, os camundongos dos grupos G2-G6 receberam uma injeção intraperitoneal de CCl₄ (10mL/kg) e após 24 horas foram eutanasiados. Os fígados e rins dos animais foram processados para análise histopatológica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise histopatológica mostrou que os rins (todos os grupos) e os fígados do grupo controle normal apresentaram parênquima e estroma íntegros. O controle negativo apresentou alguns hepatócitos cujos citoplasmas apresentaram-se com aspecto vítreo indicativos de degeneração hialina, que é uma lesão celular reversível decorrente de alterações bioquímicas que levam ao acúmulo intracelular de material de natureza protéica conferidos principalmente pela coagulação focal de proteínas celulares. Porém, a lesão mais proeminente observada foi a esteatose microvesicular. Embora não tenha sido realizada coloração específica para lipídeos, foram observadas no citoplasma dos hepatócitos múltiplas vesículas de aspecto claro, além de o núcleo estar central, o que é indicativo da lesão. O acúmulo de lipídeos neutros no citoplasma dos hepatócitos, decorre de desequilíbrios na mobilização desses lipídeos, uma vez que as proteínas responsáveis pelo transporte intracelular podem ter se precipitado (degeneração hialina) em consequência da presença de agentes xenobióticos no tecido hepático, como o CCl₄ (RAMAKRISHNA, et. al., 2011).

O controle positivo (G3) apresentou morfologia hepática preservada, justificando assim os efeitos antioxidantes conferidos pela vitamina E. Os grupos tratados com as doses de 25 e 50 mg/Kg de AvEt-OH apresentaram hiperemia mas a morfologia hepática estava preservada. No grupo tratado com 100 mg/Kg de AvEt-OH foram observados vasos hiperêmicos em cuja periferia havia leves infiltrados inflamatórios, bem como a presença de discreta esteatose em um pequeno número de hepatócitos. Dessa forma, o AvEt-OH nas doses testadas mostrou-se capaz de reduzir a níveis similares aos da vitamina E, os danos causados pela peroxidação lipídica promovida pelo tetracloreto de carbono.

Figura 1. Fotomicrografias de cortes histológicos de fígado em (A) Grupo controle normal;(B) Grupo controle negativo, onde se vê hepatócitos repletos de vesículas de gordura e núcleo central e um discreto filtrado inflamatório (seta vermelha); (C) grupo controle positivo tratado com Vitamina E; (D) Grupo que recebeu 25 mg/Kg de AvEtOH; (E) Grupo que recebeu 50 mg/Kg de AvEtOH. Os hepatócitos apresentam proteínas coaguladas (discreta degeneração hialina); (F) grupo que recebeu 100 mg/Kg de AvEtOH. A-F- aumento de 400 X. VC- Veia Centro lobular; C-capilar; H- Hepatócitos.



CONCLUSÕES

O tratamento agudo com o AvEt-OH, no modelo utilizado, apresenta atividade hepatoprotetora em toxicidade induzida por tetracloreto de carbono, apresentando-se como produto natural com potencial antioxidante.

AGRADECIMENTOS

A UNIVASF, Ao NEPLAME e ao CNPQ.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHATROU, L. W.; ESCRIBANO, M. P.; VIRUEL, M. A.; MAAS, J. W.; RICHARDSON, J. E.; HORMAZA, J. I. Flanking regions of monomorphic microsatellite loci provide a new source of data for plant species-level phylogenetics. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 53, p. 726-733, 2009.

COSTA, E. V.; PINHEIRO, M. L. B.; SILVA, J. R. A.; MAIA, B. H. L. N. S.; DUARTE, M. C. T.; AMARAL, A. C. F.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L. Antimicrobial and antileishmanial activity of essential oil from the leaves of *Annona foetida* (Annonaceae). **Química Nova**, v. 32, p. 78-81, 2009.

CREMONESE, R. V.; PEREIRA-FILHO, A. A.; MAGALHÃES, R.; MATTOS, A. A. DE; MARRONI, C. A.; ZETTLER, C. G.; MARRONI, N. P. CIRROSE EXPERIMENTAL INDUZIDA PELA INALAÇÃO DE TETRACLORETO DE CARBONO: adaptação da técnica e avaliação da peroxidação lipídica. **Arq Gastroenterol**, v. 38, n. 1, p.40-47, 2001.

FATOPE, M. O.; AUDU, O. T.; TAKEDA, Y.; ZENG, L.; SHI, G.; SHIMADA, H.; MCLAUGHLIN, J. L. Bioactive *ent*-kaurene diterpenoids from *Annona senegalensis*. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 301-303, 1996.

RAMAKRISHNA S.; GEETHA K.M.; BHASKAR GOPAL P.V.V.S.; RANJIT KUMAR P.; CHARAN MADAV P.; UMACHANDAR L. Effect of *Mallotus philippensis* Muell.-Arg leaves against hepatotoxicity of carbon tetrachloride in rats. **Journal Pharmaceutical Science Research** 2:74-83,2011.

WATANBE, H.; MAHAKUNAKORN, P.; TOHDA, M.; MURAKAME, Y.; MATSUMOATO, K. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Choto-san* and its related constituents. **Bio. Pharm Bull**, v. 27, p. 38-46, 2004.

MENDES, S. S., *et al.* **J. Ethnopharmacol.**, p. 129 - 391, 2010.

YUAN, Y. V.; KITTS, D. D. Endogenous antioxidants: role of antioxidant enzymes in biological systems. In: SHAHIDI, F. **Natural antioxidants chemistry, health effects, and applications, champaign**. Illinois: AOCS Press, 1996.



ATIVIDADE ANSIOLÍTICA DE CAJARANA (*SPONDIAS* sp.) EM ROEDORES

¹K.H.D. OLIVEIRA, ¹C.R.C. GUEDINE, ¹V.R. LUNA, ¹J.A. SILVA, ¹G.A. FREITAS, ¹L.C.S.L.M. PORDEUS

¹Laboratório de Psicofarmacologia, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba. Klebya_hellen@yahoo.com.br

Introdução: A cajarana (*Spondias sp.*) é uma fruta bastante apreciada por seu sabor exótico. Porém, estudos sobre suas atividades biológicas são escassos. O objetivo do trabalho foi avaliar o potencial ansiolítico de *Spondias sp.*, em roedores. **Métodos:** Camundongos Swiss (*Mus musculus*), machos, pesando em média 34g, foram agrupados (n: 7), e mantidos sob condições padrões. Os animais receberam água e ração *ad libitum*, e foram tratados por via oral durante 30 dias, de acordo com o protocolo experimental: grupo controle (água: 1mL/100g), PEC (pectina: 100mg/Kg), CAJ I (Sumo: 1mL/100g) e CAJ II (Sumo: 2mL/100g). O teste do labirinto em cruz elevado foi realizado para avaliar o efeito ansiolítico. Os dados foram analisados por GraphPad Prism 6, através do teste de Kruskal-Wallis, seguido de Dunn's, e estão expressos em média e erro padrão da média. **Resultados e Discussão:** CAJ II aumentou o n° de entradas no braço aberto ($9 \pm 1,2$), comparado ao controle ($2 \pm 0,6$); bem como tempo de permanência: CAJ II ($94 \pm 6,2$), controle ($19,5 \pm 8,9$). O tempo no braço fechado foi reduzido CAJ II ($161,4 \pm 9,1$), em relação ao controle ($231,7 \pm 8,6$), sendo um indicativo de ação ansiolítica. **Conclusão:** *Spondias sp.* possui potencial ação ansiolítica, em modelo animal. Estudos adicionais são necessários para elucidar os possíveis mecanismos envolvidos, bem como a realização de outros modelos de ansiedade e de possíveis efeitos indesejados.

Apoio: CNPq.

Palavras-chave: *Spondias*, ansiedade, comportamento.



**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DAS FASES OBTIDAS POR PARTIÇÃO
DE *SELAGINELLA CONVOLUTA* (SELAGINELLACEAE)**

¹L.A.R.O. MACÊDO, ¹J.C. SILVA, ¹R.G. OLIVEIRA- JÚNIOR, ¹L.M.A. GOMES, ¹G.R. SOUZA, ¹T.C. DINIZ ²S.R.G. LIMA-SARAIVA, ¹V.N.S. BARRETO, ³A.G.M.PACHECO, ¹J.R.G.S. ALMEIDA

¹ Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Medicinais, Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF); lari_ribeiro@msn.com

² Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco;

³ Laboratório de Fitoquímica, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

Introdução: *Selaginella convoluta*, popularmente conhecida como “jericó”, é utilizada na medicina popular como analgésico e anti-inflamatório. O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antinociceptiva das fases obtidas de *S.convoluta*, hexano (FH) e clorofórmica (FC). **Métodos:** Foram realizados os testes de contorções abdominais induzidas por ácido acético (0,9%), formalina (2,5%) e placa quente. Os animais foram tratados com FH e FC (100, 200 e 400 mg/kg), ácido acetilsalicílico (200 mg/kg) e a morfina (10 mg/kg). Utilizou-se camundongos Swiss (n=6, 25-35 g). Adicionalmente foi avaliada a atividade motora dos animais. Os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética sob o número 0003/17072012. **Resultados:** No teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, as fases reduziram o número de contorções em todas as doses. No teste da formalina, os animais tratados com FH e FC apresentaram resultados significativos na segunda fase. Entretanto, na dose de 100 mg/kg de FC houve redução do tempo de lambida da pata na primeira fase. Em relação à placa quente, os animais tratados com FH e FC apresentaram, em todas as doses, aumento no tempo de latência. No teste de rota rod não houve interferência motora. **Conclusão:** As fases demonstraram atividade antinociceptiva em todos os ensaios experimentais. Contudo, novos estudos são necessários para melhor elucidação do mecanismo de ação pelos quais os constituintes químicos presentes nas fases exercem tal atividade.

Apoio: CNPq, FACEPE.

Palavras-chave: Atividade antinociceptiva, *Selaginella convoluta*, Selaginellaceae.



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E DA COORDENAÇÃO MOTORA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DAS FOLHAS DE *Cnidocolus quercifolius* (EUPHORBIACEAE)

¹L.M. DE A. GOMES, ²S.R.G. DE L. SARAIVA, ¹T.M.D. DE ANDRADE, ¹J.C.SILVA, ¹T.S. DINIZ, ¹V.N.S. BARRETO, ¹J.R.G. DA S. ALMEIDA; ¹J.T. DE LIMA.

¹Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Medicinais, Laboratório de Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Vale do São Francisco. le.andr.a@hotmail.com

²Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco

RESUMO

A espécie *Cnidocolus quercifolius* (Euphorbiaceae) é conhecida popularmente como faveleira e pertence ao bioma Caatinga. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antinociceptiva e motora do EEB (Extrato Etanólico Bruto) das folhas de *C. quercifolius*. Foram utilizados grupos de camundongos (n=6) (*Mus musculus*). A atividade antinociceptiva do EEB das folhas foi avaliada através do teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, teste da lambida da pata induzida pela formalina e pelo teste da placa quente. A coordenação motora foi avaliada pelo Teste de Rota-Rod. Os resultados obtidos demonstraram que a espécie *C. quercifolius* possui atividade antinociceptiva e a coordenação motora dos animais não foi alterada pela administração do extrato.

INTRODUÇÃO

A espécie *Cnidocolus quercifolius* (faveleira) é uma das plantas pertencentes ao bioma caatinga, que se destaca pela sua extraordinária resistência à seca. Seu emprego popular consiste em recuperar áreas degradadas, na alimentação animal e humano, na medicina popular, serrarias e como fonte de energia, dentre outros usos (NETO et al., 2009).

Segundo Lorenzi (1998) a faveleira é uma espécie pertencente à família Euphorbiaceae, trata-se de uma planta oleaginosa, xerófila, decídua, heliófila e pioneira. Atinge 4 a 8 metros de altura, dotada de copa alongada ou arredondada e rala. Tronco curto e ramificado desde a base, mais ou menos cilíndrico, com casca fina, lenticelada e quase lisa, de 20 a 35 cm de diâmetro.

A dor é uma modalidade sensorial que em muitos casos representam o único sintoma para o diagnóstico de várias doenças, muitas vezes possui função protetora. Já o processo inflamatório consiste na resposta orgânica mais precoce diante de lesão tissular ou infecção. Perante um trauma tissular, o acúmulo local de prostaglandinas, tromboxanos e outros mediadores químicos ocasionam uma alteração no limiar de

nociceptores, com conseqüente hiperalgia (ALMEIDA; NAVARRO; BARBOSA-FILHO, 2001; KUMMER & COELHO, 2002).

Nesse sentido, o presente trabalho realizou a avaliação da atividade farmacológica do extrato da espécie *Cnidoscolus quercifolius*, abordando atividade antinociceptiva e da coordenação motora. Em levantamento bibliográfico realizado nos principais bancos de dados sobre estudos com plantas medicinais, não foram encontrados registros de estudos com essa espécie e sua ação antinociceptiva.

OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antinociceptiva e motora do extrato etanólico bruto das folhas de *Cnidoscolus quercifolius*.

MATERIAIS E MÉTODOS

As folhas foram coletadas no município de Petrolina, na Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias - Embrapa Semiárido. A coleta e identificação foram realizadas por um botânico, e a exsiccata da espécie foi depositada no Herbário Vale do São Francisco (HVASF), no Centro de Referência para Recuperação de Áreas Degradadas (CRAD) na UNIVASF sob a identificação de número 19202.

O material vegetal foi levado à estufa à temperatura média de 40 °C por um período de 72 horas. Após a secagem e completa estabilização o material foi pesado e pulverizado. O material vegetal seco e pulverizado foi submetido à maceração exaustiva com etanol 95% em um recipiente de aço inoxidável. Foram feitas várias extrações num intervalo de 72 horas entre cada extração até completo esgotamento da droga. A solução extrativa obtida passou por um processo de destilação do solvente em evaporador rotativo a uma temperatura média de 50 °C. Após este processo de evaporação do solvente, obteve-se o EEB.

Foram utilizados grupos de camundongos (n=6) (*Mus musculus*) Swiss, machos, albinos, pesando entre 30–40 gramas, todos provenientes do Biotério da UNIVASF e foram mantidos em gaiolas coletivas com alimentação e água *ad libitum*. A atividade antinociceptiva do EEB folhas (100; 200 e 400 mg/kg *i.p.*) foi avaliada através do teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, teste da lambida da pata induzida pela formalina e pelo teste da placa quente, enquanto a avaliação da coordenação motora foi feita pelo teste de Rota-Rod. Indometacina (20 mg/kg *i.p.*), morfina (10 mg/kg *i.p.*) e Diazepam (2,5 mg/kg *i.p.*) foram utilizadas como drogas padrão. Os grupos controle receberam solução salina. A análise dos dados foi feita no programa GraphPadPrism®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a realização do teste das contorções abdominais, os números de contorções diminuíram significativamente ($p < 0,01$) em relação ao grupo controle, após a administração por via *i.p.* do EEB das folhas de *C. quercifolius*. Os efeitos foram

maiores nas doses de 400 mg/kg (98,7% de inibição), 200 mg/kg (79,4% de inibição) e 100 mg/kg (71,3% de inibição), conforme ilustrado na figura 01.

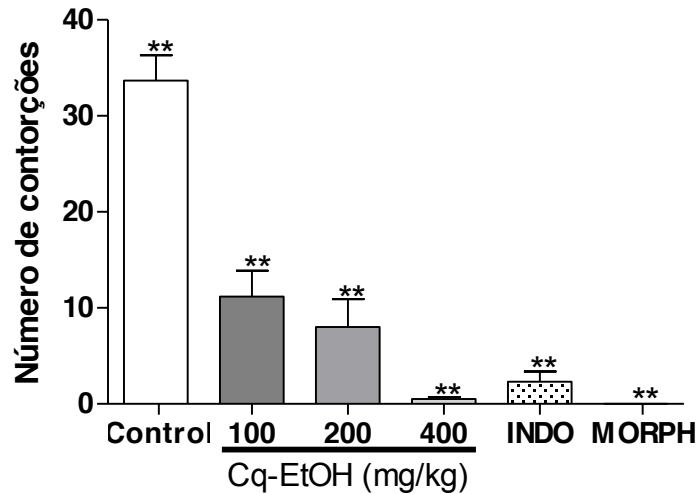


FIGURA 01: Efeito antinociceptivo do EEB das folhas da espécie *C. quercifolius* (Euphorbiaceae) no teste das contorções abdominais induzida pelo ácido acético. Os valores são significantes quando * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$; ANOVA + Dunnet.

No teste da formalina o tempo de lambida da pata diminuiu na primeira e na segunda fase após a administração do EEB das folhas, sendo as melhores respostas obtidas na segunda fase na dose de 400 mg/kg (79,46% de inibição).

Em relação ao teste da placa quente o EEB das folhas na dose de 400 mg/kg proporcionou o aumento do tempo de latência significativamente ($p < 0,05$), dados apresentados na figura 2. E por fim, o EEB das folhas não provocou alteração na coordenação motora dos animais no teste do Rota-Rod.

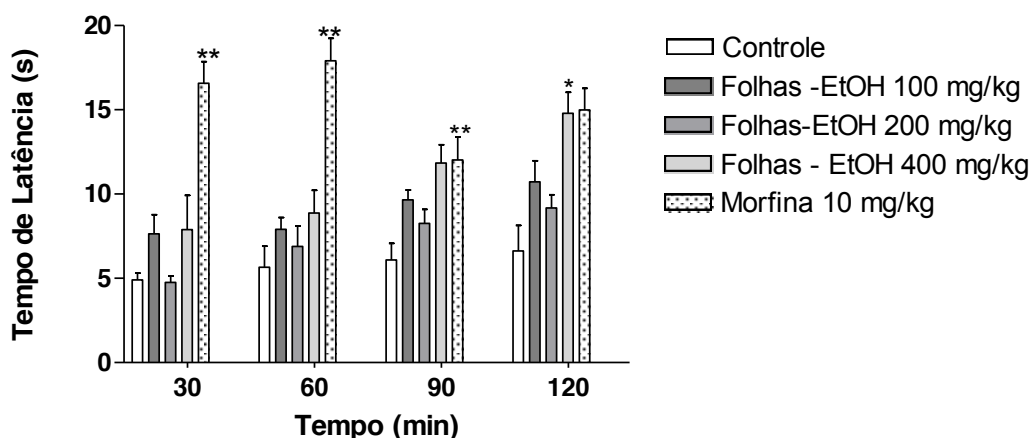


FIGURA 02: Efeito antinociceptivo do EEB das folhas da espécie *C. quercifolius* (Euphorbiaceae) no teste da placa quente. Os valores são significantes quando * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$; ANOVA + Dunnet.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram que as folhas da espécie *Cnidoscolus quercifolius* possui atividade antinociceptiva, atuando possivelmente na dor inflamatória, sendo seu mecanismo de atuação provavelmente a nível periférico, com exceção da dose de 400 mg/kg que apresentou resposta tanto a nível periférico como a nível central. Outros estudos ainda são necessários para caracterizar o mecanismo de ação preciso dos extratos. A coordenação motora dos animais não foi alterada pela administração do extrato.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

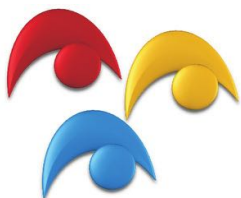
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, R. N.; NAVARRO, D. S.; BARBOSA-FILHO, J. M. Plants with central analgesic activity. **Revista Phytomedicine**, Stuttgart, v. 8, n. 4, p. 310-322, jul. 2001. Disponível em: http://artigo.cientifico.uol.com.br/uploads/artc_1146349999_70.pdf. Acesso em: 16 jan. 2012.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Antiinflamatórios Não Esteróides Inibidores da Ciclooxigenase-2 (COX-2): Aspectos Atuais. **Revista Brasileira Anestesiologia**, Botafogo-RJ, v. 52, n. 4, p. 498-512, jul./ago. 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rba/v52n4/v52n4a14.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2012.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2. ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1998.

NETO, J. P. et al. AVALIAÇÃO DA AÇÃO CLASTOGÊNICA DO ÓLEO DE *Cnidoscolus phyllacanthus* (Mart.) Pax. et K. Hoffm. EM CÉLULAS MEDULARES. **Revista de Biologia e Farmácia**, Campina Grande, v. 3, n. 1, p. 6-22, mar. 2009.



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICÂNCER E DA MODULAÇÃO GÊNICA DO NOVO DERIVADO ACRIDÍNICO LPSF/AC-119 EM CÉLULAS DE LEUCEMIA AGUDA

²F.A. SANTOS, ²M.C. PEREIRA, ²M.B.O. CHAGAS, ¹M.R. GALDINO-PITTA, ¹M.C.A. LIMA, ²M.J.B.M. RÊGO, ¹I.R. PITTA, ²M.G.R. PITTA

¹Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino, Universidade Federal de Pernambuco.

²Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino, Universidade Federal de Pernambuco

RESUMO

O câncer é a segunda doença com maior morbidade no mundo. Assim a busca de novos tratamentos tem um papel fundamental na saúde mundial. Sendo primordial avaliara atividade anticâncer de análogos da acridina como também avaliar o mecanismo molecular de indução das vias de morte celular. O composto AC-119 induz a morte de células de leucemia aguda CCRF-CEM com $IC_{50} = 5048,01 \mu M$ alta seletividade frente células sadias $IC_{50} > 100 \mu M$. Observamos que o composto AC119 modulou a expressão gênica, induzindo ao aumento da expressão do gene pró-apoptótico BID(15x), do gene regulador da necrose RIP3(2,91x) e do gene pró-autofágico Beclin (8,7x). Também encontramos um aumento do GADD153 (7,81x), gene regulador do estresse de reticulo quando comparados a controle não tratado ou tratados com amsacrina.

INTRODUÇÃO

O câncer é o resultado do crescimento autônomo e desordenado de células e tecidos, sendo considerada uma das doenças de maior incidência no mundo (WHO,2012). A quimioterapia é o tratamento mais empregado no entanto, sabe-se que os agentes quimioterápicos não agem exclusivamente em células tumorais, podendo levar a diferentes graus de toxicidade em células normais. Dessa forma, é um desafio constante a busca de medicamentos mais eficazes e menos tóxicos para o tratamento do câncer.

A amsacrina (Ansidyl ®), um derivado acridínico, é utilizada na terapêutica do câncer desde a década de 1970. Obtenção de análogos estruturais, como também o estudo do mecanismo de ação deste grupo de moléculas. (DEMEUNYNCK et al., 2001; BELMONT et al., 2008). As acridinas têm sido apontadas como fortes candidatas a fármacos com atividade anticâncer devido a sua alta capacidade de ligar-se ao DNA. Esses mecanismos interferem na estrutura e na integridade funcional do genoma para alterar ou impedir o processo vital da progressão celular (PALUMBO et al., 2002; BELMONT and DORANGE, 2008).

A atividade biológica das acridinas é basicamente atribuída à presença de um sistema poliaromático planar que se orienta paralelamente aos pares de bases da dupla hélice do DNA e perpendicularmente ao eixo da dupla hélice. Este complexo formado é estabilizado por interações hidrofóbicas, ligações de van der Waals e de ligações de hidrogênio (STREKOWSKI and WILSON, 2007). A intercalação do DNA causa modificações estruturais e das características físico-químicas dos ácidos nucléicos; a dupla hélice se tornar rígida (LERMAN, 1961 e 1963). A nível biológico, o metabolismo celular é fortemente perturbado. E ainda, ocorre um bloqueio da enzima telomerase, responsável pela imortalização tumoral.

OBJETIVOS

Avaliar a atividade anticâncer de novos derivados de acridina e a avaliara modulação gênica e as vias de indução de morte celular induzida por estes compostos

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Ensaio de citotoxicidade em células neoplásicas e normais: MTT

As PBMCs e a célula neoplásica CCRF-CEM foram plaqueadas na concentração de 10^4 células/100µl. Os derivados acridínicos foi adicionadas nas concentrações de 25, 50 e 15 µM e incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO² a 37°C submetidas ao método de MTT. Em seguida foram adicionados 20 µl da solução de MTT (sal de tetrazolium),

e as placas foram incubadas por 3 horas na estufa a 37°C. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com SDS em espectrofotômetro de placa a 550 nm.

2. Extração de RNA e síntese de cDNA

Células da linhagem CCRF-CEM foram plaqueadas em placa de cultura de seis poços ($2 \cdot 10^6$ células/poço), e tratadas com os compostos LPSF/AC 119, Amsacrina (controle antitumoral) e Rosiglitazona (controle positivo para expressão de PPAR γ) durante 6 e 12 horas. O *pellet* foi ressuspensionado em 800 μ L de Trizol® (Invitrogen), e a extração do RNA foi realizada seguindo as instruções do fabricante. Aliquotas de RNA total (3 μ g) foram tratadas com a enzima *DNase I*. Para a síntese de cDNA utilizou-se o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits*. Uma mistura contendo dNTPs, iniciadores randômicos, transcriptase reversa e inibidor de RNase.

3. Real Time PCR

Para análise quantitativa dos transcritos diferencialmente expressos foi feita PCR em tempo real. A reação de amplificação dos cDNAs foi realizada com PCR Master Mix e sondas específicas para os genes, BID, GADD153, BECLINe RIP-3, utilizando-se o equipamento ABI Prism 7900HT. Foi utilizado o gene de referência GAPDH, cuja expressão é constitutiva, para posterior análise comparativa do nível de expressão dos transcritos de interesse. A expressão relativa dos genes foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como pode ser observado na figura 1a o composto AC-119 parece induzir a morte celular de forma dose dependente nas células de leucemia aguda CCRF-CEM. O composto apresentou uma alta seletividade para às células tumorais, pois quando incubamos o composto nas mesmas condições e concentrações nas células PBMCs de indivíduos saudáveis, o composto não diminuiu a viabilidade celular das mesmas. Isso também pode ser visto na figura 1b no segundo gráfico. O IC₅₀ para a CCRF-CEM foi de 48,01 μ M e para as PBMCs foi >100 μ M.

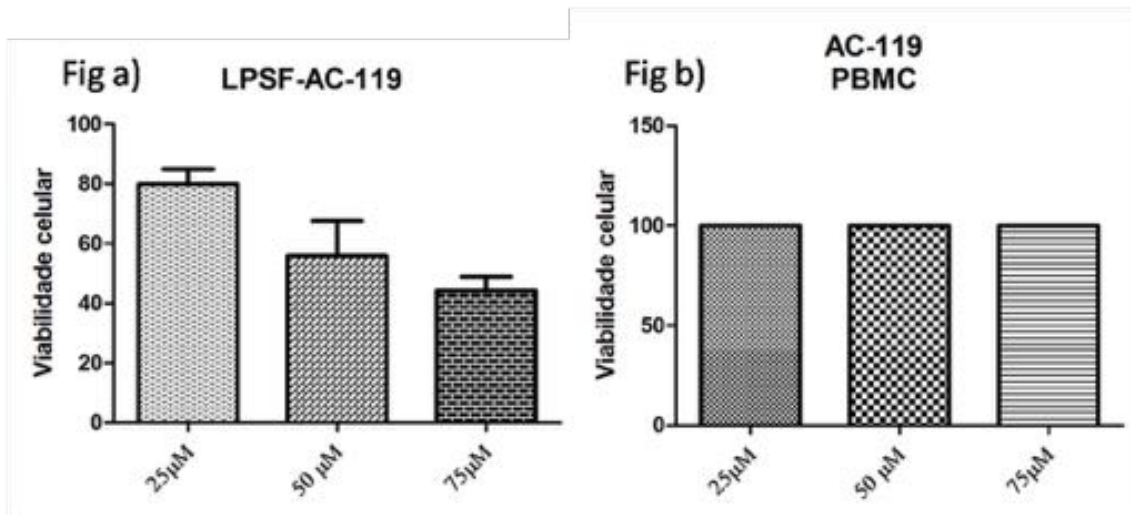


Figura .Viabilidade celular frente o composto AC-119 em diferentes doses: (a) células de leucemia aguda CCRF-CEM e (b)PBMCs

A modulação gênica e pode ser observada pelos dados obtidos da PCR-RT indicados na figura 2. O composto LPSF-AC-119 mostrou-se capaz de modular os genes RIP3, Beclin, GADD153 e BID, tais genes participam de diferentes vias de sinalização das cascatas de morte celular.

A expressão do gene pró-apoptótico BID foi aumentada em 15 vezes quando comparado a controle não tratado, e um aumento de 1,9 vezes comparado ao controle tratado com amsacrina. A expressão de RIP3 também foi aumentada 2,9 vezes quando comparada ao controle não tratado e quando comparada a amsacrina os valores ficaram bem próximos. A expressão de Beclin, gene envolvido no processo de autofagia, verificamos um aumento de 8,7 vezes quando comparado a controle não tratado e quando comparado ao controle amsacrina o aumento também ficou próximo, mostrando assim a sua eficácia na modulação gênica. A expressão de GADD 153, gene que influencia o estresse de retículo foi aumentada em 7,81 vezes pelo composto quando comparadas a células sem tratamento e ficando com valores bem próximos quando comparadas a amsacrina. Observou-se maior modulação da expressão gênica pelo composto AC119 no menor tempo (6 horas) do que no maior tempo de tratamento (12 horas). Mostrando assim uma modulação precoce desses genes.

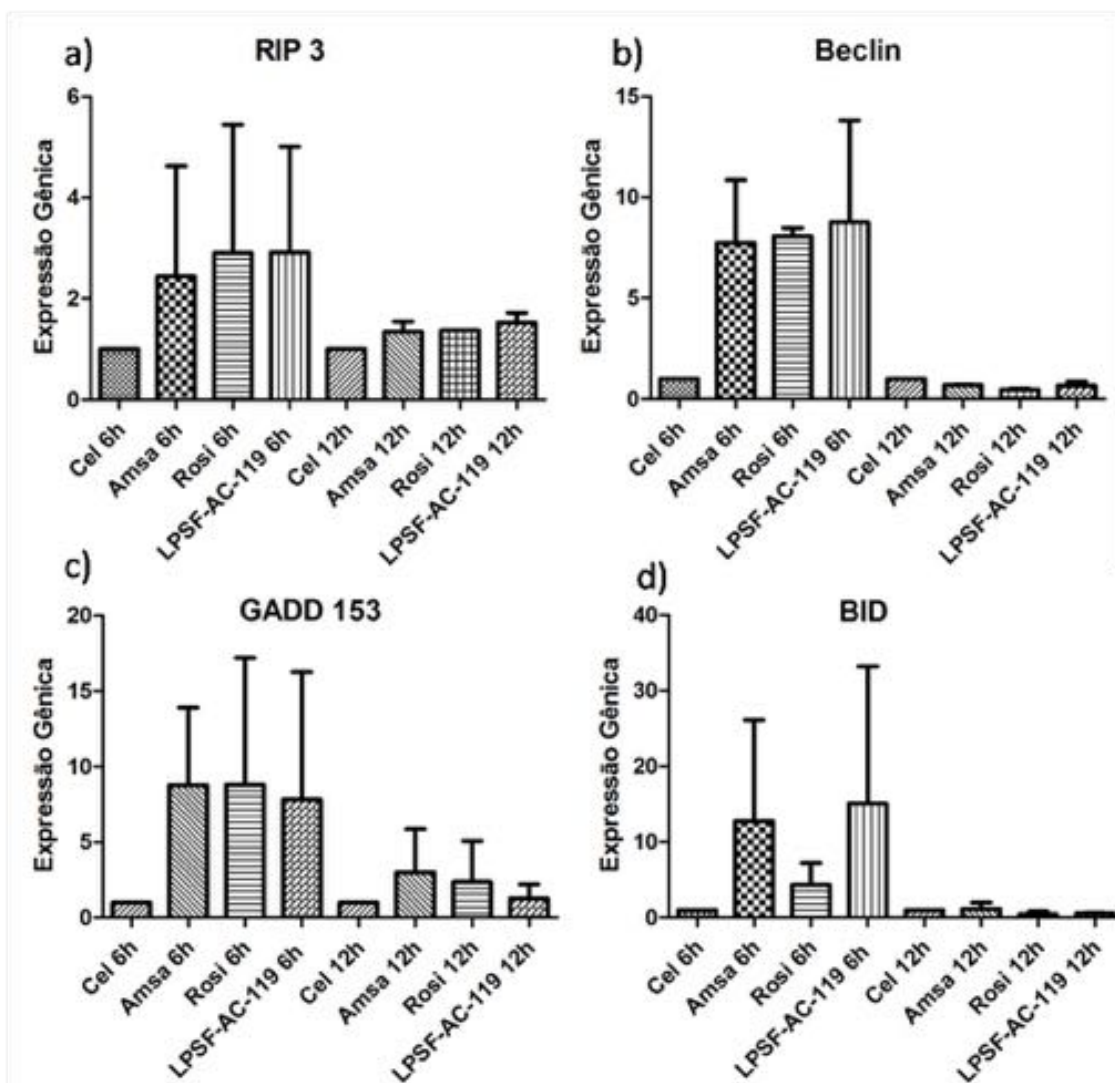


Figura 2. Expressão gênica em células de leucemia aguda CCRF-CEM não tratadas e tratadas por 6 e 12 horas com Amsacrina, Rosiglitazona e AC-119: a) RIP3, b) Beclin, c) GADD 153 e d) BID.

CONCLUSÕES

O composto AC-119 induz as células tumorais da linhagem CCRF-CEM a morte celular além de apresentar uma importante seletividade frente células tumorais e sadias. Quando comparadas ao controle não tratado, o composto AC119 mostrou-se eficiente em modular genes envolvidos nas cascatas de sinalização de apoptose celular, autofagia e estresse de reticulo endoplasmático. Novos ensaios para avaliar a expressão protéica estão sendo realizados para confirmar a modulação das vias induzidas pelo composto AC-119.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DEMEUNYNCK, M.; CHARMANTRAY, F.; MARTELLI, A. Interest of acridine derivatives in the anticancer chemotherapy. *Curr. Pharm. Des.*, v. 7, n.17, p. 1703-24, 2001.
2. BELMONT, P.; DORANGE, I. Acridine/acridone: a simple scaffold with a wide range of application in oncology. *Expert Opin. Ther. Patents*, v. 18, n. 11, p. 1211-24, (2008)
3. Palbumo, M.; Gato, B.; Moro, S.; Sissi, C.; Zagotto, G.; Sequenze-specific interactions of drugs interfering with the topoisomerase-DNA cleavage complex. *Biochim. Biophys. Acta*, vol.1587, p. 145-54, 2002
4. STREKOWSKI L.; WILSON B. Noncovalent interactions with DNA: an overview. *Mutat. Res.*, v. 623, n. 1-2, p. 3-13, (2007).
5. LERMAN, L.S. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. *Journal of Molecular Biology*, v. 3, p. 18-30, 1961.
6. LERMAN, L.S. The structure of the DNA-acridine complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 49, p. 94-102, 1963.



**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS
TIAZACRIDÍNICOS LPSF/AA-29, LPSF/AA-36, LPSF/AA-38 E LPSF/AA-48
EM LINHAGENS NEOPLÁSICAS DE LINFOMA DE BURKKIT E LEUCEMIA
LINFÓIDE AGUDA DE CÉLULAS T**

**¹M.B.O. CHAGAS, ²N.C.C. CORDEIRO, ¹K.M.R. MARQUES, ¹M.J.B.M. RÊGO,
²M.G. ROCHA-PITTA, ²S.L. GALDINO, ²I.R. PITTA, ²M.C.A. LIMA, ¹M.G.R.
PITTA**

¹Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco. mgrpitta@gmail.com

²Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco.

RESUMO

Novos derivados tiazacridínicos (LPSF/AA-29, -36, -38 e -48) foram avaliados, quanto ao seu potencial seletivo e citotóxico, frente às linhagens neoplásicas Raji e Jurkat. Os compostos apresentaram valores de IC₅₀ variando entre 34,20µM e 78,04µM para Raji e, entre 0,25µM e 86,79µM para Jurkat. O derivado LPSF/AA-29 foi o que exibiu os menores valores de IC₅₀ para ambas as linhagens neoplásicas. Todos os derivados testados apresentaram IC₅₀ >100µM para células normais. Estes dados apontam que os novos derivados tiazacridínicos constituem promissores agentes anticâncer.

INTRODUÇÃO

Câncer, neoplasia, tumor maligno são termos análogos utilizados para denominar uma classe de doenças que tem em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (Almeida *et al.*, 2005).

As acridinas são moléculas policíclicas planares que apresentam uma variedade de atividades biológicas como antimicrobiana, antileishmanial, antimalárica, tripanossomicida e anticâncer (Bonse *et al.*, 1999; Girault *et al.*, 2000; Pons *et al.*, 2001; Almeida *et al.*, 2005). As propriedades anticâncer dos derivados acridínicos tem sido explicadas nos últimos anos, a partir de sua propriedade intercalante com os pares de base do DNA (Almeida *et al.*, 2005). Outra série de moléculas, as tiazolidinedionas ou glitazonas que englobam um grupo de compostos com atividade anti-hiperglicêmica tem despertado nos últimos anos grande interesse da comunidade científica por apresentar atividade anticâncer (Shiau *et al.*, 2005; Ban *et al.*, 2010).

Uma estratégia utilizada por muitos grupos de pesquisa ao redor do mundo é a utilização de novos compostos obtidos a partir da fusão de moléculas com estrutura e atividades biológicas análogas.

Neste contexto, com o objetivo de buscar novas rotas para o tratamento do câncer avaliamos o potencial citotóxico e seletivo de novos derivados tiazacridínicos obtidos a partir da união dos núcleos das moléculas de acridina e tiazolidinediona.

OBJETIVOS

Avaliar a atividade citotóxica e seletiva, *in vitro*, dos novos derivados tiazacridínicos em linhagens neoplásicas humanas de linfoma de Burkkit e leucemia linfóide aguda de células T.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os novos derivados tiazacridínicos LPSF/AA-29, -36, -38 e -48 foram sintetizados no Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF), Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco. O potencial citotóxico dos novos derivados foi avaliado em duas linhagens de células neoplásicas humanas: Raji (linfoma de Burkkit) e Jurkat (leucemia linfóide aguda do tipo T).

As células foram plaqueadas (1×10^4 células/mL) em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ durante 24 horas. Os compostos foram dissolvidos em DMSO e adicionados em cada poço (1, 10, 25, 50 e 100 μM), em seguida, reincubados por 72 horas. A ansacrina foi utilizada como controle positivo. A avaliação do potencial citotóxico foi realizada pelo método do MTT. Após incubação, 20 μL de MTT (0,5 mg/mL) foram adicionados e reincubados por 3 horas. Em seguida, 130 μL de SDS 20% (lauril sulfato de sódio) foram adicionados. Após 24 horas, as placas foram lidas no comprimento de onda de 570 nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e o IC₅₀ foi determinado através do software Origin (SR0 OriginPro).

A avaliação da seletividade dos compostos foi realizada com células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) humano obtidas de voluntários saudáveis. As PBMCs foram isoladas através do método de centrifugação em gradiente de densidade com Ficoll-Hypaque (GE Healthcare). As células foram plaqueadas (1×10^6 células/mL) em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e incubadas por 24 horas. Os compostos foram adicionados nas mesmas concentrações do ensaio com células tumorais. Após 48 horas de incubação foi avaliada a citotoxicidade através do método do MTT. Os compostos foram considerados seletivos quando os valores do IC₅₀ foram >100 μM.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os novos derivados tiazacridínicos apresentaram atividade antiproliferativa contra as linhagens de células neoplásicas Raji e Jurkat. Os valores do IC₅₀ obtidos através do ensaio do MTT estão sumarizados na tabela 01. Neste estudo, concentrações abaixo de 20 μM foram consideradas como boa atividade antiproliferativa, entre 50 e 100 μM, moderada e >100 μM, inativa.

Todos os compostos testados apresentaram atividade antiproliferativa, entretanto, o composto LPSF/AA29 apresentou os menores valores de IC₅₀ para ambas as linhagens testadas. Em comparação com a ansacrina, o derivado LPSF/AA29 apresentou maior atividade citotóxica frente à linhagem celular Jurkat.

Adicionalmente, os compostos testados exibiram baixa citotoxicidade frente às PBMCs com valores de IC₅₀ >100 μM, isto é, os novos derivados possuem ação seletiva.

Tabela 01 - Atividade citotóxica dos compostos testados - IC₅₀ (μM).

Linhagens celulares	Compostos testados				
	LPSF/AA29	LPSF/AA36	LPSF/AA38	LPSF/AA48	Ansacrina
Raji	34,20	68,31	78,04	68,26	4,15
Jurkat	0,25	86,79	74,46	71,41	1,1
PBMCs	>100	>100	>100	>100	3,7

Os compostos acridínicos atuam por interferir na topologia do DNA, por isso, esta macromolécula é o principal alvo biológico das acridinas e seus derivados com propriedade anticâncer (Almeida *et al.*, 2005). Além disso, as tiazolidinas podem estar envolvidas na ativação das vias de inibição do crescimento celular, indução de apoptose e inibição de invasão celular (Nesto *et al.*, 2003; Grommes *et al.*, 2004). Ao analisarmos os resultados verificamos que o composto LPSF/AA29 apresentou maior citotoxicidade frente às linhagens testadas, em comparação com os outros compostos testados, e ainda, exibiu valor de IC₅₀ menor que o da ansacrina contra a linhagem Jurkat. Esta boa atividade antiproliferativa pode estar relacionada ao seu substituinte e seus fatores como parâmetros eletrônicos e estéricos, conformação assumida pela molécula no seu sítio de ação e até mesmo a solubilidade (Haider *et al.*, 2007; Kamal *et al.*, 2012).

CONCLUSÕES

Os novos derivados tiazacridínicos (LPSF/AA-29, -36, -38 e -48) apresentaram potencial citotóxico para as linhagens celulares Raji e Jurkat e demonstram baixa toxicidade para células normais. Estes novos derivados, em especial, o LPSF/AA29 constituem promissores agentes anti-proliferativos e poderão no futuro contribuir no desenvolvimento de novos fármacos contra o câncer.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE) e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para a Inovação Farmacêutica (INCT-if).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, V.L.; Leitão, A.; Reina, L.C.B.; Montanari, C.A.; Donnici, C.L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química nova**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

Ban, J.O.; Kwak, D.H.; Oh, J.H.; Park, E. J.; Cho, M.C.; Song, H.S.; Song, M.J.; Han, S.B.; Moon, D.C.; Kang, K.W.; Hong, J.T. Suppression of NF-kappaB and GSK-3beta is involved in colon cancer cell growth inhibition by the PPAR agonist troglitazone. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 188, n. 1, p. 75-85, 2010.

Bonse, S.; Santelli-Rouvier, C.; Barbe, J.; Krauth-Siegel, R.L. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase by acridines: kinetic studies and structure-activity relationships. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington D.C., v. 42, n. 26, p. 5448-5454, 1999.

Girault, S.; Grellier, P.; Berecibar, A.; Maes, L.; Mouray, E.; Lemièrre, P.; Debreu, M.A.; Davioud-Charvet, E.; Sergheraert, C. Antimalarial, antitrypanosomal, and antileishmanial activities and cytotoxicity of bis(9-amino-6-chloro-2-methoxyacridines): influence of the linker. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington D.C., v. 43, n. 14, p. 2646-2654, 2000.

Grommes, C.; Landreth, G.E.; Heneka, M.T. Antineoplastic effects of peroxisome proliferators-activated receptor gamma agonists. **Lancet Oncology**, Amsterdam, v. 5, n. 7, p. 419-429, 2004.

Haider, N.; Kabicher, T.; Käferböck, J.; Plenk, A. Synthesis and *in-vitro* antitumor activity of 1-[3-(Indol-1-yl)prop-1-yn-1-yl]phthalazines and related compounds. **Molecules**, Basel, v. 12, n. 8, p. 1900-1909, 2007.

Kamal, A.; Srikanth, Y.V.V.; Khan, M. N. A.; Ashraf, M.; Shaik, T. B.; Kalivendi, S.V. Synthesis, Anticancer Activity and Inhibition of Tubulin Polymerization of Bisindole Sulfonates. **Letters in Drug Design & Discovery**, Sharjah, v. 9, n. 3, p. 242-250, 2012.

Nesto, R.W.; Bell, D.; Bonow, R.O.; Fonseca, V.; Grundy, S.M.; Horton, E.S.; Le Winter, M.; Porte, D.; Semenkovich, C.F.; Smith, S.; Young, L.H.; Kahn, R. Thiazolidinedione use: fluid retention, and congestive heart failure: a consensus statement from the American Heart Association and American Diabetes Association. **Diabetes Care**, Alexandria, v. 27, n. 1, p. 256-263, 2004.

Pons, O.R.; Gregorio, D.M.; Mateo, J.V. G.; Calatayud, J.M. Flow-injection analysis study of the chemiluminescent behaviour of proflavine and acriflavine. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 438, n. 1, p. 149-156, 2001.

Shiau, C.W.; Yang, C.C.; Kulp, S. K.; Chen, K.F.; Chen, C.S.; Huang, J. W.; Chen, C.S. Thiazolidinediones mediate apoptosis in prostate cancer cells in part through inhibition of Bcl-xL/Bcl-2 functions independently of PPAR gamma. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 65, n. 4, p. 1561-1569, 2005.



AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM AS FASES OBTIDAS POR PARTIÇÃO DE *Selaginella convoluta*

¹L.A.R.O. MACÊDO, ¹E.M. LAVOR, ¹M.G. SILVA, ¹R.L. MENDES, ¹J.C. SILVA, ¹H.C.C. SARAIVA, ²S.R.G. LIMA-SARAIVA, ³A.G.M. PACHECO, ⁴F.L.T. AQUINO, ⁴J.N.S. FERRO, ⁴E.O. BARRETO, ¹J.R.G.S. ALMEIDA

¹ Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Mediciniais, Universidade Federal do Vale do São Francisco.
lari_ribeiro@msn.com

² Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco.

³ Laboratório de Fitoquímica, Universidade Estadual de Feira de Santana.

⁴ Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal de Alagoas.

RESUMO

Foram analisadas as alterações histopatológicas nos fígados e rins dos camundongos sob tratamento agudo com as Frações Hexânica (FH) e Clorofórmica (FC), obtidas por partição de *Selaginella convoluta*. Foram utilizados 36 camundongos Swiss, para cada fração, subdivididos em 3 grupos, nos quais se administrou por via intraperitoneal (*i.p*), soro fisiológico à 0,9%, e os extratos nas doses de 400 mg/kg e 2.000 mg/kg. Após 14 dias, os animais foram eutanasiados e os órgãos foram seccionados e processados conforme os métodos habituais. Foram observadas alterações hepáticas e renais caracterizadas por resposta inflamatória e fibrose tissular nos animais tratados. Estes resultados ressaltam a importância de estudos toxicológicos de longa duração com os extratos obtidos da espécie.

INTRODUÇÃO

Os produtos naturais de origem vegetal são importantes fontes de substâncias potencialmente ativas. Nesse contexto, *Selaginella convoluta* (Selaginellaceae) é uma planta medicinal encontrada no Nordeste do Brasil, popularmente conhecida como "jericó", sendo utilizada na medicina popular como antidepressivo, diurético, afrodisíaco, analgésico e anti-inflamatório. Entretanto, não há estudos que comprovem a segurança de seu uso (ALMEIDA et al, 2013).

Durante a fase pré-clínica em modelos com animais de experimentação, a toxicidade pode ser avaliada através da realização de estudos histopatológicos, para determinação de lesões celulares e teciduais. Esse estudo é de fundamental importância pois caracteriza os efeitos deletérios decorrentes da administração em concentração capaz de provocar efeitos tóxicos (EATON; KLAASSEN, 1996).

Nos estudos com finalidade farmacotoxicológica, o fígado e os rins são órgãos constantemente avaliados, pois além de serem vitais, são órgãos envolvidos na metabolização e excreção da maioria dos compostos, experimentalmente administrados,

sendo assim alvos de toxicidade induzida por xenobióticos. Os modelos animais são necessários para identificar as possíveis lesões provocadas pela ação direta ou de produtos gerados por biotransformação após administração dessas substâncias (FOLGUEIRA; BRENTANI, 2004)

OBJETIVOS

Com o intuito de conhecer uma eventual toxicidade e contribuir com o perfil de segurança da espécie, o objetivo do estudo foi avaliar histopatologicamente o efeito da administração aguda das frações obtidas por partição (FH e FC) de *S.convoluta* sobre fígado e rim de camundongos albinos Swiss.

MATERIAIS E MÉTODOS

O material vegetal foi coletado em março de 2012 (09° 03' 54.2"S, 40° 19' 11.7"W) no Campo Experimental da Embrapa Semiárido, município de Petrolina-PE. Uma exsicata da espécie foi codificada (19203) e depositada no Herbário Vale do São Francisco (HVASF) no Centro de Referência para Recuperação de Áreas Degradadas (CRAD) na UNIVASF. O processamento do material vegetal foi feito através de metodologia habitual (OLIVEIRA JUNIOR et al, 2012) para obtenção do Extrato Etanólico Bruto e a partir deste foi feita a partição com solventes em gradientes de polaridade crescente (hexano e clorofórmio).

Os animais foram fornecidos pelo Biotério Setorial da Univasf, mantidos sob condições ambientais padronizadas (22 ± 2° C e ciclo claro/escuro de 12 horas) e alimentados com ração e água potável à vontade. Os protocolos experimentais obedeceram aos atuais preceitos éticos e técnicos tendo sido aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) mediante certidão Nº 0003/17072012.

Foram utilizados 72 camundongos (n=36 para cada fração) subdivididos em 3 grupos (n=6, para cada sexo, 25-35g), nos quais se administrou via intraperitoneal, soro fisiológico à 0,9%, e (FH ou FC) nas doses de 400 mg e 2.000 mg/kg, em dose única, sendo observados durante 14 dias. A coleta das vísceras (fígado e rins) ocorreu no décimo quinto dia após o tratamento e foi feita pela eutanásia de dois dos animais sobreviventes de cada grupo. As secções teciduais foram fixadas em formalina tamponada e após 24 horas, resseccionadas para processamento histopatológico: desidratação com séries crescentes de álcool (70 a 100%) seguida de diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina. Em micrótomo, os fragmentos tissulares foram seccionados a uma espessura de 5µm com subsequente coloração por hematoxilina-eosina para exame microscópico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram identificadas alterações histológicas nos grupos tratados com o veículo em ambos os sexos e fases de *S. convoluta*. A avaliação hepática revelou estrutura e coloração lobular preservadas e nos rins, arquitetura normal com pirâmides

medulares recobertas por tecido cortical. O córtex apresentou glomerúlos regularmente distribuídos. Nos animais tratados com FH na dosagem de 400 mg/kg, os fígados apresentaram processo inflamatório difuso e com discretas regiões necróticas. Normalmente, os infiltrados apresentam maior densidade celular próximas as veias centro-lobulares, mas não houve destruição do parênquima hepático. Já aqueles tratados com a maior dose (2.000 mg/kg) apresentaram hepatócitos com múltiplas vesículas no citoplasma, sugestiva de esteatose além de um aumento no número de células inflamatórias. Nos animais tratados com FC, na dose de 400 mg/Kg os fígados apresentaram pequenos focos inflamatórios e vasos hiperêmicos. Entretanto, na maior dose, foram observadas extensas áreas de fibrose e discretas regiões de necrose.–Em relação a avaliação renal, não houve alterações dignas de nota, nos animais tratados com FH. Aqueles tratados com FC apresentaram processo inflamatório e pequena região de destruição tecidual com infiltrado inflamatório cortical bem como presença de microvesículas no citoplasma das células ao redor dos túbulos contorcidos.

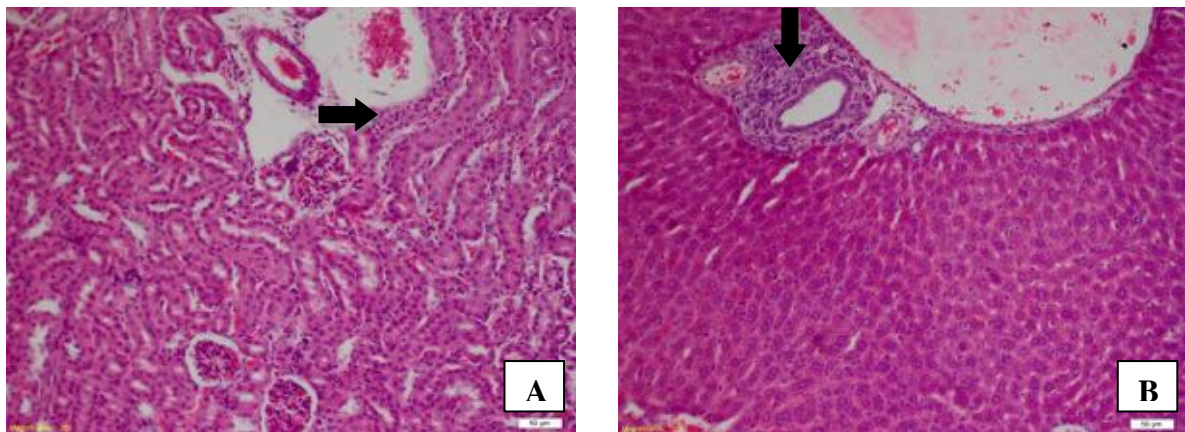


Figura1: Fotomicrografias representativas do histopatológico de rim e fígado de animais tratados com extratos na dose de 2.000 mg/ Kg. A seta indica um discreto infiltrado inflamatório em corte de rim (A) e fígado (B).

CONCLUSÕES

A avaliação histopatológica evidenciou alterações morfológicas em maior grau nos animais tratados com a maior dose experimental (2.000 mg/kg). Essa dose corresponde a 5 vezes a maior dose terapêutica do estudo de Sa et al. (2012). Tal fato aponta para um significado clínico que pode ser compreendido mais como resultado de uma sobrecarga dos órgãos que como consequência de uma ação tóxica significativa do extrato. Dessa forma, extratos de *S. convoluta* podem ser utilizados em dosagens inferiores a 400 mg/Kg devido ao menor grau e extensão das lesões em fígado e rins. Ainda assim, ressalta-se a importância de estudos toxicológicos de longa duração com as fases de *S.convoluta* para melhor caracterizar o perfil de segurança dessa espécie.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelas agências de fomento CNPq e FACEPE. Os autores desejam expressar seus agradecimentos ao Centro de Referência e Recuperação

de Áreas Degradadas (CRAD/UNIVASF) e a Embrapa Semiárido pela coleta e identificação da planta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J. R. G. S. ; SA, P. G. S. ; MACEDO, L. A. R. O. ; SIQUEIRA FILHO, J. A. ; OLIVEIRA, V. R. ; BARBOSA FILHO, J. M. . Phytochemistry of the genus *Selaginella* (Selaginellaceae). **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 7, p. 1858-1868, 2013.

EATON, D.L.; KLAASSEN, C.D. Principles of toxicology. In: Klaassen, C.D.; Amdur, M.O.; Doull, J. (eds.). **Cesarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisons**. 5.ed. New York: McGraw-Hill, 1996, p.13-34, 1996.

FOLGUEIRA, M. A. A. K; BRENTANI, M. M. Câncer de mama. In: FERREIRA, C. G.; ROCHA, J. C. **Oncologia molecular**. Editora Atheneu, São Paulo, p. 135-144, 2004.

MIDDENDORF, P.J.; WILLIAMS, P.L. Nephrotoxicity: Toxic Responses of the Kidney. In: WILLIAMS, P.L.; JAMES, R.C.; ROBERTS, S. M. **Principles of toxicology: environmental and industrial applications**. A Wiley-Interscience Publication, Second Edition. New York, cap. 5, p. 120- 25, 2000.

OLIVEIRA JUNIOR, R. G. ; ARAÚJO, C. S. ; SANTANA, C. R. R. ; SOUZA, G. R. ; LIMA-SARAIVA, S. R. G. ; GUIMARAES, A. L. ; OLIVEIRA, A. P. ; SIQUEIRA FILHO, J. A. ; PACHECO, A. G. M. ; ALMEIDA, JACKSON ROBERTO GUEDES DA SILVA . Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activity of extracts from the flowers of *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae). **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 4, p. 4489-4494, 2012

SA, P. G. S. ; NUNES, X. P. ; LIMA, J. T. ; SIQUEIRA FILHO, J. A. ; FONTANA, A. P. ; QUINTANS, J. S. S. ; QUINTANS-JUNIOR, L. J. ; DAMASCENO, P. K. F. ; BRANCO, C. R. C. ;BRANCO, A. ; ALMEIDA, J. R. G. S. . Antinociceptive effect of ethanolic extract of *Selaginella convoluta* in mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, p. 1-7, 2012.



AVALIAÇÃO DAS POSSÍVEIS ATIVIDADES CITOSTÁTICAS E APOPTÓTICAS DOS NOVOS DERIVADOS ACRIDÍNICOS LPSF/AC-05 E LPSF/AC-10

¹H.D. LIMA, ¹K.M.R. MARQUES, ¹M.B.O. CHAGAS, ¹M.J.B.M. RÊGO, ²I.R. PITTA, ²M.C.A. LIMA, ¹M.G.R. PITTA

¹Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco. mgrpitta@gmail.com

²Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco

RESUMO

Os derivados acridínicos LPSF/AC-05 e LPSF/AC-10 foram avaliados quanto ao potencial citostático e apoptótico frente à linhagem T47-D. Os valores de IC₅₀ obtidos através do ensaio de MTT foram de 65,20µM (LPSF/AC05) e 67,98µM (LPSF/AC10). Por meio da análise da citometria de fluxo verificou-se que os compostos, principalmente o LPSF/AC-10, apresentam potencial apoptótico. Os resultados encontrados podem margear a ampliação de novas pesquisas com esses derivados para o desenvolvimento de novos fármacos antineoplásicos.

INTRODUÇÃO

O câncer é apontado pela WHO (2013) como uma das principais causas de morte no mundo, tendo sido responsável por 7,6 milhões de mortes, cerca de 13% do total de mortos, só no ano de 2008. De acordo com o INCA (2011), nas últimas décadas o câncer ganhou uma dimensão maior, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial.

As três formas principais de tratamento do câncer são a quimioterapia, a radioterapia e a cirurgia. Atualmente, poucas são as neoplasias malignas tratadas com apenas uma modalidade terapêutica (INCA, 2012). O mecanismo de ação das drogas antineoplásicas está baseado na interferência em algum estágio da divisão celular – desde a síntese das bases nitrogenadas até a síntese de proteínas.

As acridinas e seus derivados são utilizados na produção de corantes e na síntese de substâncias com atividades biológicas como antimicrobiana, antileishmanial, antimalárica e tripanossomicida (Pons *et al.*, 2001; Bonse *et al.*, 1999; Girault *et al.*, 2000) e figuram na lista de novas moléculas anticâncer. Por apresentar estrutura policíclica e planar, essas moléculas constituem um arcabouço capaz de se intercalar no DNA (Almeida, *et al.*, 2005).

A apoptose é caracterizada por uma intensa vacuolização autofágica do citoplasma e organelas celulares (Ricci e Zong, 2006). Assim, a apoptose pode ser

considerada um importante mecanismo de morte celular induzida por moléculas candidatas a fármacos antineoplásicos.

Este trabalho avaliou o desempenho dos derivados acridínicos LPSF/AC05 e LPSF/AC10 como possíveis agentes de inibição da multiplicação celular e indução da morte das células neoplásicas por apoptose.

OBJETIVOS

Avaliar as possíveis atividades citostáticas e apoptóticas dos derivados acridínicos LPSF/AC-05 e LPSF/AC-10.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado o cultivo de células da linhagem T47-D, de carcinoma mamário humano, obtidas do banco de células do Rio de Janeiro, cultivadas em meio completo – RPMI-1640 com 10% de soro fetal bovino – e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. A troca de meio foi executada sempre que necessário para conservar a viabilidade celular.

Para a avaliação da citotoxicidade dos compostos foi realizado o ensaio de MTT (sal de tetrazolium). As células foram acondicionadas em placas de 96 poços a uma densidade de 1×10^4 em cada poço. Após 24 horas de incubação, os compostos LPSF/AC-05 e LPSF/AC-10 – adquiridos do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF) da UFPE – foram adicionados nas concentrações de 1, 10, 25, 50 e 75 μM , em triplicata. Passadas 72 horas, foram adicionados 20 μL de MTT. Em seguida, 130 μL de SDS (deodecil sulfato de sódio) foram adicionados em cada poço. A leitura da placa ocorreu em espectrofotômetro a 570 nm.

A análise de morte celular por apoptose foi avaliada através do ensaio de citometria de fluxo (Accuri C6, BD Biosciences) após as células terem sido submetidas ao protocolo do kit Anexina-PI (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, BD Biosciences).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os compostos AC05 e AC10 apresentaram atividade citotóxica contra a linhagem T47-D com valores de IC₅₀ 65,20 e 67,98 μM , respectivamente. Além disso, a análise através da citometria de fluxo revelou que os compostos avaliados promoveram a indução de morte por apoptose (Figura 01).

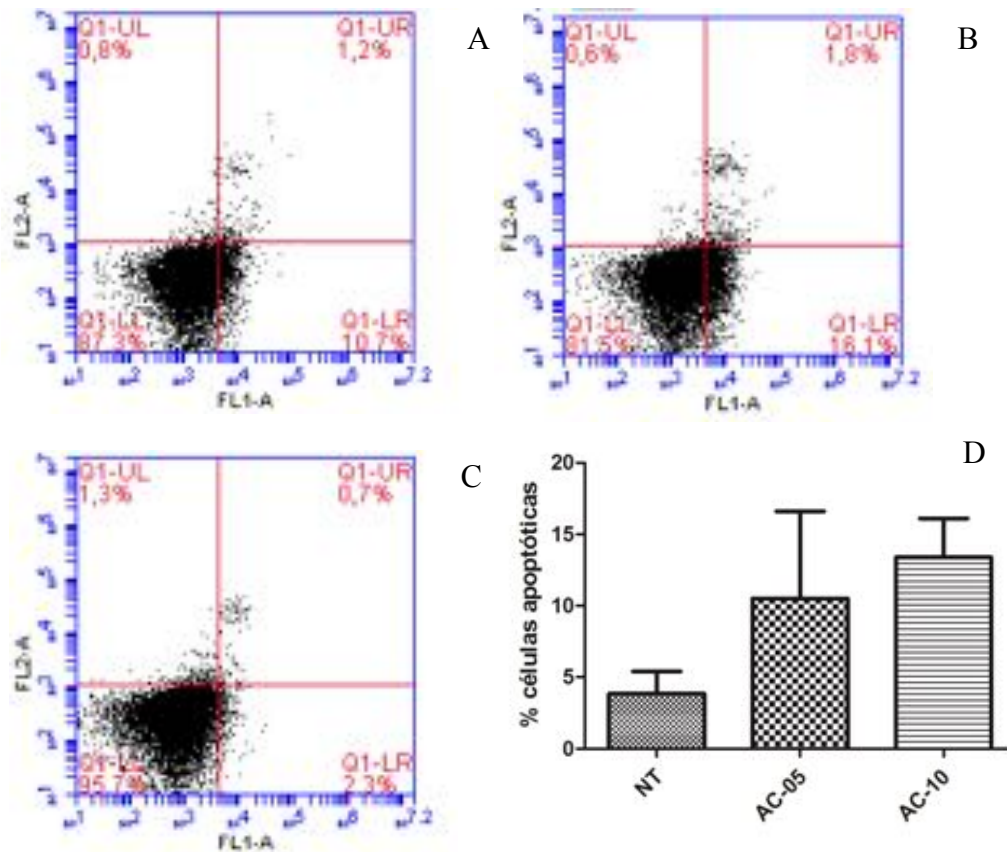


Figura 01 - Efeito dos compostos acridínicos na indução da apoptose. FL2 – Iodeto de propídeo (PI), FL1 (Anexina-FITC). AC-05 (A), AC-10 (B), Não-tratado (C). Gráfico da porcentagem de células apoptóticas por condição, NT (Não-tratado), AC-05 e AC-10 (D).

Por apresentar em sua estrutura química um cromatóforo planar constituído por três anéis aromáticos condensados com um átomo de nitrogênio no anel central, as acridinas e seus derivados são compostos capazes de se intercalar com o DNA interferindo na ação de enzimas importantes para replicação apresentando efeito antiproliferativo (Almeida *et al.*, 2005). A análise realizada por citometria de fluxo demonstrou a manutenção da integridade da membrana e externalização da fosfatidilserina das células tratadas com os compostos testados. A apoptose corresponde a um mecanismo de morte caracterizado por diminuição do volume celular, integridade da membrana, fragmentação nuclear e externalização da fosfatidilserina (Ricci e Zong, 2006). Adicionalmente, estudos com derivados acridínicos estruturalmente semelhantes aos nossos compostos foram capazes de induzir apoptose em linhagens tumorais de pâncreas (Goodell *et al.*, 2008). Dessa forma, podemos sugerir que os derivados acridínicos LPSF/AC-05 e LPSF/AC-10 apresentam potencial anti-proliferativo por indução à apoptose.

CONCLUSÕES

Os derivados acridínicos LPSF/AC-05 e LPSF/AC-10 apresentaram redução da viabilidade celular, principalmente via apoptose, quando testados na linhagem T47D. Assim, mediante futuros testes direcionados para o entendimento do seu mecanismo de ação, pode ser considerado promissor no desenvolvimento de novos fármacos utilizados na terapia anticâncer.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE) e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para a Inovação Farmacêutica (INCT-if).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, V.L.; Leitão, A.; Reina, L.C.B.; Montanari, C.A.; Donnici, C.L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química nova**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

Bonse, S.; Santelli-Rouvier, C.; Barbe, J.; Krauth-Siegel, R.L. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase by acridines: kinetic studies and structure-activity relationships. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington D.C., v. 42, n. 26, p. 5448-5454, 1999.

Girault, S.; Grellier, P.; Berecibar, A.; Maes, L.; Mouray, E.; Lemièrre, P.; Debreu, M.A.; Davioud-Charvet, E.; Sergheraert, C. Antimalarial, antitrypanosomal, and antileishmanial activities and cytotoxicity of bis(9-amino-6-chloro-2-methoxyacridines): influence of the linker. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington D.C., v. 43, n. 14, p. 2646-2654, 2000.

Goodle, J.R.; Ougolkov, A.V.; Hiasa, H.; Kaur, H.; Remmel, R.; Billadeu, D. D.; Ferguson, D. M. Acridine-based agents with topoisomerase II activity inhibit pancreatic cancer cell proliferation and induce apoptosis. **J. Med. Chem.**, v51, p.179-182, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **ABC do Câncer: Abordagens básicas para o controle do câncer**. 2. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2012. ISBN 978-85-7318-201-9

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas**. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro : Inca, 2011.118 p. ISBN 978-85-7318-194-4

Pons, O.R.; Gregorio, D.M.; Mateo, J.V. G.; Calatayud, J.M. Flow-injection analysis study of the chemiluminescent behaviour of proflavine and acriflavine. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 438, n. 1, p. 149-156, 2001.

Ricci, M. S.; Zong, W-X. Chemotherapeutic Approaches for Targeting Cell Death Pathways. **Oncologist**, v. 1, p. 342-357, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, **World Cancer Day**, 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/index.html>>. Acesso em: 13 out 2013.



AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-NOCICEPTIVO DE CAJARANA (*SPONDIAS sp.*) EM ROEDORES

¹K.H.D. OLIVEIRA, ¹D.V. FONSECA, ¹C.R.C. GUEDINE, ¹F.L. CARVALHO,
¹P.R.R. SALGADO, ¹L.C.S.L.M. PORDEUS

¹Laboratório de Psicofarmacologia, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba. Klebya_hellen@yahoo.com.br

Introdução: A busca por terapias com produtos de origem natural deriva da tentativa de soluções para os problemas de saúde, com eliminação ou redução dos efeitos indesejáveis da terapia convencional. O objetivo do estudo foi avaliar uma possível ação anti-nociceptiva do sumo e pectina da polpa de *Spondias sp.*, em roedores. **Métodos:** Camundongos Swiss (*Mus musculus*), machos, pesando em média 34g, foram alocados em diferentes grupos (n: 6), e mantidos sob condições padrões. Os animais receberam água e ração *ad libitum*, e foram tratados por via oral durante 30 dias, de acordo com o protocolo experimental: grupo controle (água: 1mL/100g), PEC (pectina: 100mg/Kg), CAJ I (Sumo: 1mL/100g) e CAJ II (Sumo: 2mL/100g). O teste da formalina, que compreende um modelo bifásico da dor foi realizado. Os dados foram analisados por GraphPad Prism 6, através do teste de Kruskal-Wallis, seguido de Dunn's, e estão expressos em média e erro padrão da média. **Resultados e Discussão:** Durante a fase neurogênica foi observada a redução do comportamento de dor nos grupos PEC (45,1±10,5) e CAJ I (50,1±6,8) quando comparados com controle (83,6±6,5), e redução na fase inflamatória pela CAJ II (20±9,6), comparado com o controle (133,2±27,6). **Conclusão:** *Spondias sp.* demonstrou potencial ação anti-nociceptiva e anti-inflamatória, em modelo animal de dor, diferindo os seus efeitos de acordo com a dose utilizada.

Apoio: CNPq.

Palavras-chave: Spondias, anti-nocicepção, anti-inflamatório.



AVALIAÇÃO DO EFEITO QUIMIOSENSIBILIZANTE E/OU SINÉRGICO DA INIBIÇÃO DE N-GLICOSILAÇÃO POR TUNICAMICINA EM CÉLULAS DE CÂNCER TRATADAS COM AMSACRINA

M. W. L. QUIRINO¹, SILVA FILHO. A. F¹, I. R. PITTA¹, M. G. R. PITTA¹, M. J. B. M. RÊGO¹.

¹ Estudante do Curso de Biomedicina- CCB – UFPE; E-mail: michaelwillla@hotmail.com,² Núcleo de Pesquisa para Inovação Terapêutica Suely Galdino NUPIT-SG, CCB – UFPE

E-mail: moacyroraculo@gmail.com

RESUMO

O presente trabalho foi desenvolvido visando avaliar os possíveis efeitos aditivos e/ou quimiossensibilizante da tunicamicina quando terapeuticamente associada à amsacrina um derivado acridínico utilizado na clínica. Nesse sentido, foram realizados ensaios de MTT, citometria de fluxo, western blotting. Durante o desenvolvimento do projeto foi obtido resultado significativo no efeito quimiossensibilizante na linhagem de câncer de mama (T47D), através do aumento da indução de apoptose e de estresse de retículo endoplasmático, reduzindo a viabilidade celular.

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 a busca de novas moléculas como alternativas terapêuticas no tratamento do câncer, além de novos métodos inovadores, capazes de apresentar resposta mais rápida e eficaz, tendo em vista elevada agressividade e rápida progressão com que grande parte dos tumores se desenvolve (INCA, 2013). Dentre as moléculas envolvidas no processo de resistência ao tratamento, bem como, em outros papéis pró-tumorais como invasão e metástase estão os glicoconjugados, comumente glicolipídeos e glicoproteínas (Hakomori, 2002). O padrão de glicosilação alterado desses conjugados desempenha papel central na tumorigênese. Principalmente via N-glicosilação. O mau enovelamento no retículo endoplasmático gera acúmulo de proteínas que por sua vez, produz nestas organelas estresse de retículo, e como resposta ao mau enovelamento, ocorre uma cascata de sinalização que podem induzir a célula a apoptose (Li J. *et al.* 2006). A tunicamicina é um inibidor da N-glicosilação que também atua como um potente agente quimiossensibilizante derivado da *Streptomyces lysosuperficus* (Sagua, 2009). Dentre as várias moléculas que podem se beneficiar desses efeitos da tunicamicina estão as acridinas, potentes agentes antitumorais que se intercalam ao DNA interferindo em todas as atividades biológicas da célula tumoral

(Denny, 2002). Este trabalho propôs-se estudar, a indução da quimiossensibilização nas células de câncer para diminuir as doses para obtenção da resposta terapêutica, minimizando o custo com tratamento prolongado e os efeitos colaterais desenvolvidos.

OBJETIVOS

Avaliar o efeito sinérgico e quimiossensibilizante da tunicamicina e amsacrina frente às linhagens de células tumorais Raji, Jurkat e T47-D, linfoma, leucemia e câncer de mama, respectivamente, bem como sua seletividade em células Mononucleares do sangue periférico humano (PBMC).

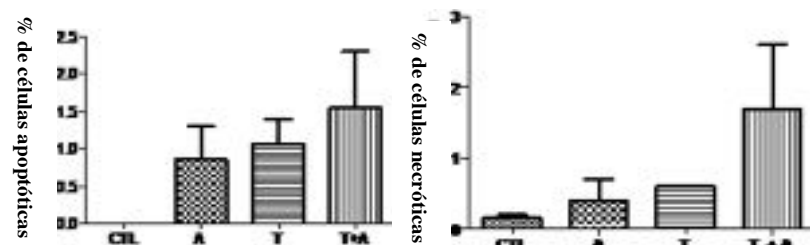
MATERIAIS E MÉTODOS

As linhagens Raji, Jurkat, T47D; linfoma de Burkitt, leucemia aguda de células T e carcinoma ductal humano, respectivamente, obtidas do banco de células do Rio de Janeiro foram cultivadas em meio RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino, em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Para o repique das células aderentes utilizou-se tripsina/EDTA (0,25%). Para analisar o efeito quimiossensibilizante, as células foram distribuídas na densidade de 10⁴ células /poço, em placas de 96 poços, tratadas com tunicamicina (200nM) e incubadas por 24 horas. Após este período, foi adicionada amsacrina (10µM, 1 µM, 500 nM, 100 nM e 50nM) e as placas foram reincubadas nas mesmas condições de cultivo. No ensaio para avaliação do efeito sinérgico a tunicamicina foi administrada simultaneamente com amsacrina durante 24, 48 e 72h para analisar se os mesmos produzem efeito aditivo nas células tumorais. Após incubação as células foram submetidas a testes de citotoxicidade, pelo método do MTT (5mg/ml), adicionado um volume de 20µL/poço. Três horas após a incubação, foram feitas as leituras em espectrofotômetro de placa, a 550 nm. Todos os ensaios de MTT foram realizados em triplicata. As análises de apoptose e necrose foram feitas por citometria de fluxo (Accuri C6, BD Biosciences), através da marcação com Annexin V- eFluor 450, e Iodeto de propídio. Para confirmar a indução do estresse de retículo e apoptose pela tunicamicina foi realizado western blotting com extratos proteicos, separados de acordo com sua massa molecular aparente (SDS-PAGE 10%). Em seguida, as proteínas foram transferidas para a membrana PVDF (*Hydrophobic polyvinylidene difluoride*, Amershan), para a detecção foram utilizados os anticorpos anti-GAD153 e Anti-GRP78, e posteriormente, reveladas.

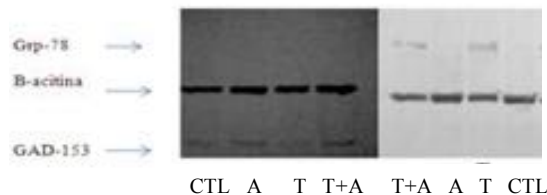
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os compostos testados não apresentaram citotoxicidade frente às células normais, e nem apresentaram resultados significativos quando utilizados simultaneamente (efeito sinérgico). Os ensaios de quimiossensibilização com Raji e Jurkat não obtiveram resultados significativos, já que, mesmo com o aumento da dosagem de tunicamicina a viabilidade celular permaneceu acima de 40% com o tratamento posterior de amsacrina. Visto que, a amsacrina isolada apresenta resultado já satisfatório frente às linhagens tumorais hematopoiéticas (Ketron. *et al.* 2012), a

tunicamicina não foi eficiente em aumentar, ainda mais, a sensibilização dessas células a Amsacrina. O resultado mais satisfatório do efeito quimiossensibilizante dos compostos frente à linhagem T47D foi obtido na concentração de 10 μ M com taxa de morte > 60%. Ainda nesta linhagem, foi verificado através da citometria que a ação da tunicamicina (200nM) e amsacrina (12,5 μ M) proporcionou aumento na indução de apoptose e necrose em comparação com os compostos de forma isolada (Figura 01a). A tunicamicina induziu o estresse de retículo e, conseqüentemente, apoptose em T47D, através do aumento da expressão de GAD-153 (não mostrado) e GRP-78, respectivamente. Isto pode explicar que a utilização da tunicamicina foi condição necessária para conduzir o aumento da morte celular através do estresse de retículo (Figura 02). Fan e colaboradores (2013) mostram que o uso associado de drogas antineoplásicas que possam agir na via de sobrevivência das células tumorais são promissoras para o surgimento de uma nova terapia associada para o tratamento do câncer.



(A)



(B)

Figura 01: A) O primeiro gráfico (direita) indica o percentual de células apoptóticas nos diferentes regimes terapêuticos testados. O gráfico da esquerda indica o percentual de células em necrose. B) As fotos de membranas de western blotting indicam que amsacrina sozinha induz a expressão de GAD153, porém não induz a expressão de GRP-78. O tratamento sensibilizante foi o mais eficiente em aumentar a expressão de ambas as proteínas da via do estresse de retículo. CTL: Controle; A: Amsacrina; T: Tunicamicina, A+T: Sensibilização

CONCLUSÕES

A Tunicamicina mostra-se eficiente como ferramenta sensibilizante para o tratamento com amsacrina na linhagem de câncer de mama (T47D), através da elevação na porcentagem de apoptose celular e indução de estresse de retículo. Esses resultados indicam que a quimiossensibilização com tunicamicina pode representar uma nova e potencial estratégia terapêutica no combate ao câncer de mama.

AGRADECIMENTOS

CAPES, FACEPE, INCT_if, PROPESQ/UFPE

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amaravadi R.K.; Thompson C.B. *Clin Cancer Res.* v.13, n.24, p.7271-9, 2007.

BARROS, Francisco Washington Araújo. Estudo do potencial anticâncer de novos derivados acridínicos sintéticos em modelos experimentais *in vitro*. Fortaleza, CE, 2010. Originalmente apresentado como dissertação de Mestrado em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, 2010.

Bortner, CD. *et al. Trends in Cell Biol.* v.5, n.1, p.21-26, 1995.

Chiu, S-C. *et al.* Induction of Apoptosis Coupled to Endoplasmic Reticulum Stress in Human Prostate Cancer Cells by *n*-butylidenephthalide. *Plos One*; v.7, n.3, 2012.

Delom. F. *et al. Nature Publishing Group*, v.14, p. 586-596, 2007.

Denny, W.A. *Cur. Med. Chem.* v.9, p.1655-1665, 2002.

Hakomori S, *PNAS*, p. 10231-10233, 2002

Instituto Nacional de Câncer, Brasil 2012. Disponível em: <www2.inca.gov.br>
Acesso em: abr. 2012.

Ivana G. *et al. Revista Brasileira de Cancerologia*, v.53 n.3, p.335-343, 2007.

Jun M.S. *et al. Biochemical Pharmacology*, BCP-11518, 2013

Ketron AC, *et al. Biochemistry.* v.51, n.8 p.1730-9, 2012.

Li J. *et al. Curr. Mol. Med.* v.6, p.45-54, 2006.

Oga, S.- *Fundamentos de Toxicologia*. Atheneu, São Paulo, 1996.

Oliveira, L.M.D. Resposta diferencial ao estresse de reticulo endoplasmático em modelo de melanoma murino: implicações para quimiossensibilização. Originalmente apresentado como dissertação de Mestrado. 2010.

Sagua, R.F.B. Acoplamiento espacial entre el retículo endoplásmico y la red mitocondrial durante el estrés de retículo endoplásmico. Originalmente apresentado como dissertação de Mestrado. 2009.

Shiraishi T., *et al. Cancer Res.*, v. 65, p. 6364-6370, 2005.

Varki A. *e.t al. Ess. of Glycob.*, Ed. 2, Cap.44, 2009.



**DETERMINATION PHARMACOKINETICS OF CANDITATE
ANTIMALARIAL IN PLASMA OF RATS.**

LAUREANO, J.V.¹; BARRETO, F.¹; GNOATTO, S.¹; ARAUJO, B.V. DE.¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS

Introduction: The development of new antimalarial drugs remains of the utmost importance, since *Plasmodium falciparum* has developed resistance against nearly all chemotherapeutics in clinical use. In 2008, Gnoatto et al. have synthesized a series of new piperazine derivatives of ursolic acid and tested against *Plasmodium falciparum* strains using in vitro assays, among these derivatives the (N-{3-[4-(3-aminopropyl) piperazinyl]propyl}-3-O acetylursolamide) named LAFIS 10 shows a high level of effect. Justifying pre-clinical pharmacokinetic (PK) investigation proposed in this study.

Materials and Methods: All experiments were previously approved by Ethical Committee in Animal Use of UFRGS (#21979). The quantify LAFIS 10 after i.v. administration of 2.5mg/kg to males Wistar rats (n = 5), were determined using a validated UPLC-MS/MS method. Plasma samples were harvested at pre-determined time points up to 24 h after dosing and processed to determine LAFIS 10. PK parameters were calculated using non-compartmental analysis. **Results and**

Discussion: The plasma concentrations of LAFIS 10 were determined by non-compartmental analysis. The mean area under the plasma concentration-time curve and the t (1/2) were 1980,43 ± 582,77ng.h/mL and 10,99 ± 3,53 h. The volume Vd and Cl were 9,37 ± 7,38 L/kg and 1.37 ± 0.50 L/h.kg, respectively. **Conclusions:** The pk profile of LAFIS 10 was well characterized, showing that the sampling time of 24 h was suitable for determination of parameter settings.

Acknowledgements: Financial support from CNPq/Brazil, INCT, UFRGS, PPGCF and CAPES/Brazil.

Keywords: Antimalarial, Derivate piperazinic, pharmacokinetic.



POTENCIAL FITOTERÁPICO DE ESPÉCIES ARBÓREAS CULTIVADAS AO LONGO DO CANAL DERBY-TACARUNA, RECIFE, PERNAMBUCO, BRASIL

¹ M.A. SANTANA, ² J.M. SILVA, ³ A.B. LIMA-FILHO

¹Arquiteta e Urbanista, Me. Docente da Faculdade do Vale do Ipojuca (FAVIP).
michelesantana@gmail.com

²Biólogo, Doutorando em Desenvolvimento Urbano, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

³Tecnólogo em Radiologia pelo Instituto Federal de Pernambuco (IFPE)

RESUMO

Este trabalho apresenta um levantamento bibliográfico dos registros etnobotânicos, químicos e farmacológicos de espécies arbóreas empregadas na arborização do canal Derby-Tacaruna. O levantamento é parte da pesquisa Estudo Quali-quantitativo da Arborização Urbana de Grandes Eixos Viários, que, dentre seus objetivos, destina-se a caracterizá-la quanto a sua importância ecológica. Desta forma, as espécies encontradas foram investigadas do ponto de vista etnobotânico e farmacológico. Para tanto, compilou-se os dados organizados em ordem alfabética de espécies, seguidas do nome popular, parte usada, forma de uso, atividade farmacológica e composição química. Em 58% das espécies inventariadas encontrou-se na literatura registros de potencial terapêutico.

INTRODUÇÃO

Discutido a nível mundial, o uso de plantas medicinais tornou-se alvo de constantes pesquisas, uma vez que, o emprego destas plantas no processo de combate às enfermidades é uma prática iniciada desde os primórdios da civilização, tendo sempre como objetivo a recuperação da saúde (SOUSA et al., 2008; SOUZA; RIBEIRO 2008).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% usam plantas medicinais ou preparações destas. Este fato tem levado a OMS a posicionar-se quanto à necessidade de valorizar a utilização de plantas medicinais na atenção básica à saúde (ROSA et al., 2011). Se, do ponto de vista etnológico, as práticas tradicionais de medicina fortalecem a cultura, do ponto de vista científico, o estudo das plantas medicinais tradicionalmente empregadas pelas comunidades, fornecer informações úteis para a elaboração de estudos farmacológicos e fitoquímicos, com grande economia de tempo e dinheiro (BRASILEIRO et al., 2008).

Este caminho tem se firmado como uma metodologia viável para o estudo farmacológico e fitoquímico, pois estudos tem comprovado que, em muitos casos, tem-se a comprovação científica da base empírica, atendendo o binômio segurança e eficácia exigida pelos órgãos de controle de medicamentos (SILVEIRA et al., 2008). Este fato tem incentivado pesquisadores e indústrias farmacêuticas a investir mais nas pesquisas desta natureza, tendo em vista a utilização dos princípios ativos como protótipos para a descoberta de fontes e/ou modelos para a produção de novos fármacos menos tóxicos e mais eficazes (FRANCO & MAIA, 2009).

OBJETIVOS

Apresentar os resultados do levantamento bibliográfico dos registros etnobotânicos, químicos e farmacológicos de 31 espécies arbóreas largamente empregadas na arborização urbana, em Pernambuco, mais especificamente do canal Derby-Tacaruna.

MATERIAIS E MÉTODOS

Caracterização da Área de Estudo: O canal Derby-Tacaruna que está situado ao longo da Avenida Agamenon Magalhães na cidade do Recife, Pernambuco, e possui uma extensão de 5km. O clima da cidade é do tipo As' - tropical chuvoso, quente e úmido, com temperaturas médias mensais superiores a 23°C, apresentando um período de alta umidade entre os meses de março e agosto, com precipitações máximas ocorrendo em junho e julho.

Coleta do Material Botânico e Tratamento Sistemático: Para o levantamento florístico usou-se o método de censo. Para tanto fez-se uso do seguinte protocolo: Localização e identificação, quantitativo de indivíduos geral e por espécies e o nome científico e vulgar. A identificação taxonômica dos espécimes foi realizada *in loco* - apenas para espécies conhecidas, as demais tiveram material botânico coletado e comparado com exsicatas do *Neotropical Herbarium Specimens* e do *Neotropical Live Plant Photos* seguindo o sistema de classificação do *Angiosperm Phylogeny Group III*.

Levantamento Bibliográfico: Foram compilados trabalhos etnobotânicos, etnoecológico, etnofarmacológicos, taxonômicos, químicos e florísticos que citassem plantas medicinais, bem como suas possíveis atividades terapêuticas fazendo-se uso principalmente do portal eletrônico SciELO_{Brasil}. Os trabalhos incluídos nesta revisão foram publicados em revistas indexadas, reconhecidas nacional e internacionalmente. As principais revistas foram: *Journal of Ethnopharmacology*, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *Brazilian Journal of Microbiology*, Revista Brasileira Farmacognosia, Revista Brasileira Farmácia, Revista Brasileira de Plantas Medicinais, Megadiversidade, Química Nova e Ciência Florestal.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A vegetação foi representada por uma biota composta por 817 indivíduos pertencente a 31 espécies, 26 gêneros e 10 famílias botânicas. Para um total de 18 espécies (58,06%) foram encontrados na literatura registros referentes à atividade etnofarmacológica e/ou etnobotânica (Tabela 1).

O potencial terapêutico mais relatado para as espécies encontradas na área de estudo foram: antiinflamatória com 61,11%, antidiarreica com 38,88%, antidiabética e adstringente com 27,77%, cada uma; e anticancerígena, purgativa, antitumoral, antimicrobiana com 22,22%, cada uma. Este fato, provavelmente está relacionado, com os constituintes químicos majoritários encontrados, que foram direcionados aos terpenos (44,44%), flavonóides (16,66%) e taninos (44,44%) relacionados com os constituintes mais relatados nas espécies inventariadas, uma vez que, a literatura divulga que os terpenos apresentam atividades bactericida, bacteriostática, fungicida, antiviral, antiparasitária, inseticida e analgésica. Os flavonóides apresentam atividades antimicrobiana, antiviral, antiulcerogênica, antineoplásica, antioxidante, antihepatotóxica, antihipertensiva, hipolipidêmica, antiinflamatória, antiplaquetária (MACHADO et al., 2008) e os taninos são indicados para o tratamento de diarreias, antiinflamatórios, feridas, queimaduras, gástricos e hipertensão (HASLAM, 1996).

Tabela 1. Espécies arbóreas com potencial terapêutico cultivadas ao longo do canal Derby-Tacaruna, Recife, Pernambuco.

Espécie	Parte vegetal usada	Compostos fitoquímicos	Atividade etnofarmacológica e/ou etnobotânica	Referências
<i>Anacardium occidentale</i>	Casca, entrecasca e fruto.	Esteroídes, flavanóides, tanino, catequinas, carotenóides, ácido (orgânicos, gálico, siríngico, anacárdico), cardol, β-sitosterol, epicatequina, triterpenóides, tocoferóides, galocatequina.	Antidiabética, adstringente, antidiarreica, depurativa, tônica, antiasmática, antisséptico, antiinflamatória, anti-helmíntica e moluscida.	SOUSA (1991), ROBINEAU (1995), MATOS (2000).
<i>Annona asiatica</i>	Folha, fruto, semente, raiz.	Acetogenina, asimicina, bulatacina, bulatacinona, escuamocina, diterpenos, saponinas, acetogenina, 16b, 17 ácido didroxikaurânico-19.	anti-helmíntica, antidiarreica, anti-HIV, antiinflamatória, anticancerígena.	HERNANDEZ; ANGEL (1997), OLIVEIRA et al. (2000).
<i>Caesalpinia echinata</i>	Casca, semente	Tanino, diterpenos, flavonóides, braziliina, brazileína.	Antidiarreica, antidisentérico, adstringente anticancerígena, pró-inflamatória, antifúngico.	SILVA (2001), CRUZ SILVA et al. (2004).
<i>Cassia fistula</i>	Fruto, folha, flor, raiz.	Reína, senidinas, pectinas, lupeol, flavonóides, antraquinonas, esteróides.	Antiofídico, laxativa, purgativa, antiviral, antirreumática, hepatoprotetora, antifúngica antiinflamatória e antitumorral, antiemátice, antiofídica, antibacteriana.	SAMY; IGNACIMUTHU; SEN (1998), SAMY;IGNACIMUTHU(2000).
<i>Ficus benjamina</i>	Folha, fruto.	Alcalóides, cumarinas, flavonóides, terpenóides e taninos.	Bactericida, antibacteriana.	MOUSA et al. (1994), CARALUTA; DIAZ (2002).
<i>Hibiscus tiliaceus</i>	Folha, flores, fruto.	Gossipetina, quercetina, kaempferol, β-sitosterol, kaempferol-3-O-galantósido, quercetina 3-O-β-D-galactósido e ácido p-coumárico, hibisconas, lapachol.	Antidiabética e hipolipídica, antidiarreica, antiinflamatória.	NAIR et al. (1961); SUBRAMANIAN et al. (1973), SADAQUAT et al. (1980).
<i>Hymenaea courbaril</i>	Casca, folha.	Terpeno, fenólico	Carminativa, sedativa, adstringente, descongestionante, fungicida, prostatice antimicrobiana, antidiarreica, moluscicidas, antibacteriana, afecções urinárias.	CRUZ (1965), SOUZA (1974), GIRAL (1979).
<i>Mangifera indica</i>	Folha, fruto	Ácido gálico, benzofenona, flavanóis, antocianinas, heterosídeos flavonóis, heterosídeo xantônico.	Neuroprotetora, cardioprotetora, antialérgica hepatoprotetora, anticancerígena, antioxidante, antiinflamatória, antidiabética, antiobesidade, gastroprotetora, antineuraminidase, nefroprotetora, antiosteopose, antidiarreica, anti-herpes, anti-HIV, anti-helmíntica.	MAKARE et al. (2001), OJEWOLE (2005), PARDO-ANDREU et al. (2008).

<i>Parkinsonia aculeata</i>	Folha, ramo novos, casca, semente.	Triterpenoides, flavonoides, esteroides.	Antipiréticos, bactericida, sudoríficos, antiepiléptica, ação hipotérmica, hipotensora, estimulante do músculo esquelético, antimármica, antiespasmódica, antiinflamatória, depressora do SNC.	SOUZA (1985), AGRA (1996); MORS et al. (2000).
<i>Plumeria rubra</i>	Casca, látex	Terpenos, iridóides, cumarinas, alcalóides, quininas, flavonóides.	Emenagogo, purgativa, bactericida, antitumoral, anticancerígena.	KAZMI et al. (1989), KARDONO et al. (1990), SIDDIQUI et al. (1990).
<i>Psidium guajava</i>	Folha, semente.	Sesquiterpenos, taninos, β -sitosterol, triterpenoides, quercetina e arabinoguercetina.	Antidiarreico, antiinflamatória, antiinfecçiosa, reidratante.	SOUZA et al. (1991), ROBINEAU (1995), MATOS (2002).
<i>Schinus terebinthifolia</i>	Casca, folha e fruto.	Tanino, biflavonoides, ácidos triterpênicos, serquitequinos, mono, alquil-fenóis.	Antiinflamatória, cicatrizante, antimicrobiana, anti-hemorroidas, antibiótica, cervicite.	REICHERT (1945), GRUENWALD (2000), MATOS (2002).
<i>Spondias mombin</i>	Folha, ramo.	Taninos, ácido cafeico.	Adstringente, prostateite, antibacteriana, moluscida, antiviral (herpes labial, angina herpética e Cocksaquii).	DIAS-DA-ROCHA (1945), ROBINEAU (1995), MATOS (2002).
<i>Syzygium jambolanum</i>	Folhas, flores, fruto, semente.	Taninos, fenóis, flavonas, flavonóis, xantonas, catequinas, saponinas.	Homeopática, adstringente, anti-hemorragico, antidiabética, antidisentérico, leucorréia, hipoglicemiante, antibacteriano.	POZETTI (1989), VÉRAS (2000).
<i>Tabebuia imperiginosa</i>	Casca.	Lapachol, lapachona, quercetina, ácido hidroxibenzóico.	Antiinfecçiosa, antifúngico, diurético, adstringente, antitumoral, antieoplásica, antimicrobiana, anticercária, anticoagulante, antiinflamatória, doença de Parkinson.	WANICK et al. (1970), OLIVEIRA et al. (1990), SOUSA et al. (1991).
<i>Tabebuia caraliba</i>	Casca, entrecasca, folha.	Triterpenos, indóides	Abortivo, purgativas, antissifítica, gripes, resfriados.	MARTINEZ-CROVETTO (1981), AGRA (1996).
<i>Tamarindus indica</i>	Fruto, folha.	Ácido tartárico livre, tartarato ácido de potássio, pectina	Laxante, antioxidante, antimicrobiana, regulador intestinal, litase renal, antiinflamatória.	ROBINEAU (1995), BOWN (1995), BORHEM (1999).
<i>Terminalia Catappa</i>	Folha e fruto	Taninos	Antidiarreica, hepatoprotetora, antidiabética, antitumoral, antibacteriano, antitérmico, antioxidantes e antiinflamatória, antiipirética e anti-hepatoma.	LIN (1992), LIN et al. (1997), CHEN et al. (2000).

CONCLUSÕES

Os resultados do estudo demonstram que a área estudada possui uma grande diversidade de plantas medicinais, mesmo se tratando de uma área relativamente pequena. Portanto, apontamos para a necessidade de intensificar as pesquisas formais correlacionadas às plantas medicinais tradicionais, frente ao alto índice de substâncias fármaco-ativas encontradas. Também é necessária a conservação do patrimônio genético e do registro etnográfico do conhecimento dos mateiros e curandeiros, por figurarem como matéria prima e fonte de pesquisa para futura produção de novos fitoterápicos e/ou fitofármacos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRA, M.F. **Plantas da medicina popular dos Cariris velhos, Paraíba, Brasil**. João Pessoa: Editora União, 1996. (1996),

BOORHEM, R.L. **Segredos e virtudes das plantas medicinais**. Rio de Janeiro: Reader's Digest Brasil Ltda, 1995. (1999).

BOWN, D. **The herbs Society of America: encyclopedia of herbs & their use**. New York: Dorling Kindersley Publishing, 1995. (1995).

BRASILEIRO, B.G.; PIZZIOLLO, V.R.; MATOS, D.S.; GERMANO, A.M.; JAMAL, C.M. Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no Programa de Saúde da Família, Governador Valadares, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 629-636, 2008.

CARAUTA, J.P.P.; DIAZ, B.E. **Figueiras no Brasil**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2002.

CHEN, P. S.; LI, J. H.; LIU, T. C. Folk medicine of *Terminalia catappa* and its major tannin component, punicalagin, are effective against bleomycin-induced genotoxicity in Chinese hamster ovary cells. **Cancer Letters**, estado, v.152, p. 115-122, mês. 2000.

CRUZ, G.L. **Livro verde das plantas medicinais e industriais do Brasil**. Belo Horizonte: S/i, 1965.

DIAS-DA-ROCHA, F. **Formulário terapeutico de plantas medicinaes cearenses, nativas e cultivadas**. Fortaleza: Tipografia Progresso, 1945.

FRANCO, E.S.; MAIA, M.B.S. Avaliação pré-clínica da toxicidade e atividade cicatrizante de uma formulação semi-sólida do óleo de linha (*Linum usitatissimum* L.). **Programa de Pós-Graduação em inovação terapêutica: descortinando a interdisciplinalidade / organizador Galdino, SL [et al.]**; Recife: Ed. Universitária da UFPE, p134, 2009.

GIRAL, F. Ethnopharmacognostic observations of panamanian medical plants. Part 1. **Q. J. Crude Drug Res**, estado, v. 167, n. 3/4, p. 115-130, mês. 1979.

GRUENWALD, J. **Physicians desk references (PDR) for herbal medicines**. New Jersey: Med. Econ. Co., 2000.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v.59, n. s/n, p. 205-215, 1996.

KARDONO, L.B.S.; TSAURI, S.; PADMAWINATA, K. PEZZUTO, J.M.; KINGHORN, A.D. Cytotoxic constituents of the bark of *Plumeria rubra* collected in Indonesia. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 6, p. 1447-1455, 1990.

KAZMI, S.N.; AHMED, Z.; AHMED, W.; MALIK, A. Plumerinine-a novel lupine alkaloid from *Plumeria rubra*. **Heterocycle**, v.29, n. 10, p. 1901-1906, 1989.

LIN, C.C. Study on the tannins and related compounds in the fruit of *Terminalia catappa* L. **Journal of Chinese Medicine**, v. 14, p.165-174, 1992.

LIN, C. C.; CHEN, Y. L.; LIN, J. M; UJIIE, T. Evaluation on antioxidant and hepatoprotective activity of *Terminalia catappa*. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 25, n. 2, p. 153-161, 1997.

MACHADO, H. et al. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 26, n. s/n, p.37-47, 2008.

MAKARE, N.; BODHANKAR, S.; RANGARI, V. Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, n. s/n, p. 133-137, 2001.

MARTINEZ-CROVETTO, R. Fertility-regulating plants used in popular medicine in Northeastern Argentina. **Parodiána**, estado, v. 1, n. 1, p. 97-117, mês. 1981.

MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais**: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2000.

MATOS, F.J.A. **Farmácias vivas**: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades. Fortaleza: Edições UFC, 2002.

MORS, W.B.; RIZZINI, C.T.; PEREIRA, N.A. **Medicinal plants of Brazil**.Michigan: Algonac, 2000.

MOUSA, O. et al. Bioactivity of certain Egyptian *Ficus* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v.41, n.1-2, p.71-6, 1994.

NAIR, A.G.R.; SUBRAMANIAN, S.S. ; SWAMY, M.N. Glycosides from the flowers of *Hibiscus tiliaceus*. **Journal of Science Indian Research**, v. 20-B, n. s/n, p. 553-554, 1961.

OJEWOLE, J. A. O. Antiinflammatory, analgesic and hypoglycemic effects of *Mangifera indica* Linn. (Anacardiaceae) stem-bark aqueous extract. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, v. 27, n. s/n, p. 547-554, 2005.

OLIVEIRA, A.B.; ALMEIDA, E.R.; SILVA FILHO, A.A. Estrutura química e atividade biológica de naftoquinonas de bignoniáceas brasileiras. **Química Nova**, v.13, n.4, p. 302-307, 1990.

PARDO-ANDREU, G. L.; BARRIOS, M.F.; CURTI, C.; HERNÁNDEZ, I.; MERINO, N.; LEMUS, Y.; MARTINEZ, I.; RIA, O. A.; DELGADO, R. Protective effects of *Mangifera indica* L extract (Vimang), and its major component mangiferin, on iron induced oxidative damage to rat serum and liver. **Pharmacological Research**, v. 57, n. s/n, p. 79-86, 2008.

POZETTI, G.L. **Controle de qualidade em homeopatia**. Ribeirão Preto: Instituto Homeopático François Lamasson, 1989.

REICHERT, B. **Tratado de farmácia practica**. Barcelona : Editorial Labor, 1945. (1945),

ROBINEAU, L.G. **Hacia uma farmacopea caribeña/TRAMIL 7**. Santo Domingo: Enda-Caribe UAG & Universidad de Antioquia, 1995.

ROSA, C.; CÂMARA, S.G.; BÉRIA, J.U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciências & Saúde Coletiva**, v, 16, n. 1, p. 311-318, 2011.

SADAQUAT, A.; PAHUP, S.; THOMSON, R.H. Naturally occurring quinones. Oart 28. Sesquiterpenoid quinones and related compounds from *Hibiscus tiliaceus*. **Journal of the Chemical Society, Pekin I**. v.1, n. 1, p. 257-259. 1980.

SIDDIQUI, S.; SIDDIQUI, B.S.; NAEED, A.; BEGUM, S. Three pentacyclic triterpenoids form the leave os *Plumeria obtusa*. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 5, p. 1332-1336, 1990.

SILVEIRA, P.F.; BANDEIRA, M.A.M. & ARRAIS, P.S.D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n. s/n, p.618-626, 2008.

SOUZA, M.P. Molluscicidal activity of plants from Northeast Brazil. **Revista Brasileira de Pesquisa Médica e Biológica**, v. 7, n. 4, p. 389-394, 1974.

SOUZA, A.E.F.; RIBEIRO, V.V. Perfil dos raizeiros e estudos de suas indicações acerca das plantas medicinais utilizadas no tratamento das doenças do trato respiratório. **Revista de Biologia e Farmácia**, v.3, n. n/s, p.102-109, 2008.

SOUSA, F.C.F. ; MELO, C.T.V.; CITÓ, M.C.O.; FÉLIX, F.H.C.; VASCONCELOS, S.M.M.; FONTELES, M.M.F.; BARBOSA-FILHO, J.M.; VIANA, G.S.B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.18, n. s/n, p. 642-654, 2008

SOUSA, M.P.; MATOS, M.E.O.; MATOS, F.J.A. **Constituintes químicos de plantas medicinais brasileiras**. Fortaleza: Imprensa Universitária/UFC, 1991.

SOUZA, P.S. **Constituintes químicos e triagem farmacológica de *Parkinsonia aculeata* L.** 1985. 110f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1985.

SUBRAMANIAN, S.S.; NAIR, A.G.R. Chemical constituents of the fruits of *Hibiscus tiliaceus*. **Current Science India**, v.42, n. 21, p. 770-771, 1973.

VÉRAS, R.C. **Variação da composição química de folhas de *Syzygium jambolanum* D.C. em diferentes períodos de coleta.** 2000. 69f. Monografia (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2000.

WANICK, M.C.; BANDEIRA, J.A. ; FERNANDES, R.V. Ação anti-inflamatória e cicatrizante do extrato hidroalcoólico do liber do pau d'arco rôxo (*Tabebuia avellanedae*), em pacientes portadores de cervicite e cervo-vaginites. **Revista do Instituto de Antibiótico**, v. 10, n. 1/2, p. 1-3, 1970.



3º Encontro Brasileiro
para Inovação Terapêutica

1 Workshop
Rede RISH
Rede de Inovação em Insumos
para Saúde Humana

II Workshop
Estabilidade de Fármacos
e Medicamentos

21 e 22/10/2013
Campus UFPE

23 a 25/10/2013
Dorisol Recife
Grand Hotel

Interligando competências científicas, tecnológicas e industriais em espaços de saúde

ALVOS TERAPÊUTICOS E BIOMARCADORES



ANÁLISE IMUNO HISTOQUÍMICA E RELATO DE UM CASO DE CARCINOMA MUCINOSO ASSOCIADO À CARCINOMA DUCTAL INVASIVO

¹BARBOSA, B. T.; ^{1,2}SILVA FILHO, A. F.; ¹BEZERRA, M. F.; ^{1,2,4}RÊGO, M.J.B.M.; ³JUNIOR, H. M. F.; ^{1,4}BELTRÃO, E. I. C.

¹Laboratório de Patologia, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco (LIKA-UFPE) brunotrajanobarbosa@outlook.com

²Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT-UFPE)

³Sector de Anatomia Patológica do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP)

⁴Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco

RESUMO

O carcinoma mucinoso de mama é um raro tipo morfológico de carcinoma invasivo caracterizado por um bom prognóstico e que pode ser encontrado associado a outros tipos neoplásicos. Devido à ausência de dados, foi desenvolvido um estudo que procura analisar a expressão de biomarcadores recentemente associados com fatores clínicos ou que possibilitam uma melhor compreensão do comportamento tumoral. Para isto, foram realizados experimentos imuno-histoquímicos para P53, BRCA1 e 2, Ki-67, MUC-1, Gal-1 e Gal-3 com amostras parafinizadas de uma paciente que foi acometida por um carcinoma mucinoso associado a um componente ductal invasivo. As análises ao microscópio mostraram que mesmo presente numa mesma massa tumoral, os diferentes tipos morfológicos possuem padrões moleculares distintos.

INTRODUÇÃO

O carcinoma mucinoso (CM) de mama é um raro tipo histológico bem diferenciado caracterizado por grande produção de mucina. Com pacientes de idade média de diagnóstico entre 55 e 60 anos, o CM representa cerca de 1% à 4% de todos os cânceres de mama. Está associado a uma baixa taxa de recorrência e não costuma apresentar metástases linfonodais. (BARKLEY *et al* 2008). Entretanto, apenas uma pequena porcentagem dos carcinomas mucinosos são puros, havendo tumores que além da porção mucinosa apresentam outros tipos de carcinoma, como o carcinoma ductal invasivo (CDI), o qual comumente realiza metástase para os linfonodos axilares e cujo prognóstico é frequentemente mais severo que os demais (BAE *et al*, 2011).

Diante deste contexto, o uso de biomarcadores é de suma importância para subtipagem molecular do câncer de mama, determinação da terapêutica e do prognóstico. Alguns destes biomarcadores, como o receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP), receptor do fator de crescimento epidermal humano tipo 2 (HER-2) e a proteína de proliferação celular (Ki-67), já são bem aceitos e utilizados na clínica. (HARBERCK, THOMSEN, GNANTC, 2013).

Enquanto outros potenciais biomarcadores vêm sendo utilizados e experimentados para um melhor entendimento da biologia tumoral, são eles os genes supressores tumorais BRCA1, BRCA2, atuantes na via de reparo homólogo do DNA, P53, envolvido em diversas vias que controlam a proliferação celular, a apoptose e o reparo do DNA, e as glicoproteínas mucina-1, galectina 1 e galectina 3, associadas à vias que levam à progressão e proteção tumoral (OSBORNE; WILSON; TRIPATHY, 2004; KUFÉ, 2012; HITTELET *et al*, 2013).

OBJETIVOS

Este relato tem como objetivo traçar o perfil molecular da amostra de carcinoma mucinoso misto para melhor entendimento do prognóstico da doença.

RELATO DE CASO

Em 2012, uma paciente de 44 anos, na pré-menopausa, cuja menarca foi aos 12 anos, fazia uso de contraceptivos orais, com um filho e sem histórico de câncer na família foi ao mastologista queixando-se de inchaço e vermelhidão na mama esquerda. Realizou mamografia e core-biopsy os resultados revelaram um tumor de 8,0x4,0 cm e foi diagnosticado com carcinoma mucinoso associado à carcinoma ductal invasivo, a imunohistoquímica foi positivo para RE e negativo RP e Her2, com estadiamento T2N2M1, a paciente foi submetida a quimioterapia neoadjuvante com 4 ciclos antraciclina e 12 ciclos de taxano, foi submetida a uma ressonância magnética que sugeriu acometimento linfonodal e metástase. Após a terapia neoadjuvante a paciente foi submetida a mastectomia radical e esvaziamento linfonodal.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostra

Biópsia em parafina de tumor diagnosticado como carcinoma mucinoso de mama foi obtido do Setor de Anatomia Patológica do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), Recife, PE. 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). Todos os dados relacionados à paciente e relatados nesse trabalho foram obtidos do seu prontuário arquivado no IMIP.

Imunohistoquímica

A técnica foi realizada através da imuno-histoquímica de acordo com RÊGO *et al*, (2011), utilizando os anticorpos anti-BRCA1 (I-20) diluição 1: 150, anti-BRCA2 (H-299) diluição 1:50, anti-Ki-67 (Ki-67) com diluição 1:50 obtidos da Santa Cruz Biotechnology (CA, USA), anti-Gal-3 e anti-Gal-1 com diluição 1: 150 e monoclonal p53 (Do-7) com diluição 1: 100 obtido da Dako (Bucks, UK). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico Nikon Eclipse 50i acoplado a câmera digital Nikon DS-Fi1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os achados imunohistoquímicos revelaram que o tecido apresentou-se totalmente negativo para presença de mutação do gene P53, enquanto os marcadores BRCA1 e BRCA2 encontraram-se expressos em componentes distintos, com BRCA1 associado ao componente mucinoso e BRCA2 limitado ao CDI. Logo estes subtipos de carcinoma invasivo possuem diferentes padrões de expressão molecular, tal achado indica que as diferentes áreas podem apresentar distintos processos de malignização e ainda, que podem ter surgido de maneira independente.

A negatividade ao marcador de proliferação celular Ki-67 foi condizente com o trabalho de Y. Erhan *et al*, que apresenta apenas 9% de positividade.

MUC-1 está frequentemente presente na membrana plasmática no polo apical de células do epitélio normal mamário, porém o aumento de sua expressão é um fenômeno comum observado em tumores de mama e vem sendo correlacionado com positividade para RE (DO *et al*, 2013). Na amostra, MUC-1 foi observada no citoplasma e membrana apical do CM e apenas na membrana apical CDI. A positividade da expressão de MUC1 indica a manutenção da polaridade celular, caracterizando um tipo celular mais diferenciado, sendo indicativo de um bom prognóstico.

Semelhante à MUC-1, Gal-3 teve sua marcação presente na membrana apical das células do componente invasivo, por outro lado, a presença de Gal-1 foi restrita às células estromais associadas ao tumor. A presença apical de Gal-3 tem sido relacionada com interações célula-célula e célula-matriz extracelular por diversos estudos (Yu *et al*, 2007), porém vale ressaltar que MUC-1 fornece diversos sítios de ligação para esta glicoproteína (Weissenbacher *et al*, 2011). Já a presença estromal de Gal-1 foi relatada em tumores mamários por Rêgo *et al* (2013). Ambas são frequentemente envolvidas com a proteção contra a morte da célula neoplásica e sua expressão pode estar relacionado com um microambiente mais permissivo ao desenvolvimento do tumor.

CONCLUSÕES

Os biomarcadores selecionados para o estudo validados na rotina clínica (PR, ER, HER-2 e Ki-67) e mais específicos (avaliação das proteínas expressas pelos genes BRCA1, BRCA 2 e p53, e glicoproteínas MUC-1, Gal-1 e Gal-3) possibilitaram um melhor entendimento e correlação dos aspectos morfológicos e moleculares do carcinoma de mama mucinoso misto.

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.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAE, S. Y.; CHOI, M.; CHO, D. H.; LEE, J. E.; NAM, S. J.; YANG, J. Mucinous Carcinoma of the Breast in Comparison with Invasive Ductal Carcinoma: Clinicopathologic Characteristics and Prognosis. **J Breast Cancer**. December; v. 14, n.4, p. 308-313. 2011.

BARKLEY, C. R., J. A. LIGIBEL, *et al.* "Mucinous breast carcinoma: a large contemporary series." *Am J Surg* **196**(4): 549-551. (2008).

CIANFROCCA, M., GRADISHAR, W. New molecular classifications of breast cancer. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 59, n. 5, p. 303-313, 2009.

DO, S.; KIM, K.; KIM, D.; CHAE, S. W.; PARK, Y. L.; PARK, C. H.; SOHN, J. H. Associations between the Expression of Mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6) and Clinicopathologic Parameters of Human Breast Ductal Carcinomas. **J Breast Cancer**. V. 16. N.2. p. 152-158. 2013.

HARBECKA, N.; THOMSEN, C.; GNANTC, M. St. Gallen 2013: Brief Preliminary Summary of the Consensus Discussion. **Breast Care**. V. 8. P. 102–109. 2013.

HITTELET A, LEGENDRE H, NAGY N, BRONCKART Y, PECTOR JC, SALMON I, YEATON P, GABIUS HJ, KISS R, CAMBY I. Upregulation of galectins-1 and -3 in human colon cancer and their role in regulating cell migration. **Int J Cancer**. V. 20. N. 103. P. 370-9. 2013.

KUFE, D. W.; MUC1-C Oncoprotein as a Target in Breast Cancer; Activation of Signaling Pathways and Therapeutic Approaches. **Oncogene**. V. 28. N. 32. P. 1073–1081. 2013.

OSBORNE, C.; WILSON, P.; TRIPATHY, D. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer: Potential Diagnostic and Therapeutic Applications. **The Oncologist** . v. 9. n. 4. P. 361-377. 2004.

PARK, S.; KOO, J.; KIM, J.; YANG, W. I.; PARK, B.; LEE, K. S. Clinicopathological Characteristics of Mucinous Carcinoma of the Breast in Korea: Comparison with Invasive Ductal Carcinoma-Not Otherwise Specified. **J Korean Med Sci**. v. 25. P. 361-8. 2010.

RÊGO, M. J. B. M. ; MELO, G. S. V. ; **SANTOS, C.A.S.** ; Chammas R. ; **BELTRÃO, E. I. C.** . Implications on glycobiological aspects of tumor hypoxia in breast ductal carcinoma in situ. **Medical Molecular Morphology**. p. 1, 2013.

RÊGO, M. J. B. M. ; **Cavalcanti, C.L.B.** ; **BELTRÃO, E. I. C.** ; **Sobral A.P.V.** . HISTOCHEMICAL LOCALIZATION OF CARBOHYDRATES IN MORPHOLOGICAL STAGES OF DEVELOPING HUMAN MINOR SALIVARY GLANDS: A COMPARATIVE STUDY WITH CYTOESKELETAL MARKERS. **International Journal of Morphology**. v. 29, p. 604-613, 2011.

YU, L.; ANDREWS, N.; ZHAO, Q.; MCKEAN, D.; WILLIAMS, J. F.; CONNOR, L. J.; GERASIMENKO, O. V.; HILKENS, J.; HIRABAYASHI, J.; KASAI, K.; RHODES, J. Galectin-3 Interaction with Thomsen-Friedenreich Disaccharide on Cancer-associated MUC1 Causes Increased Cancer Cell Endothelial Adhesion. **The Journal of Biological Chemistry**. V. 282. n. 1. p. 773–781. 2007.



AUMENTO NOS NÍVEIS SÉRICOS DE INTERLEUCINA-9 ASSOCIADO COM A GRAVIDADE DA PSORÍASE

P.R.G. CARDOSO², E.A. LIMA^{1,2}, M.A. LIMA¹, M.C. PEREIRA², M.J.B.M. REGO², C. MARQUES¹, I.R. PITTA², A.L.B.P. DUARTE¹, M.G.R. PITTA²

1. Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.
2. Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), Núcleo de Pesquisa em Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas Suely Galdino (Nupit SG), UFPE, Recife, Brazil.

Resumo

Psoríase é uma doença enigmática e recorrente. A etiologia e a patogênese da Psoríase continuam pouco conhecidos, e até o momento a enfermidade vem sendo tratada como uma desordem inflamatória das vias Th1/Th17. IL-9 está implicada no desenvolvimento de lesões similares a psoríase em ratos transgênicos, associada a Th17. O estudo buscou analisar os níveis séricos de IL-9 em voluntários com psoríase e saudáveis, correlacionando com a gravidade da doença. A gravidade da Psoríase foi avaliada por Área de Psoríase e Severidade (PASI). Os níveis de IL-9 foram medidos por teste ELISA. IL-9 apresentou-se maior em pacientes doentes do que em controles saudáveis ($P < 0,0001$), bem como foi positivamente correlacionada com a pontuação do PASI ($P = 0,0089$).

Introdução

A Psoríase é uma doença mediada por células T, crônica, caracterizada por infiltrado inflamatório, hiperproliferação de células epidérmicas e dilatação de microvasos. Afeta cerca de 3% da população mundial, com um impacto na qualidade de vida destes pacientes^{1,2}. Além disso, foi relatado que pacientes com Psoríase correm maior risco de desenvolver síndrome metabólica e complicações cardiovasculares^{3,4}.

O mecanismo de desenvolvimento da Psoríase permanece obscuro. Sabe-se que o processo patológico final que leva a manifestações na pele e comorbidades é a inflamação crônica de uma resposta imune Th1/Th17^{5,6}. Tem-se observado em pacientes com psoríase cutânea uma expressão sistêmica considerável de citocinas pró-inflamatórias como o interferon-gamma (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF) e

outras interleucinas (IL-1, IL -6 , IL- 8, IL -12, IL -15 , IL -17 , IL -18 , IL -19 , IL -20 , IL -22 , IL -23)^{7,8}.

A IL-9 é uma citocina com atividades pleitrópicas, inclusive como fator de crescimento para os mastócitos e células T. Esta citocina é um membro da família da IL-2, secretada pelas células T CD4+ naïve, em resposta a TGF- α e IL-4¹⁰⁻¹².

As doenças inflamatórias e auto-imunes associadas a via Th17 podem ser ativadas pela IL-9 e, IL-9 também é produzida pelas células Th-17, como na dermatite atópica, artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico e algumas outras doenças^{12,13}. De acordo com estas evidências, as células Th17 podem expressar o receptor da IL-9^{9,14,15}. E, além disso, estudos *in vitro* demonstraram a produção de IL-17 a partir de células Th17 na presença de IL-9 isolada ou em associação com IL-6 e TGF- β ^{9,13}.

Estudos demonstraram um aumento de expressão de receptores de IL-9 em células da derme e da camada basal da epiderme¹⁶, e o gene da IL9 está localizado no cromossoma 5 (5q31.1)^{9,13}, uma região de sensibilidade à psoríase¹³.

Objetivos

Dosar os níveis de IL-9 em pacientes voluntários com psoríase e em voluntários saudáveis.

Avaliar a gravidade da psoríase nos voluntários.

Correlacionar os níveis de IL-9 com a gravidade da doença.

Materiais e Métodos

Para o estudo foram recrutados 44 voluntários (18-80 anos) com psoríase do Ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE) e 24 voluntários saudáveis.

Para diagnosticar a psoríase foi utilizado o critério de Nestheet²⁴. Atividade psoriática dos pacientes foi medida usando a pontuação do PASI²⁵. A psoríase foi classificada entre moderada (PASI 8-12) e severa (PASI >12)²⁶. De acordo com a classificação 19 pacientes foram considerados com psoríase moderada e 25 pacientes com psoríase severa. Nenhum dos pacientes teve diagnóstico de Artrite Psoriática. Nenhum dos pacientes apresenta outra doença auto-imune, aguda ou crônica, infecciosa ou maligna. Não receberam nenhum imunossupressor ou fototerapia, tampouco medicação tópica por 4 semanas antes da avaliação do PASI e coleta sanguínea. Um termo de consentimento livre e esclarecido foi assinado por todos os voluntários. A coleta sanguínea se deu por punção venosa, centrifugado para obtenção do soro e este estocado a -80°C.

O nível sérico de IL-9 dos voluntários foi dosado por Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)(eBiosciences) de acordo com as instruções e mensurados por espectrofotômetro em 450-570nm. O limite mínimo de detecção foi de 0,78pg/mL.

A análise estatística de comparação dos níveis de IL-9 entre o voluntários portadores de psoríase e os sadios foi feita com o teste de Mann-Whitney. O coeficiente de correlação

entre a IL-9 e o PASI foi feito pelo teste de Pearson. $P < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo. As análises foram feitas com o GraphPad Prism® 5.0.

Resultados

Os níveis de IL-9 se mostraram mais elevados em pacientes com psoríase (Pso) comparados aos voluntários sadios (Controls) ($P < 0,0001$)

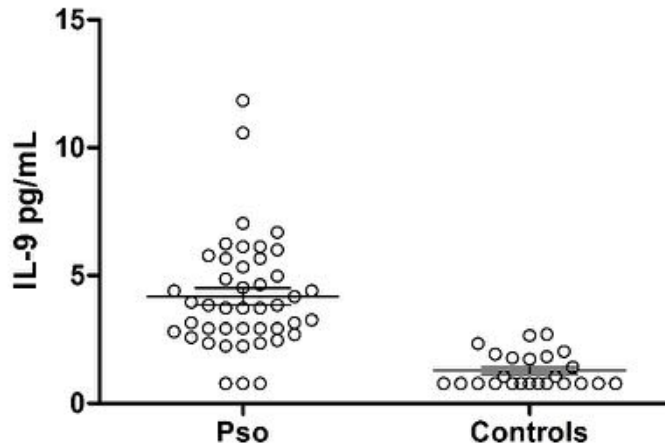


Figura 1. Níveis de IL-9 comparados entre os voluntários com psoríase e voluntários sadios.

A pontuação do PASI dos pacientes variou entre 8 e 41 pontos. Foi encontrada uma correlação positiva entre IL-9 e a pontuação do PASI ($P = 0,0089$) (Figura 2A). A avaliação também foi significativa quando comparado os grupos de classificação do PASI dos pacientes entre moderado e grave. O grupo que apresentavam PASI considerado grave apresentou níveis de IL-9 superiores ao grupo moderado ($P = 0,0476$) (Figura 2B). Não foi observado correlação com o VSH dos pacientes.

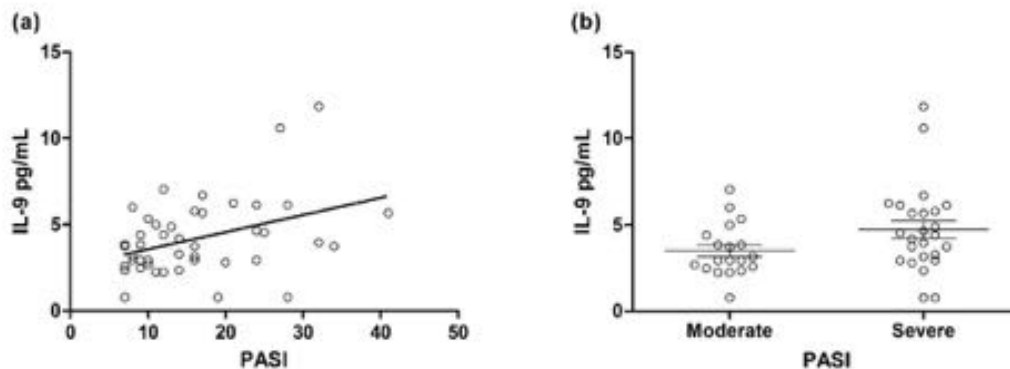


Figura 2. A) Correlação entre níveis de IL-9 e o PASI dos pacientes com Psoríase. B) Correlação dos níveis de IL-9 com a gravidade do PASI em moderado e grave.

Conclusão

O estudo demonstra que pacientes com psoríase em placas apresentaram níveis séricos de IL-9 aumentados em relação aos voluntários saudáveis e que os níveis de IL-9 estão associados positivamente com a classificação do PASI. A correlação entre IL-9 e a

gravidade da doença foi observado quando separados os grupos de classificação do PASI e correlacionados positivamente.

O mecanismo específico da expressão elevada de IL-9 na psoríase ainda permanece desconhecido, mas com base nos nossos estudos, podemos sugerir que existe uma relação direta entre os níveis de IL-9 no soro e com a gravidade da doença.

Agradecimentos

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica – INCT_if;

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes;

Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco – FACEPE;

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Referências

1. Ariza ME, Williams MV, Wong HK .Targeting IL-17 in psoriasis: From cutaneousimmunobiology to clinical application .Clinical Immunology 2013; 146: 131–139
2. Griffiths CE, Baker JN. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. Lancet 2007;370:263-71.
3. Armstrong AW, Harskamp CT, Armstrong EJ. Psoriasis and metabolic syndrome: A systemic review and meta-analysis of observational studies J A AcadDermatol 2013; 68: 654 - 62
4. GisondiP, Tessari G, Conti A et al. Prevalence of metabolic syndrome in patients with psoriasis: a hospital-based case-control study. Br J Dermatol 2007;157:68-73.
5. Johnston A, Arnadottir S, Gudjonsson J E et al. Obesity in psoriasis: leptin and resistin as mediators of cutaneousinflammation. Br J Dermatol 2008;159:342-50.
6. Wojas-Pelc A, Ciszec M, Kurnyta M, M, Marcinkiewz J. Cytokine network in psoriasis. Cross-talk between keratinocytes and cells of the skin immune system. CentrEur J Immunol 2006;31:111-6.
7. Killeen ME, Ferris L, Kupetsky EA, Falo L, MathersAR. Signaling through Purinergic Receptors for ATP Induces Human Cutaneous Innate and Adaptive Th17 Responses: Implications in the Pathogenesis of Psoriasis. J Immunol 2013 ;190:4324 - 36
8. Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H et al. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cell and, together with TGF-beta, generates IL-9+, IL-10+ ,Foxp3(-) effector T cell. Nat Immunol 2008 ;9:1347-1355.
9. Goswami R, Kaplan MH. A brief history of IL-9. J Immunol 2011;186:3283-3288
10. Angkasekwinai P, Chang SH, ThappaM, WataraiH, Dong C. Regulation of IL-9 expression by IL-25 signaling. Nat Immunol 2010;11:250-256
11. Streenwinckel V, LouaherJ, Orabona C et al. IL-13 mediators in vivo IL-9 activities on lung epithelial cells but not on hematopoietic cells. J Immunol 2007; 178:3244-3251

12. Nowak EC, Weaver CT, Turner H et al. IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease. *J Exp Med* 2009;206:1653-1660
13. Frigerb C, Bjork K, Nilsson S et al. Analysis of chromosome 5q31-32 and psoriasis: confirmation of a susceptibility locus but no association with SNPs within SLC22A4 and SLC22A5. *J Invest Dermatol* 2006; 126:998-1002
14. Noelle RJ, Nowak EC. Cellular sources and immune functions of Interleukin-9. *Nat Rev Immunol* 2010; 10:683-687
15. Elyaman W, Bradshaw EM, Uyttenhove C et al. IL-9 induces differentiation of Th17 cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 12885-12890.
16. Singh TP, Schon MP, Wallbrech K, Gruber-Wackernagel A, Wang X J, Wolf P. Involvement of IL-9 in Th17-associated Inflammation and Angiogenesis of Psoriasis 2013; 8: 1-11.
17. Li AG, Wang D, Feng XH, Wang XJ. Latent TGFβ1 in keratinocytes results in a severe psoriasis-like skin disorder. *EMBO J* 2004; 23:1770-1781.
18. Singh TP, Huettner B, Koefeler H et al. Platelet-activating factor blockade inhibits the T-helper type 17 cell pathway and suppresses psoriasis-like disease in K5.hTGFβ1 transgenic mice. *Am J Pathol* 2012; 178: 700-708
19. Singh TP, Schon MP, Wallbrecht K et al. 8-methoxypsoralen plus ultraviolet A therapy acts via inhibition of the IL-23/Th17 axis and induction of Foxp3+ regulatory T cells involving CTLA4 signaling in a psoriasis-like skin disorder. *J Immunol* 2010; 184:7257-7267
20. Zibert JR, Wallbrech K, Schon M, Mir et al. Halting angiogenesis by non-viral somatic gene therapy alleviates psoriasis and murine psoriasisiform lesions. *J Clin Invest* 2011;121:410-421
21. Han G, Li F, Singh TP, Wolf P, Wang XJ 2012. The pro-inflammatory role of TGFβ1: a paradox? *Int J Biol Sci* 2012; 8: 228–235.
22. Singh TP, Schon MP, Wallbrecht K, Wolf P. 8-Methoxypsoralen plus UVA treatment increases the proportion of CLA+ CD25+ CD4+ T cells in lymph nodes of K5.hTGFβ1 transgenic mice. *Exp Dermatol* 2012; 21: 228–230.
23. Swindell WR, Johnston A, Carbajal S et al. Genomewide expression profiling of five mouse models identifies similarities and differences with human psoriasis. *PLoS One* 2011; 6: e18266.
24. Nestle FO, Kaplan DH, Baker J. Psoriasis. *N Engl J Med* 2009;361:496-509.
25. Kerkhof PC. The Psoriasis Area and Severity Index and alternative approaches for the assessment of severity: persisting areas of confusion. *Br J Dermatol* 1997;137:661—2
26. Schmitt J, Wozel G. The psoriasis area and severity index is the adequate criterion to define severity in chronic plaque-type psoriasis. *Dermatology*. 2005;210:194-199.



CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DE VETOR DE EXPRESSÃO BACTERIANO PARA OS GENES E5 E E5 MULTIEPITOPOS DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO TIPO 16

¹A.J.D. SILVA, ^{1,2}M.N.CORDEIRO, ^{1,2}A.C. FREITAS

¹Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco.

²Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal de Pernambuco

RESUMO

De acordo com a OMS, o câncer cervical é o segundo mais frequente entre mulheres. Para o desenvolvimento do câncer invasivo, a infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) é a condição necessária. O HPV tipo 16 é responsável por cerca de 50% dos casos diagnosticados. A vacinação tem sido a abordagem mais pesquisada como medida de combate. Vacinas profiláticas baseadas em *virus-like particles* apresentam ineficiência contra casos onde já existe a infecção. A plataforma vacinal de DNA plasmidial pode representar uma estratégia interessante para eliminar uma lesão já estabelecida e a oncoproteína E5 tem se destacado como possível alvo para imunização genética. Este trabalho visou à construção e avaliação de um vetor bacteriano para a expressão do gene E5 de HPV-16.

INTRODUÇÃO

O câncer cervical é o segundo mais frequente entre mulheres, e seu desenvolvimento está associado à infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV). O HPV tipo 16 responde por 50% a 60% dos casos de câncer cervical diagnosticados (MOTOYAMA *et al.*, 2004). A vacinação é vista como uma medida de combate (DA SILVA *et al.*, 2001). Duas vacinas profiláticas baseadas em *virus-like particles* estão disponíveis, porém a ineficiência contra casos onde já existe a infecção aponta para um impacto mínimo no combate ou controle do câncer cervical. Vacinas baseadas em DNA plasmidial podem representar uma estratégia ideal contra infecções por HPV tanto por prevenir novas infecções quanto por eliminar aquelas já estabelecidas (KIM *et al.*, 2008). A oncoproteína E5 é um possível alvo para a imunização genética, pois desempenha um papel importante na formação da neoplasia celular estando implicada na ativação constitutiva do EGFR (Receptor de Fator de Crescimento Epidermal), que por sua vez, ativa vias de transdução de sinal envolvidas na sinalização mitogênica e proliferação celular (COFFER & KRUIJER, 1995; LEWIS *et al.*, 1998). E5 também reduz a comunicação entre as células epiteliais, o que pode resultar em diminuição no controle do crescimento do epitélio infectado, evento precoce já conhecido na

carcinogênese (CONRAD *et al*, 1993; BRAVO *et al*, 2005; KIVI *et al*, 2008). A inibição da resposta imune nas células infectadas, através de interações com proteínas envolvidas no processo de apresentação dos antígenos é outro mecanismo relevante e inerente a esta proteína de atividade oncogênica (ASHRAFI *et al*, 2006). Para validação de experimentos de funcionalidade *in vitro* da vacina de DNA é necessário uma comparação com a proteína E5 de HPV-16 produzida em sistema bacteriano.

OBJETIVOS

Construir plasmídeos de expressão bacteriana como parte do desenvolvimento de estratégia de imunização genética contra o câncer de colo de útero e avaliar sua funcionalidade pela detecção da expressão recombinante em células bacterianas.

MATERIAIS E MÉTODOS

O gene sintético E5 de HPV-16 foi construído de acordo com os códons de uso mais frequentes para mamíferos (*codon usage*) (E5H16 ou E5H1) , assim como uma segunda sequência (E5multi ou E5H2) contendo apenas os dois epítomos imunodominantes, em duplicata, citados na literatura. Durante sua construção, sítios de clivagem para as enzimas de restrição *XhoI* e *EcoRI* foram adicionados para permitir sua devida inserção no vetor de expressão bacteriano pAE (RAMOS *et al*. 2004). O vetor fusiona ao gene de interesse a sequência 6X HIS, o que permite a posterior detecção do produto de expressão. Cada plasmídeo resultante foi usado como agente transformante para *Escherichia coli* (BL21), por eletroporação (SAMBROOK *et al* 2000). A composição plasmidial desejada foi verificada através de análises de restrição, *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e sequenciamento. Uma vez selecionadas as linhagens, cada qual contendo os vetores pAE/E5H1 ou pAE/E5H2, as mesmas foram submetidas a ensaios de expressão induzida por IPTG (0,1mM). O extrato proteico total das culturas foi visualizado por SDS-PAGE, corado com Comassie, além de *western blotting* colorimétrico com anti-HIS conjugado a fosfatase alcalina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através de procedimentos de clonagem molecular, as construções baseadas no vetor de expressão bacteriano (pAE) contendo os genes de interesse (E5H1 ou E5H2) foram obtidas e confirmadas, por análises de padrão de restrição (Figura 1) e seqüenciamento (não mostrado).

O passo seguinte constituiu-se da avaliação da produção heteróloga da proteína de interesse. Foram realizados ensaios em menor (culturas de 1 a 2mL) e maior escala (culturas de 15mL), procurando-se estabelecer as melhores condições de indução. Inicialmente, esses ensaios foram analisados através de eletroforese em sistema desnaturante (SDS-PAGE). A proteína foi observada em gel de poliacrilamida na altura de 8 a 9 KDa (não mostrado) . Para confirmação final, foi usada a técnica de

imunodeteccão por western blotting colorimétrico: a sequência 6X HIS fusionada ao vetor foi detectada pelo anti-His conjugado a fosfatase alcalina (Figura 2).

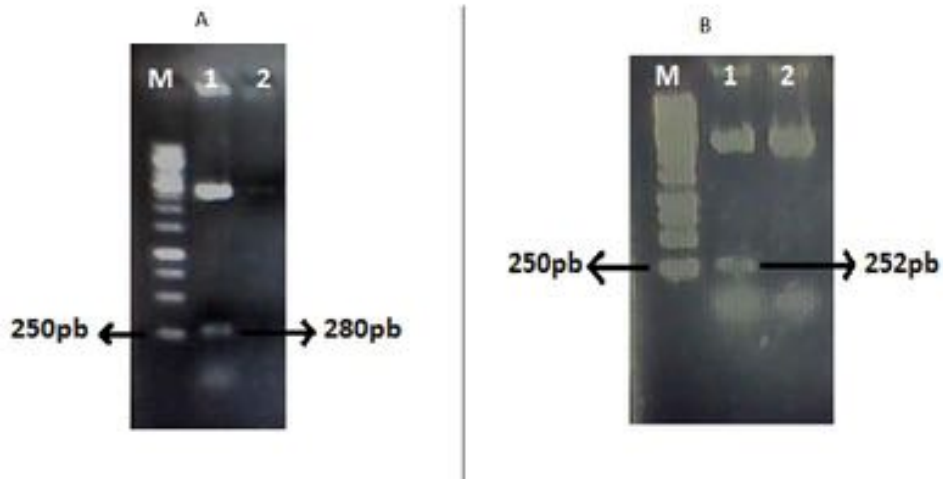


Figura 1: Digestão com enzimas de restrição *XhoI/EcoRI*. Eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TAE; A: clonagem molecular de E5H16 em pAE, 1 -, apresentando o vetor pAE vazio (2,8kb) e o fragmento de 280pb correspondendo ao gene E5H16; 2 - vetor pAE linear; B: clonagem molecular de E5multi em vetor pAE, apresentando o vetor pAE vazio (2,8kb) e o fragmento de 252pb correspondendo ao gene E5multi; 2 - vetor pAE linear; M - Marcador Ladder GeneRuler 1Kb ThermoScientific;

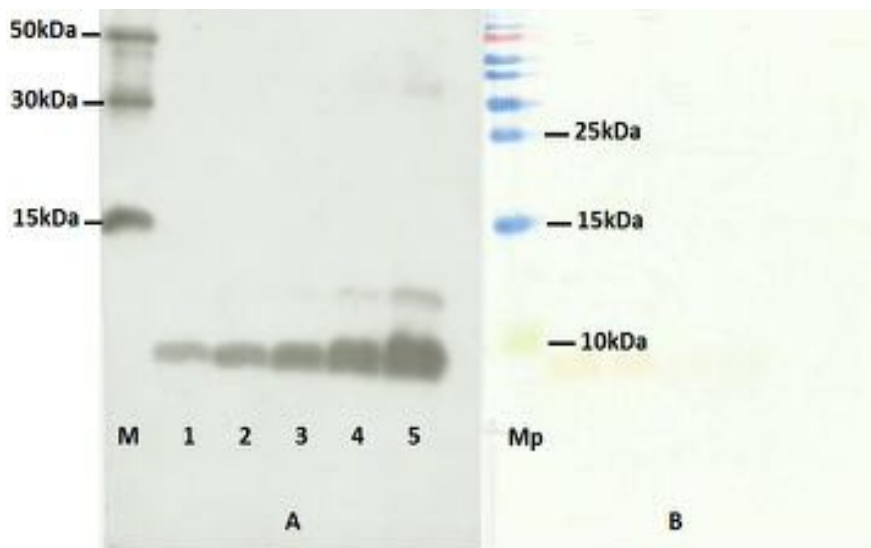


Figura 2: *Western blotting*. Filme revelado por quimioluminescência (A), após exposição à membrana (B) sensibilizada com purificações de E5 de HPV16, pré-tratada com anti-HIS e anti-mouse conjugado à peroxidase. Em A, M - 6xHIS Protein Ladder (Qiagen), 1 a 5 - diluições seriais da purificação de E5 de HPV16; Em B, Mp - PageRuler Ladder Prestained na membrana de PVDF correspondente.

CONCLUSÕES

Nossos resultados fornecem indícios de produção da proteína E5 de HPV-16 e peptídeo contendo os epitopos imunodominantes. Esses achados preliminares indicam a devida produção das proteínas recombinantes necessárias para comparação, como controles, em futuros ensaios imunológicos, para validação dos efeitos de eventuais vacinas de DNA baseadas nesses genes. O sistema bacteriano forneceu conteúdo proteico satisfatório para imunodeteção e será posteriormente otimizado para maior produção e fornecimento de proteínas purificadas

AGRADECIMENTOS

Apoio: CNPq, FACEPE, PPGG, CAPES.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHRAFI, G.H., BROWN, D.R., FIFE, K.H., CAMPO, M.S. **Down-regulation of MHC class I is a property common to papillomavirus E5 proteins.** *Virus Res*, v. 120, p. 208-211, 2006.

COFFER, P.J., KRUIJER, W. **EGF receptor deletions define a region specifically mediating STAT transcription factor activation.** *Biochem Biophys Res Commun* v. 210, p. 74-81, 1995.

CONRAD, M., BUBB, V.J., SCHLEGEL, R. **The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein.** *J Virol*, v. 67, p. 6170-6178, 1993

DA SILVA, D.M.; EIBEN, G.L.; FAUSCH, S.C.; WAKABAYASHI, M.T.; RUDOLF, M.P.; VELDEERS, M.P.; KAST, W.M. **J Cervical cancer vaccines: Emerging concepts and developments.** *Cell Physiol*, 186, 169-182, 2001.

KIM, D., R. GAMBHIRA, R., KARANAM, R., et al. **Generation and characterization of a preventive and therapeutic HPV DNA vaccine.** *Vaccine*, vol. 26, no. 3, pp. 351-360, 2008.

LEWIS, T.S., SHAPIRO, P.S., AHN, N.G. **Signal Transduction through MAP Kinase Cascades.** *Adv Cancer Res*, v. 74, p. 49-139, 1998.

MOTOYAMA, S., LADNINES-LLAVE C.A., VILLANUEVA, S.L., MARUO, T. **The Role of Human Papilloma Virus in the Molecular Biology of Cervical Carcinogenesis.** *J Med Sci*, v. 50, p. 9-19, 2004.

RAMOS C.R.; ABREU P.A.; NASCIMENTO A.L.; HO P.L. **A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide.** Braz J Med Biol Res. 2004 Aug; 37(8):1103-9

SAMBROOK, J. *et al.* **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** (Third Edition). 2000.



CORRELAÇÃO DE CITOCINAS DA VIA TH17 COM PARÂMETROS CLÍNICOS E LABORATORIAIS EM PACIENTES PORTADORES DE ANEMIA FALCIFORME COM ÚLCERAS DE MEMBROS INFERIORES

¹R.R. SILVA, ¹M.C. PEREIRA, ¹M.J.B.M. RÊGO, A.S. ARAÚJO², M.A.C. BEZERRA³, I.R. PITTA⁴, M.G.R. PITTA¹.

¹Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco.

²Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco.

³Laboratório Central, Universidade Federal de Pernambuco.

⁴Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco. **e-mail:** silvarr@gmail.com

RESUMO

As úlceras de membros inferiores (UMIs) na anemia falciforme (AF) representam uma das causas principais de morbidade da doença. Este sintoma tem sido associado aos processos hemolíticos, vaso-oclusivos e inflamatórios que acarretam a liberação de citocinas. Neste contexto, objetivamos avaliar citocinas da via Th17, pouco exploradas nesta doença, e correlacioná-las com o perfil clínico e aos parâmetros laboratoriais em três grupos: indivíduos com AF e UMI, AF sem UMI e controles sadios. Nossos resultados mostraram a associação de baixos níveis de IL-17A com a síndrome torácica aguda no grupo com UMI além da correlação dos níveis de IL-6, IL-17A e IL-22 com o LDH no mesmo grupo, demonstrando a importância destas citocinas tanto na resposta imune quanto seu envolvimento na hemólise da AF.

INTRODUÇÃO

As úlceras de membros inferiores (UMI) representam uma das causas mais importantes de morbidade na AF (SERJEANT, 1974). Estas úlceras geralmente acometem a região do tornozelo e são caracterizadas pela lenta cicatrização, dores locais frequentes e um alto número de recidivas (KOSHY, 1989). Outros sintomas, considerados fatores de risco, podem também acompanhar esses pacientes como: síndrome torácica aguda (STA), osteonecrose, priapismo, acidente vascular cerebral (AVC) e sequestro esplênico. Estas manifestações clínicas são acarretadas devido os processos de hemólise e vaso-oclusão na AF (MALOWANY, 2012).

Do ponto de vista fisiopatológico, alguns pesquisadores acreditam que a causa das UMIS deve-se a intensidade dos processos hemolíticos e a insuficiência venosa porém, isto ainda não está esclarecido (KATO, 2007). Já a oclusão vascular, responsável por outros sintomas, envolve muitos tipos celulares, mediadores inflamatórios, moléculas de adesão e a presença de citocinas e quimiocinas que recrutam células para sítios inflamatórios e induzem respostas imunes (MAKIS, 2000).

A maioria dos estudos de citocina na AF tem contemplado apenas aquelas produzidas pelas células Th1 e Th2 (PATHARE, 2004; TAYLOR 1997), no entanto, existem poucos estudos associando a clínica com as citocinas da via Th17. Essas células Th17 secretam principalmente IL-17 (A e F), mas também podem produzir IL-9 (BERIOU, 2010), IL-21, IL-22, IL-26 e CCL20 (WILSON, 2007). Esta via é originada a partir do TGF- β e IL-6 e mantida pela IL-23 e tanto possui uma função pró-inflamatória quanto no combate a patógenos extracelulares (BETELLI, 2006; ZHOU, 2007).

OBJETIVOS

Verificar a expressão das citocinas envolvidas na via Th17 (IL-6, IL-17A, IL-22 e IL-23) e associá-las aos parâmetros clínicos, hematológicos e bioquímicos em pacientes portadores de AF com e sem UMIs.

MATERIAIS E MÉTODOS

Pacientes: as amostras de sangue periférico de 86 indivíduos adultos foram coletadas na Fundação HEMOPE, sendo 24 com AF e UMIs, 42 AF sem UMIs e 20 controles sadios sob aprovação dos comitês de ética em pesquisa da fundação HEMOPE e do Centro de Ciências da Saúde, da UFPE. **Histórico clínico:** avaliamos os seguintes fatores de risco: UMIs, osteonecrose, síndrome torácica aguda (STA), priapismo, sequestro esplênico e transfusões frequentes. Os dados foram confirmados através dos respectivos prontuários médicos. **Separação das amostras:** o soro obtido das amostras em tubo seco foram armazenadas a -80°C enquanto, as amostras em tubo heparinizado, foram utilizadas para cultura de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs). **Cultura de PBMCs:** as amostras de sangue total foram separadas por gradiente de densidade, utilizando Ficoll Paque Plus (GE, Healthcare) e a camada de PBMCs foram encubadas por 48h em placa de cultura de 24 poços sob condições ou não de estimulação linfoproliferativa com anti-CD3 e anti-CD28 humano (eBiosciences) com concentração de 2×10^6 células por poço. **Coleta de sobrenadantes:** após 48 horas, as amostras foram coletadas e armazenadas a -30°C . **Quantificação de citocinas:** As citocinas analisadas em soro e sobrenadantes através de ELISA foram: IL-6 (BD Biosciences), IL-17A, IL-22 e IL-23 (eBiosciences) e a leitura foi realizada por espectrofotometria a 570 nm. **Análise hematológica:** um hemograma foi realizado em todos os pacientes levando em consideração hemoglobina total (Hb) e leucócitos totais (WBC), além da contagem de reticulócitos. **Análise bioquímica:** avaliamos os níveis séricos de lactato desidrogenase

(LDH) e bilirrubina indireta. **Análises estatísticas:** utilizamos o teste t de Wilcoxon considerando $P < 0,05$ significativa (Graphpad prism v5).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As citocinas da via Th17 analisadas em soro apresentaram níveis de detecção abaixo do kit utilizado. Isto poderia ser explicado devido ao fato do processo inflamatório ser local ou ao tempo de vida destas citocinas serem curtos, evitando assim, sua detecção sistêmica (TARRANT, 2010). No entanto, nos sobrenadantes de PBMCs, foi observado que a IL-17 estava aumentada nos dois grupos AF. No entanto, apenas o grupo AF sem UMI (0.0195) em relação aos controles apresentou significância estatística, diferentemente de outras citocinas analisadas (IL-6, IL-22 e IL-23).

Nós realizamos a correlação dos níveis de todas as citocinas com o perfil clínico do paciente e encontramos apenas associação da STA com a IL-17A. Embora tenha sido encontrada em ambos os grupos AF, esta foi mais expressa entre os AF sem UMI ($p=0.0483$) (**Tabela 1**). A STA é considerado a 2º maior causa de morbi-mortalidade da AF (CASTRO, 1994). Isto sugere que a diminuição dos níveis da IL-17A representaria um fator de risco para os pacientes AF com UMI ter uma maior predisposição de desenvolver STA.

Tabela 1. Níveis de IL-17A associados com os parâmetros clínicos em pacientes AF

Parâmetros Clínicos	AF com UMIs (n=24)		P value	AF sem UMIs (n=42)		Valor de p	AF com UMIs X AF sem UMIs
	Sim	Não		Sim	Não		Valor de p
Síndrome Torácica Aguda	309.1 (124.5)	1956 (487.5)	0.0328	1156 (313.6)	1620 (464.3)	0.9650	0.0483
Osteonecrose	1889 (697.4)	1226 (415.2)	0.5151	1292 (637.5)	1420 (320.3)	0.7793	0.9485
Priapismo	1324 (430.1)	1840 (818.1)	0.9413	3981 (2349)	1240 (293.9)	0.3419	0.3929
AVC	437.6 (0)	1491 (371.6)	ND	1945 (950.6)	1353 (300.8)	0.2131	ND
Esplenectomia	633.1 (629.2)	1276 (1433)	ND	4374 (0)	1320 (280.7)	ND	ND
Transfusões Frequentes	1775 (800.3)	1104 (312.8)	0.3878	1619 (538.9)	1322 (339.8)	0.9868	1.000

Dados se referem a médias e desvios padrões da citocina IL-17 comparados entre os grupos AF: com e sem UMIs em relação a presença ou ausência de um parâmetro clínico. ND, Não determinado.

Em relação aos parâmetros hematológicos e laboratoriais, apenas o grupo AF sem UMI obteve correlações positivas entre as citocinas analisadas com o LDH, com exceção do IL-23: IL-6 ($p=0.0191$, $r^2= 0.287$), IL-17A ($p=0.0130$, $r^2= 0.419$) e IL-22 ($p=0.0160$, $r^2= 0.168$) (**Figura 1**). O LDH, juntamente com outros parâmetros, tem sido utilizado como marcador de hemólise nos pacientes AF (TAYLOR, 2008) e seus níveis elevados foram positivamente correlacionados a IL-6, IL-17A e IL-22, diferentemente da IL-23. Isto sugeriria o papel destas citocinas com marcadores adicionais à hemólise em grupos AF com UMIs.

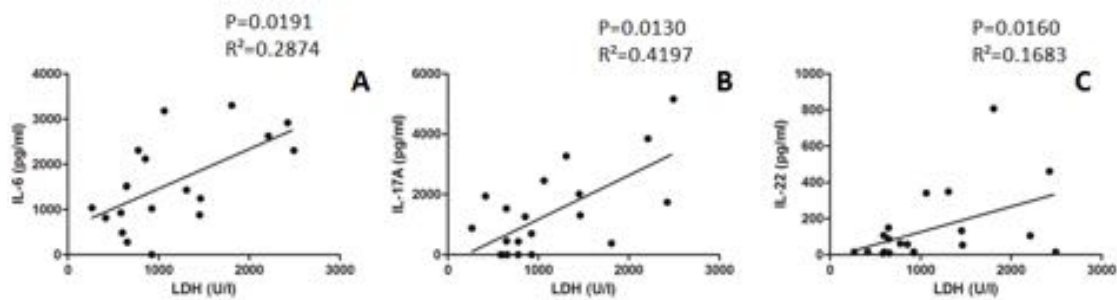


Figura 1: Níveis de IL-6, IL17A e IL-22 correlacionados com os níveis de LDH.

CONCLUSÕES

Nosso estudo demonstrou que a IL-17A presente nos pacientes AF com UMIs sem histórico de STA sugeriram que esta citocina poderia exercer um papel preventivo no desenvolvimento da STA, visto que 1/3 deste sintoma é acarretado por infecções.

Já a presença da IL-6, IL-17A e IL-22 acompanharam os níveis de LDH apenas entre os pacientes AF com UMIs o que sugerem também que a presença destas citocinas poderia servir como indicadores complementares de hemólise neste grupo.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi apoiado pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e pelo Instituto de Ciência e tecnologia – Inovação Farmacêutica (INCT_If).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) BERIOU G, BRADSHAW EM, LOZANO E, COSTANTINO CM, HASTINGS WD, ORBAN T, ELYAMAN W, KHOURY SJ, KUCHROO VK, BAECHER-ALLAN C, HAFLER DA. TGF-beta induces IL-9 production from human Th17 cells. **J Immunol**, n. 185(1), p. 46-54. 2010.
- 2) BETTELLI, E.; CARRIER, Y.; GAO, W.; KORN, T.; STROM, T. B.; OUKKA, M.; WEINER, H. L.; KUCHROO, V. K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, n. 441, p. 235–238, 2006.
- 3) CASTRO, O.; BRAMBILLA, D. J.; THORINGTON, B.; REINDORF, C. A.; SCOTT R. B.; GILLETTE, P. ET AL. The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors: the Cooperative Study of Sickle Cell Disease. **Blood**, n. 84, p. 643–9, 1994.
- 4) KATO, G. J.; GLADWIN, M. T.; STEINBERG, M. H. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. **Blood Rev**, n. 21(1), p. 37-47, 2007.

- 5) KOSHY, M.; ENTSUAH, R.; KORANDA, A.; KRAUS, A. P.; JOHNSON, R.; BELLVUE, R.; FLOURNOY-GILL, Z.; LEVY, P. Leg ulcers in patients with sickle cell disease. **Blood**, n. 74, p. 1403–1408, 1989.
- 6) MAKIS, A. C.; HATZIMICHAEL, E.C.; BOURANTAS, K. L. The role of cytokines in sickle cell disease. **Ann Hemato**, n. 79(8), p. 407-413, 2000.
- 7) MALOWANY, J.I.; BUTANY, J. Pathology of sickle cell disease. **Semin Diagn Pathol**. n. 29(1), p. 49-55. 2012.
- 8) PATHARE, A.; AL KINDI, S.; ALNAQDY, A. A.; DAAR, S.; KNOX-MACAULAY, H.; DENNISON, D. Cytokine profile of sickle cell disease in Oman. **Am J Hematol**, n. 77(4), p. 323-8, 2004.
- 9) SERJEANT, G. R. Leg ulceration in sickle cell anemia. **Arch Intern Med**, n. 133, p. 690–694, 1974.
- 10) TARRANT, J.M. Blood cytokines as biomarkers of in vivo toxicity in preclinical safety assessment: considerations for their use. **Toxicol Sci**, n. 117(1), p. 4-16, 2010.
- 11) TAYLOR, J. G. 6TH, NOLAN, V.G.; MENDELSON, L.; KATO, G. J.; GLADWIN, M. T.; STEINBERG, M. H. Chronic hyper-hemolysis in sickle cell anemia: association of vascular complications and mortality with less frequent vasoocclusive pain. **PLoS One**, n. 3(5), p. 2095, 2008.
- 12) TAYLOR, S. C.; SHACKS, S. J.; QU, Z.; WILEY, P. Type 2 cytokine serum levels in healthy sickle cell disease patients. **J Natl Med Assoc**, n. 89(11), p. 753-7, 1997.
- 13) WILSON, N. J.; BONIFACE, K.; CHAN, J. R.; MCKENZIE, B. S.; BLUMENSCHN, W. M.; MATTSON, J. D.; BASHAM, B.; SMITH, K.; CHEN, T.; MOREL, F.; LECRON, J. C.; KASTELEIN, R. A.; CUA, D. J.; MCCLANAHAN, T. K.; BOWMAN, E. P.; DE WAAL MALEFYT, R. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. **Nat Immunol**, n. 8(9), p. 950-7, 2007.
- 14) ZHOU, L.; IVANOV, I. I.; SPOLSKI, R.; MIN, R.; SHENDEROV, K.; EGAWA, T.; LEVY, D. E.; LEONARD, W. J.; LITTMAN, D.R. IL-6 programs TH-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. **Nat. Immunol**, n. 8, p. 967–974, 2007.



**ELEVADOS NÍVEIS SÉRICOS DE TGFβ EM PACIENTES BRASILEIROS
COM LÚPUS ERITEMATOSO
SISTÊMICO ESTÃO ASSOCIADOS COM MAIOR GRAVIDADE DA DOENÇA**

H. L. SILVA-NETA¹; A. T. DANTAS^{1,2}; H. A. MARIZ^{1,2}; M. C. PEREIRA¹; M. J. B. M. RÊGO¹; L. F. ROCHA JÚNIOR^{1,2}; I.R. PITTA¹; A. L. B. P.DUARTE²; M. G. R. PITTA¹.

¹Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT SG), UFPE. silvanetahlj@gmail.com

²Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, UFPE

RESUMO

Em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES), o papel do TGFβ ainda não foi completamente elucidado. O presente estudo visou avaliar os níveis séricos de TGFβ de pacientes portadores de LES do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco e sua correlação com as manifestações clínicas da doença. **Métodos e Resultados:** Os níveis séricos de TGFβ foram determinados através de kits específicos de ELISA (eBiosciences). Foram detectados elevados níveis séricos de TGFβ em pacientes com LES (média de 54,64pg/mL) frente ao grupo controle (média de 33,94pg/mL) ($p = 0,02$), sendo os níveis mais elevados observados nos pacientes mais graves. Adicionalmente, observamos níveis séricos mais elevados de TGFβ em pacientes mais graves com SLEDAI > 6 (média de 108,5 pg/mL) do que em pacientes com SLEDAI <6 (média de 47,56 pg/mL) ($p=0,0078$). **Conclusão:** Nossos resultados indicam que a severidade das manifestações clínicas do LES está associada à elevação dos níveis séricos de TGFβ.

INTRODUÇÃO

O Lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune, atualmente incurável e de natureza pouco compreendida que afeta mais de um milhão de indivíduos a cada ano. O LES pode acometer pessoas de todas as idades, raça e sexo; sendo especialmente mais frequente dentre as mulheres em idade fértil. Trata-se de uma doença caracterizada pela presença de anticorpos contra antígenos próprios tais como DNA, proteínas nucleares e certos componentes citoplasmáticos acarretando a formação

de imunocomplexos que desencadeiam a resposta inflamatória sistêmica (SATO, et al, 2004; CARROLL, 2004).

A doença pode evoluir com manifestações clínicas bastante heterogêneas, em períodos oscilantes de exacerbação e remissão. Nos casos mais graves há comprometimento de órgãos vitais tais como coração, pulmão, rim e cérebro. A severidade das manifestações clínicas tem sido associada à elevação dos níveis de autoanticorpos os quais respondem em grande parte pelas lesões teciduais características da doença tais como anemia hemolítica, glomerulonefrite, artrite e vasculite (KAYSER; ANDRADE, 2003; BALDAÇARA, 2005; TURCHETTI, et al, 2012).

O fator de transformação de crescimento beta (TGF β) é uma importante proteína regulatória do sistema imune, presente na corrente sanguínea. Estudos demonstram que a deleção do gene TGF β em murinos promove quadros de inflamação sistêmica, caracterizados pelo aumento da resposta linfocitária e elevação dos níveis de autoanticorpos. Acredita-se, portanto, que o TGF β seja uma importante citocina imunossupressora de ocorrência natural, cuja ausência pode conduzir ao surgimento de doenças autoimunes como o LES (DANG, et al, 1995; SHULL, et al., 1992). Apesar destes dados, estudos acerca da relevância do TGF β no LES permanecem incipientes.

OBJETIVOS

O presente estudo objetiva avaliar os níveis séricos de TGF β de pacientes portadores de LES do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco e sua correlação com as manifestações clínicas da doença de acordo com os critérios do Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI) e American College of Rheumatology (ACR).

MATERIAIS E MÉTODOS

Cinquenta e dois pacientes (50 mulheres e 2 homens, com idades de 20 a 58 anos) que preencheram os critérios de classificação do *American College of Rheumatology* para diagnóstico de LES participaram deste estudo. Os parâmetros clínicos e laboratoriais foram registrados. Vinte e quatro indivíduos saudáveis (13 homens e 11 mulheres, com idade de 20 a 60 anos) constituíram o grupo controle (idades pareadas). As concentrações séricas de TGF β dos pacientes e indivíduos saudáveis foram determinadas através de kits específicos de ELISA, seguindo as recomendações do fabricante (eBiosciences). As análises estatísticas foram realizadas por meio de comparações univariadas utilizando testes não paramétricos (Mann-Whitney) e os resultados foram apresentados considerando o valor médio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos prévios indicam que o TGF β desempenha um papel imunorregulatório contra doenças auto-imunes. Pacientes com LES apresentam uma redução na produção de TGF β em culturas de células do sangue periférico, sendo provável que a redução da produção de TGF β predisponha à ativação de células T autorreativas e produção de autoanticorpos (OHTSUKA, et al, 1998).

Em contraste, nossos resultados revelam níveis séricos de TGF β significativamente maiores em pacientes com LES (média de 54,64pg/mL) do que em indivíduos sadios (média de 33,94 pg/mL) ($p = 0,02$) (Figura 1). Adicionalmente, observamos níveis séricos mais elevados de TGF β em pacientes mais graves com SLEDAI > 6 (média de 108,5 pg/mL) do que em pacientes com SLEDAI <6 (média de 47,56 pg/mL) ($p=0,0078$) (Figura 2). Tais dados sugerem uma modificação da ação do TGF β diante das alterações fisiológicas provocadas pela doença.

A classificação SLEDAI considera as manifestações clínicas observadas até dez dias que precedem a consulta médica (BOMBARDIER, et al, 1992). Por outro lado, os critérios de classificação do *American College of Rheumatology* (ACR) são utilizados para o diagnóstico do Lúpus e analisam todas as manifestações clínicas observadas ao longo da doença, independente do tempo (COLLEGE OF RHEUMATOLOGY, 1999). Desta forma, investigamos os níveis séricos de TGF β nos pacientes lúpicos (ACR) que já apresentaram alguma vez nefrite (50% dos pacientes), indicativo de atividade da doença, frente àqueles que nunca chegaram a apresentar nefrite (50% dos pacientes) e detectamos que não houve diferença significativa entre estes dois grupos com 52,28 pg/mL e 55,61 pg/mL de TGF β respectivamente ($p= 0,8382$). Estes resultados sugerem que os níveis séricos de TGF β não são indicativos de comprometimento renal em pacientes lúpicos.

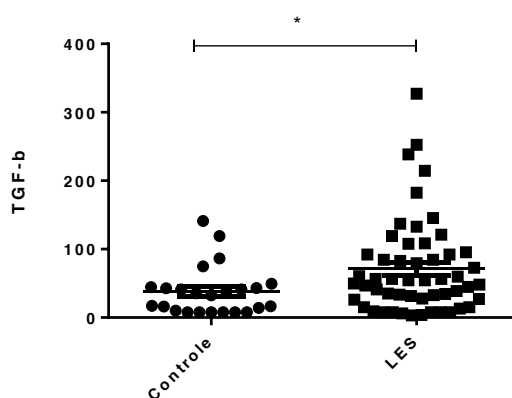


Figura 1: Níveis séricos de TGF β em pacientes lúpicos (LES) e indivíduos sadios (controle) (* $p = 0,02$).

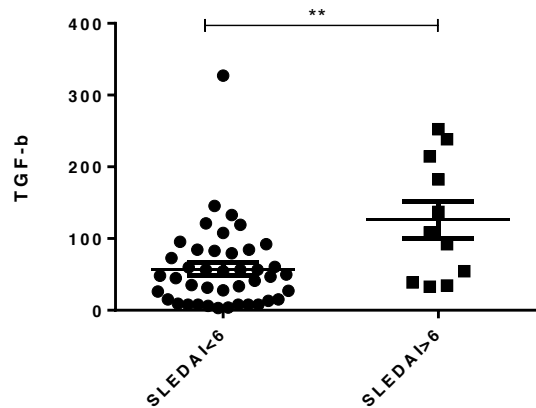


Figura 2: Níveis séricos de TGF β em pacientes lúpicos com SLEDAI < 6 e SLEDAI > 6 (**p = 0,0078).

CONCLUSÃO

Nossos resultados denotam níveis séricos mais elevados de TGF β nos pacientes lúpicos e em especial nos pacientes com quadro clínico mais grave, de acordo com os critérios do SLEDAI (SLEDAI > 6). Estes dados sugerem um relevante papel do TGF β nas manifestações clínicas do LES que precisam ser investigadas nos diferentes graus de atividade da doença; visando à compreensão do papel desta citocina neste contexto e seu potencial uso como marcador de prognóstico e potencial alvo terapêutico.

AGRADECIMENTOS

Aos membros da equipe do Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas – LINAT, ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica - INCT_if e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDAÇARA, L. R. Manifestação atípica de linfadenopatia no lúpus eritematoso sistêmico. **Revista de Biociências**, Taubaté, v. 11, n. 1-2, p. 93-97, jan./jun. 2005.

BOMBARDIER C, GLADMAN DD, UROWITZ MB, CARON D, CHANG CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. **Arthritis Rheum.** V. 35, p. 630-640, 1992.

CARROLL, M. C. A protective role for innate immunity. in systemic lupus erythematosus. **Nature Reviews. IMMUNOLOGY**. v. 4, p. 825-831, 2004.

DANG H, GEISER A G, LETTERIO J J, NAKABAYASHI T, KONG L, FERNANDES G, TALAL N. SLE-like autoantibodies and Sjögren's syndrome-like lymphoproliferation in TGF-beta knockout mice. **J Immunol**. v. 6 . p. 3205-12. 1995.

GUIDELINES FOR REFERRAL AND MANAGEMENT OF SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS IN ADULTS. American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Systemic Lupus Erythematosus Guidelines. **Arthritis Rheum.**, 1999.

KAYSER, C.; ANDRADE, L. E. C. Disfunção tímica e suas possíveis implicações nas alterações imunológicas do Lúpus eritematoso sistêmico. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 3, n. 1, p. 26-31, 2003

OHTSUKA K, GRAY J D, STIMMLER M M, TORO B, HORWITZ D A. Decreased Production of TGF-b by Lymphocytes from Patients with Systemic Lupus Erythematosus. **J Immunol**. v. 160, p. 2539-2545, 1998.

SATO EI, BONFÁ ED, COSTALLAT LTL, SILVA NA, BRENOL CT, SANTIAGO ME, SZAJUBOK CM, RACHID-FILHO A, BARROS RT, VASCONCELOS M . Lúpus Eritematoso Sistêmico: Tratamento do Acometimento Cutâneo/Articular. *Rev Bras Reumatol*. v.11. 44. n. 6 . p. 454-7, 2004.

SHULL M M, ORMSBY I, KIER A B, PAWLOWSKI S, DIEBOLD R J, YIN M, ALLEN R, SIDMAN C, PROETZEL G, CALVIN D, DOETSCHMAN N A. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-β1 gene results in multifocal inflammatory disease. **Nature**, v. 359, p. 693 - 699, 1992.

TURCHETTI G., YAZDANY J, PALLA I, YELIN E, MOSCA M. Systemic lupus erythematosus and the economic perspective: a systematic literature review and points to consider. **Clin Exp Rheumatol**. 2012.



ESTUDO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DO COMPOSTO LPSF-RA18 EM CÉLULAS MONONUCLEADAS DO SANGUE PERIFÉRICO DE VOLUNTÁRIOS SADIOS

¹GONÇALVES.S.M.C, ²M.R. GALDINO-PITTA, ¹RÊGO.M.J.B.M,
²LIMA.M.C.A, ²PITTA.I.R, ¹PITTA.M.G.R

¹Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino, Universidade Federal de Pernambuco

²Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino, Universidade Federal de Pernambuco

RESUMO

Investigou-se a atividade imunomoduladora do novo derivado tiazolidínico, LPSF-RA18, possível agonista do PPAR γ , sobre a expressão das citocinas pró-inflamatórias INF- γ , IL-17, TNF- α , IL-22, IL-6 e anti-inflamatória IL-10 em sobrenadante de cultura de PBMC's de voluntários sadios. Primeiramente foi realizado o teste de citotoxicidade - MTT para o derivado em estudo e posteriormente, foi realizada a cultura em células do sangue periférico de voluntários sadios – PBMCs, usando como controle positivo os mitógenos PMA e ionomicina. As citocinas foram dosadas no sobrenadante de cultura pelo método ELISA. Os resultados foram analisados no programa GraphPad Prism, pelo teste estatístico One-Way ANOVA. Obtivemos uma viabilidade celular superior a 80%. O composto RA-18 não inibiu significativamente a produção das citocinas INF- γ , IL-17, TNF- α , IL-22, IL-6

INTRODUÇÃO

As tiazolidinedionas (TZD) são ligantes do receptor proliferador de peroxissoma ativado PPAR γ . Os TZDs são usados atualmente no tratamento da diabetes mellitus tipo 2. Evidências emergentes sugerem que TZDs são capazes de modular a inflamação e podem ser importantes para o tratamento de doenças inflamatórias e auto-imunes. Recentemente, foi descoberto um sub-grupo de células T CD4⁺, chamado células T helper foliculares (células Tfh), caracterizada pela expressão do receptor de quimiocina CXCR5^{1,2}. Estudos sugerem que as células Tfh secretam as citocinas IL-4^{4,5,6,7,8,9}, IL-10^{4,5,6,7,8,9}, IL-17^{4,5,6,7,8,9} e INF γ ^{4,5,6,7,8,9}.

Estudos com pacientes portadores de doenças auto-imunes foram realizados para determinar se há uma desregulação na geração ou na função das células Tfh. Vários estudos relataram o aumento ou a diminuição do número de células T CD4⁺ e CXCR5⁺ no sangue de paciente com deficiências auto-imunes, como por exemplo, na artrite reumatoide^{10,11}.

Devido à falta de remissão de algumas doenças reumatológicas auto-imunes como a artrite reumatóide, observada em alguns pacientes e aos efeitos colaterais apresentados pelos fármacos, faz-se necessário um estudo que vise à descoberta de fármacos a serem utilizados no tratamento de doenças reumatológicas auto-imunes.

OBJETIVOS

Geral

O objetivo geral desta proposta é investigar a atividade imunomoduladora do novo derivado tiazolidínico LPSF-RA18

Específicos

- I. Determinação da dose não tóxica dos LPSF-RA18 em células mononucleadas do sangue periférico de voluntários sadios
- II. Avaliação da atividade imunomoduladora do composto tiazolidínico na produção das citocinas inflamatórias em células mononucleadas do sangue periférico de voluntários sadios

MATERIAIS E MÉTODOS

Para este estudo foi necessário coletar amostras do sangue periférico. Foram coletados 15ml de sangue em tubo contendo o anticoagulante heparina. As coletas foram realizadas por profissionais competentes e devidamente treinados para reduzir eventuais riscos. Nenhuma coleta foi realizada sem a autorização prévia dos voluntários, para isso, os membros da equipe apresentaram o objetivo do estudo e o interesse da sua participação. O teste de citotoxicidade do composto LPSF-RA18 foi realizado *in vitro* em células do sangue periférico dos voluntários sadios pelo método MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo). Para tal estudo, as amostras foram feitas em triplicata. Com o auxílio da câmara de Neubauer foi realizado o ajuste celular para 1×10^6 células/1mL e, foi adicionado o derivado tiazolidínico nas concentrações de 50 e 100 μ M. Após 48 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C, foi adicionado a solução de MTT (0,5mg/mL), e incubado por 3 horas na estufa. Em seguida, foi adicionado a solução de SDS 20% para dissolução do precipitado. A absorbância foi lida em um espectrofotômetro de placa a 570nm, após 24 horas. Os resultados foram analisados a partir da média aritmética e desvio padrão.

As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram isoladas a partir do sangue periférico de voluntários sadios com Ficoll Paque™ Plus (*GE Healthcare Bio-Sciences*) e as células foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com L-Glutamina, 10% de Soro Bovino Fetal, 10 mM de HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) e 200 U/mL de Penicilina/Estreptomicina. Estas células foram cultivadas em estufa de CO₂ 5% a 37°C. As PBMCs foram estimuladas com os mitógenos PMA + Ionomicina, juntamente com o derivado tiazolidínico nas

concentrações de 1, 10 e 100 μM . Após 48 horas de cultura, os sobrenadantes foram retirados e armazenados em freezer -20°C para posterior dosagem de citocinas.

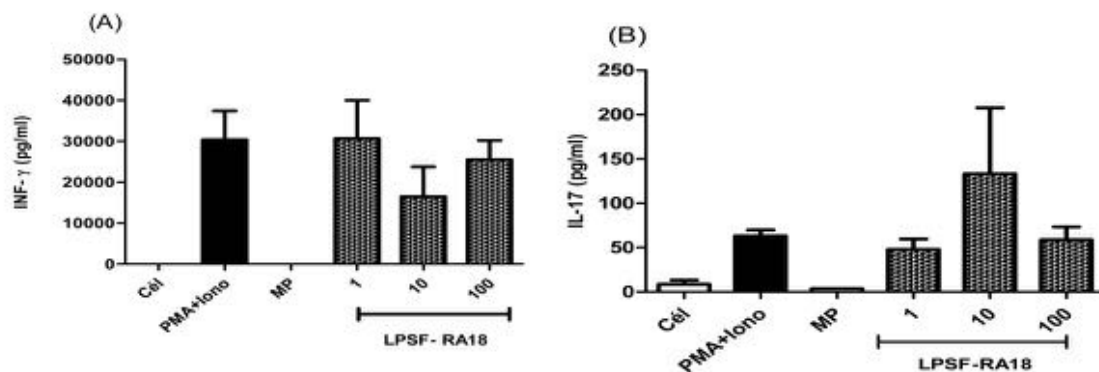
As citocinas dosadas no sobrenadante dos voluntários sadios foram $\text{INF-}\gamma$ (limite de detecção: 4,6875), IL-17 (limite de detecção: 3,90625), IL-6 (limite de detecção: 4,6875), IL-22 (limite de detecção: 7,8125) e $\text{TNF-}\alpha$ (limite de detecção: 7,8125). Todas as citocinas foram quantificadas pelo método ELISA, este é um teste imunoenzimático que usa anticorpos específicos para detectar antígenos e anticorpos. O complexo que contém o anticorpo é visualizado pelo acoplamento da enzima ao anticorpo. A adição de substrato ao complexo enzima-anticorpo-antígeno resulta num produto colorido. A placa de 96 poços foi lida no espectrofotômetro a 450 e 570 nm.

Após a dosagem das citocinas, estas foram quantificadas pelo método estatístico One-Way ANOVA através do programa GraphPAD Prism, foi considerado significativo $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente avaliamos a citotoxicidade do composto LPSF-RA18 nas doses de $100\mu\text{M}$ e $250\mu\text{M}$, no qual obtivemos uma viabilidade superior a 80%.

Posteriormente o teste de citotoxicidade foi realizado a dosagem das citocinas $\text{INF-}\gamma$, IL-17, $\text{TNF-}\alpha$ e IL-6 no sobrenadante de cultura dos voluntários sadios, previamente estimuladas com PMA+Ionomicina como controle positivo e para o controle negativo foi utilizado Metilprednisona. As doses testadas do composto em estudo foi $1\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$ e $100\mu\text{M}$. Na dosagem da citocina IL-22 os resultados ficaram abaixo do limite de detecção.



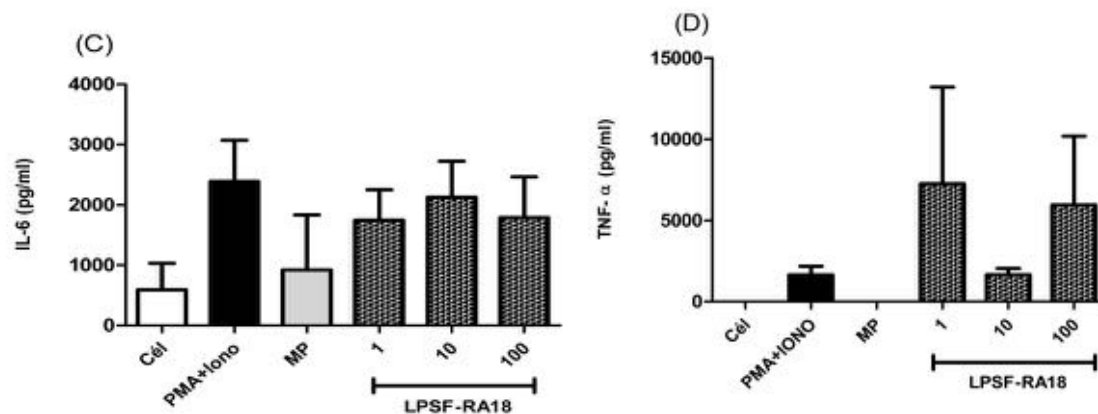


Figura 2 – Dosagem das citocinas INF- γ , IL-17, TNF- α e IL-6 no sobrenadante de cultura de voluntários sadios na presença derivado LPSF-RA18

Observamos na figura 2(A) e 2 (C) que a dose de 10 μ M reduziu a produção das citocinas INF- γ e TNF- α . Na figura 2 (B) e 2 (D) a dose de 1 μ M reduziu a produção das citocinas IL-17 e IL-6. Em nenhuma análise acima houve significância estatística.

CONCLUSÕES

A descoberta de novos compostos capazes de modular a produção de citocinas são de grande importância para o desenvolvimento de terapias para as doenças inflamatórias e auto-imunes. São necessários estudos adicionais para definir melhor a seletividade na inibição da produção das citocinas acima citadas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), ao Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), laboratório associado do Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (Nupit SG) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), à Prof. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta e aos amigos do LINAT.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Habib, N.S., Fahmy, S., El-Khawass, S.M. & Abel Aziem, T.A. Novel thiazolinyl, thiazolidinonyl, thiadiazolyl and oxadiazolyl-benzotriazole derivatives with potential antiinflammatory activity and minimum ulcerogenic effect. *Pharmazie* 55, 900-6 (2000)

Park, H. et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6, 1133-41 (2005)

Straus, D.S. & Glass, C.K. Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms. *Trends Immunol* 28, 551-8 (2007)



ESTUDO DE CASO: SUBTIPAGEM MOLECULAR DE CARCINOMA DUCTAL INVASIVO CONTRALATERAL EM PACIENTE JOVEM

¹BARBOSA, B.T., ¹NASCIMENTO, J.C.F., ¹VASCONCELOS, J.L.A.,
¹FERREIRA, S.A., ²FITTIPALDI, H.M., ^{3,4}ROCHA, C.R.C., ^{1,4}BELTRÃO, E.I.C.

¹Setor de Patologia, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). bruno.trajanoufpe@hotmail.com

²Setor de Anatomia Patológica do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP)

³Setor de Biologia Molecular, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

⁴Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas (CCB), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

RESUMO

O câncer de mama é considerado raro em mulheres com até 35 anos, sendo nesses casos mais agressivo e resultando em prognóstico reservado. O uso de biomarcadores teciduais para subtipagem molecular de câncer de mama constitui potencial ferramenta diagnóstica, prognóstica e terapêutica. O presente trabalho relata o caso de uma paciente com 31 anos que apresentou carcinoma ductal invasivo de mama (CDI) contralateral, 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, BRCA1 e BRCA2. Diferentemente do perfil encontrado nestes casos a paciente apresentou positividade para todos os marcadores analisados, indicando que apesar do grau de malignidade a paciente é uma boa candidata aos tratamentos disponíveis.

Palavras chave: carcinoma ductal invasivo; subtipagem molecular; imunohistoquímica

INTRODUÇÃO

O câncer é a segunda maior causa de morte do mundo e é reconhecido como um importante problema de saúde pública nos países desenvolvidos e em desenvolvimento. Este tipo de malignidade recebe destaque por ser a neoplasia que apresenta as maiores taxas de morbi/mortalidade em mulheres no mundo (WHO, 2008). No Brasil é estimado cerca de 52.680 novos casos para os anos 2012/2013, sendo considerado raro em mulheres com até 35 anos (INCA, 2011).

Na mulher adulta-jovem cerca de 2,4% de todos os casos de câncer de mama são diagnosticados em idade inferior a 35 anos (ANDERS *et al*, 2009; FREDHOLM *et al*, 2009), contudo as neoplasias malignas da mama nestas pacientes tendem a ser mais

agressivas e com prognóstico reservado (PRONZATO *et al*, 2011). Este perfil de malignidade implica em um risco sete vezes maior de desenvolver câncer de mama contralateral em comparação com as mulheres com mais de 60 anos (KOEDIJK *et al*, 2013).

São utilizados como alvo os receptores hormonais (Receptor de Estrógeno - RE e Receptor de Progesterona - RP), o receptor do fator de crescimento epidermal humano tipo 2 (HER-2) e a proteína de proliferação celular (Ki-67). (HARBERCK, THOMSEN, GNANTC, 2013) para subtipagem molecular do câncer de mama através da técnica de imunohistoquímica de acordo com o Consenso de Saint Gallen (2013). Além destes, a análise dos genes BRCA1 e BRCA2 (*breast cancer 1 and 2, early onset*) através da expressão de suas proteínas é importante por seus envolvimento na regulação da proliferação celular e da apoptose (FOULKES e SHUEN, 2013).

A análise de biomarcadores, além de seu valor diagnóstico e prognóstico, possibilita uma melhor compreensão da biologia do tumor influenciando como preditivos de maior sucesso quanto à escolha da conduta terapêutica a ser adotada.

OBJETIVOS

Avaliar o perfil molecular de um caso de carcinoma ductal invasivo (CDI) recorrente e contralateral em paciente adulta-jovem (31 anos) utilizando imunohistoquímica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Estudo de caso

Paciente com 31 anos de idade sem histórico familiar de tumores, menarca aos 13 anos, uso de contraceptivos orais, múltipara (um aborto e três cesáreas) queixando-se de queimação na mama direita procurou um mastologista (setembro/2012). Realizou mamografia (novembro/2012) que revelou nódulo na mama esquerda, confirmado por ultrassonografia, onde se detectou, também, nódulo na mama direita. Submeteu-se a punção aspirativa por agulha fina (PAAF) sendo diagnosticada com carcinoma ductal invasivo (CDI) grau II de diferenciação celular. Realizou tratamento quimioterápico (Antraciclina, 4 ciclos, seguido de Taxano) sendo interrompido diante da descoberta de gestação (parto em junho/2013). Em setembro de 2013, a paciente realizou mastectomia radical contralateral. Os resultados histopatológicos e moleculares são apresentados no Quadro 1.

Amostra

Biópsia em parafina do foi obtida do Setor de Anatomia Patológica do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), Recife, PE. 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). Todos os dados relacionados à paciente e relatados nesse trabalho foram obtidos do seu prontuário arquivado no IMIP.

Imunohistoquímica

A subclassificação molecular do tumor foi realizada através da imunohistoquímica de acordo com VASCONCELOS *et al* (2013) utilizando o anticorpo policlonal anti-ER- β (L-20) diluição 1:50, anticorpo monoclonal anti-PR (AB-52) diluição 1:100, anticorpo policlonal anti-BRCA1 (I-20) diluição 1: 150, anticorpo policlonal anti-BRCA2 (H-299) diluição 1:50, anticorpo monoclonal anti-Ki-67 (Ki-67) diluição 1:50 e anticorpo policlonal anti-HER-2, diluição 1:100 (DAKO, USA). Como controle foi utilizado o anticorpo monoclonal anti- β -actin (ACTBD11B7), diluição 1:50 (Santa Cruz Biotechnology, USA). As lâminas foram analisadas em sistema digital de imagem com microscópio óptico Nikon Eclipse 50i acoplado a câmera digital Nikon DS-Fi1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os marcadores selecionados para elaboração deste trabalho constituem os principais biomarcadores de câncer de mama validados na rotina clínica (PR, ER, HER-2 e Ki-67). Além destes, também foram analisadas as proteínas expressas pelos genes BRCA1 e BRCA2, genes supressores tumorais envolvidos no reparo de danos ao DNA, contribuindo para integridade do genoma. Mutações e perda da expressão desses genes estão relacionadas ao desenvolvimento do câncer (BERNSTEIN *et al*, 2013). Os resultados da imunohistoquímica revelaram positividade para todos os marcadores analisados, destacando-se uma superexpressão do HER-2. O perfil superexpresso deste gene está envolvido na proliferação e sobrevivência celular por facilitar a formação de dímeros e constituir um potencial mecanismo para aumentar a transdução de sinal através da fosforilação e desfosforilação de proteínas transmembranas intermediárias e intracelulares (GUTIERREZ e SCHIFF, 2011).

Os resultados positivos para as proteínas expressas pelos genes supressores tumorais BRCA1 e BRCA 2 confere a paciente um melhor prognóstico visto que ainda há ativação de genes supressores tumorais (análise qualitativa) no presente estudo.

Os resultados apresentados possibilitam a caracterização dos tumores como Luminal B positivo para HER-2. Em geral, mulheres jovens apresentam maior frequência de tumores triplo-negativos e, por consequência, possuem tempo médio de sobrevida menor devido ao grau de malignidade e agressividade do CDI em mulheres com menos de 35 anos de idade (MORRINSON *et al*, 2012). Entretanto, o caso em estudo, apresentou um perfil molecular compatível com um melhor prognóstico, levando a possibilidades de uma melhor resposta aos tratamentos disponíveis atualmente.

Quadro 1: Dados histopatológicos (prontuário IMIP) e subtipagem molecular (estudo) das amostras de carcinoma ductal invasivo de mama (CDI) contralaterais.

AMOSTRAS	HISTOPATOLOGIA	SUBTIPAGEM MOLECULAR
MAMA DIREITA	Mastectomia pós-quimioterapia neoadjuvante; CDI multifocal grau nuclear 2, formação tubular 1+, índice mitótico: 1=4; Tamanho do tumor: 4,5 x 2,5cm, 4x 2cm e 0,5 cm; Metástases para 5 linfonodos dissecados.	RE:+, RP:+, HER - 2: 1+, Ki 67: 10% BRCA1: + BRCA2: +
MAMA ESQUERDA	Mastectomia pós-quimioterapia neoadjuvante; CDI multifocal grau nuclear 2, formação tubular 1 +, índice mitótico 1=4; Tamanho do tumor: 0,5cm de diâmetro distando 1,5 cm das margens mais proximais; Linfonodos livres de metástases.	RE:+, RP: fracamente +, HER - 2: 1+, Ki 67: 15% BRCA1: + BRCA2: +

RE: Receptor de Estrógeno; RP: Receptor de Progesterona; HER-2: Receptor do Fator de Crescimento Epidermal Humano tipo 2; Ki-67: proteína de proliferação celular; BRCA1 e 2: câncer de mama 1 e 2, início precoce.

CONCLUSÕES

Os biomarcadores selecionados para o estudo validados na rotina clínica (PR, ER, HER-2 e Ki-67) e mais específicos (avaliação das proteínas expressas pelos genes BRCA1 e BRCA2) possibilitaram um melhor entendimento e correlação dos aspectos clínicos, morfológicos e moleculares do câncer de mama bilateral tendo importância terapêutica, epidemiológica e preditiva.

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.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERS, C.K. *et al.* Breast cancer before age 40 years. *Seminars in Oncology*, v. 36, p. 237-249, 2009;

BERNSTEIN, J. L. *et al.* Contralateral breast cancer after radiotherapy among *BRCA1* and *BRCA2* mutations carriers: A WECARE Study Report. *European Journal of Cancer*, 46, n. 14, p. 2979-2985, 2013;

FOULKES, W. D., SHUEN, A. Y. In brief: BRCA1 e BRCA2. *Journal of Pathology*, v. 230, n. 4, p. 347-349, 2013;

FREDHOLM, H. *et al.* Breast cancer in young women: poor survival despite intensive treatment. *PLoS One*, v. 4, p. 7695, 2009;

GUTIERREZ, C., SCHIFF, R. HER2: Biology, Detection, and Clinical Implications. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, v. 135, p. 55-62, 2011;

HARBECKA, N., THOMSEN, C., GNANTZ, M. St. Gallen 2013: Brief Preliminary Summary of the Consensus Discussion. *Breast Care*, n. 8, p. 102-109, 2013;

KOEDIJK, M. S. *et al.* Effectiveness of routine follow-up in the detection of contralateral breast cancer in young women with early breast cancer. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, v. 39, n.11, p. 1186-1191, 2013;

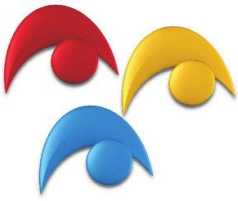
MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2011;

MORRISON, D.H. *et al.* Tumour biomarker expression relative to age and molecular subtypes of invasive breast cancer. *British Journal of Cancer*, v. 107, p. 1-6, 2012;

PRONZATO P. *et al.* Biological characteristics and medical treatment of breast cancer in young women-a featured population: results from the NORA study. *International Journal of Breast Cancer*, v. 2011 , p. 1-6 ,2011;

VASCONCELOS, J.L.A. *et al.* Comparing the Immunoexpression of FUT3 and FUT6 between Prostatic Adenocarcinoma and Benign Prostatic Hyperplasia. *Acta Histochemica et Cytochemica*, v. 46, n. 3, p. 105–109, 2013.

World Health Organization (WHO), 2008. Disponível em http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer_text/en/ Acesso em 10 de outubro de 2013.



EXPRESSÃO DE MEDIADORES IMUNOLÓGICOS DOS PERFIS Th17 E T_{REG} EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA ATIVA

^{1,2}M. A. SOUZA, ¹T. M. ALMEIDA, ¹M. C. A. B. CASTRO, ^{1,2}A. P. OLIVEIRA, ¹B. C. OLIVEIRA, ¹M. E. F. BRITO, ^{1,2}V. R. A. PEREIRA

¹Laboratório de Imunogenética, Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ).

²Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco.

RESUMO

As diferentes formas clínicas da LTA incitam predominantemente uma resposta imune celular e, nesse evento, os subtipos Th17 e T_{reg} têm sido estudados. Devido a escassez de trabalhos sobre a expressão gênica de mediadores desses perfis em Pernambuco, o presente estudo avaliou a expressão de mRNA para Interleucina (IL)-10, Foxp3, IL-6, TGF- β , IL-17, IL-22 e ROR γ em PBMC de pacientes com LTA ativa. Os resultados obtidos apontam a presença de mediadores de ambos os perfis na doença ativa. A predominância de mRNA para Foxp3 e IL-10, presentes no perfil Treg, sugere que este subtipo celular predomine sobre Th17 na fase ativa da doença.

INTRODUÇÃO

Considerada um grave problema de saúde pública, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) é encontrada em todas as regiões do Estado de Pernambuco, e estima-se que a incidência da LTA tenha aumentado cerca de dez vezes nos últimos anos¹.

O desenvolvimento de uma resposta imune frente a *Leishmania* é um processo dinâmico. Em todas as formas clínicas da LTA, a resposta imune é dependente de linfócitos T, e as manifestações clínicas são fortemente influenciadas por essas células². Por mais de duas décadas, a maioria dos fenômenos relacionados à imunidade contra LTA foi explicada unicamente pelo paradigma Th1 x Th2. Contudo, a ação conjunta de IL-6 e TGF- β polariza a diferenciação de células do perfil Th17, cujas citocinas como IL-17 e IL-22 foram anteriormente descritas em pacientes com doença ativa e após cura clínica³. Há evidências de que este perfil iniba a diferenciação de células T regulatórias (T_{reg}) que, nas leishmanioses, parecem prevenir a exacerbação da resposta inflamatória via TGF- β e IL-10^{4,5}.

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a expressão de mediadores dos perfis Th17 (TGF- β , IL-6, IL-17, IL-22 e RORC) e Treg (IL-10, TGF- β e Foxp3) em pacientes com LTA ativa.

MATERIAIS E MÉTODOS

Células de 24 pacientes e 6 indivíduos sadios (controle) foram incubadas por 24h na presença do mitógeno fitohemaglutinina (5,0 μ g/ml) ou do antígeno insolúvel (AgIns, 2,5 μ g/ml) de *L. (V.) braziliensis*. As reações de PCR em tempo real foram realizadas em volume final de 20 μ L, utilizando-se primers e sondas específicos (IL6: Hs00985639_m1; IL22: Hs01574154_m1; TGFB1: Hs9999918_m1; Foxp3: Hs00203958_m1; IL17A: Hs00174383_m1; RORC: Hs01076123_m1 e IL-10: Hs99999035_m1). Após normalização com o gene de referência (Human 18S RNA), a quantidade de mRNA expresso nos pacientes em relação ao grupo controle (RQ) foi obtida pelo método do Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), com o nível de significância de 5% (testes Wilcoxon e Mann-Whitney).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sob estímulo da PHA, ambos os grupos expressaram quantidades similares de mRNA para todos os genes analisados ($p > 0,05$).

Em resposta ao antígeno insolúvel, PBMC de pacientes expressaram significativamente Foxp3 em relação aos indivíduos sadios (RQ = 14,21; $P = 0,020$). Resultado similar foi observado em IL-10 (RQ = 8,13; $P = 0,008$). Embora os indivíduos com doença ativa tenham apresentado expressão de IL-17 (RQ = 3,66), IL-22 (RQ = 4,73), IL-6 (RQ = 1,91) e TGF- β (RQ = 2,08) em relação ao grupo controle, não houve diferença significativa ($P > 0,05$). Além disso, RORC foi subexpressa nos pacientes em relação ao grupo sadio (Figura 1).

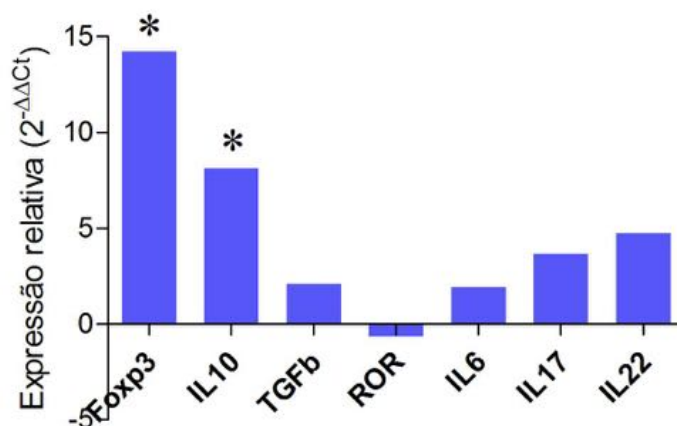


Figura 1. Expressão relativa de mediadores dos perfis Th17 e T_{reg}.

Nota: * = significância estatística

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos apontam a presença de ambos os perfis celulares em pacientes com doença ativa. Porém a expressão aumentada de Foxp3 e IL-10, mediadores presentes no perfil T_{reg}, sugere a ação predominante de tais células nessa fase da LTA.

AGRADECIMENTOS

À FACEPE e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRITO, M. E. F. et al. Species diversity of Leishmania (Viannia) parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. **Tropical Medicine and International Health** 2009: 1-9.
2. SOUZA, M. A. *et al.* Cytokines and NO in American tegumentary leishmaniasis patients: Profiles in active disease, after therapy and in self-healed individuals. **Microbial Pathogenesis** 2013; 57:175–180.
3. SOUZA, M. A. *et al.* American Tegumentary Leishmaniasis: Cytokines and Nitric Oxide in Active Disease and After Clinical Cure, With or Without Chemotherapy. **Scandinavian Journal of Immunology** 2012:175–180.
4. BETTELLI, E. et al. Induction and effector functions of Th17 cells. **Nature** 2008;453(19):1051-1057.
5. CAMPANELLI, A. P. et al. CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic of natural regulatory T cells. **The Journal of Infectious Diseases** 2006:1313-1322.



FUNCTIONALIZATION OF POLYMETHYLMETHACRYLATE SOLID SUBSTRATE SURFACE FOR USE IN DNA BIOSENSOR

P. C. SILVA, ¹I. A. MORALES, ¹R. F. S. SANTOS, ³C. A. S. ANDRADE, ²C. P. MELO

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

²Departamento de Física, UFPE, Recife, Brasil

³Departamento de Bioquímica, UFPE, Recife, Brasil

E-mail: polifisica@hotmail.com

In this work, a surface modification technique applied to polymethylmethacrylate, with the purpose of improving its use in biosensor applications. The key idea is to induce the creation of carboxylic groups onto the polymer surface by varying its exposure time to UV/Ozone irradiation treatment to provide for a better adhesion of nucleotide chains. Contact angle measurements have shown that both surfaces become hydrophilic after treatment with the creation of carboxylic sites; this was verified by use of toluidine blue O absorption analysis and was done fluorescence characterization to study its intrinsic fluorescence. The carboxylic groups were activated with N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxysuccinimide, and ethylenediamine was used to mediate the binding to DNA/RNA chains previously treated with EDC and imidazole. The now biosensitive surface was then exposed during 5 min to a complementary DNA solution. The linkage between the sample and the probe can be detected via an alcoholic solution of polyaniline/Au nanocomposites, a fluorescent polycation biosensor that binds to DNA through electrostatic attraction.

Acknowledgment: This work was supported by CNPq and CAPES.

Keywords: Polymethylmethacrylate; DNA; Biosensor.



NOVA SONDA LUMINESCENTE COM CRIPTATO DE EU 3⁺ PARA HISTOQUÍMICA COM LECTINA EM TUMORES MAMÁRIOS HUMANOS

¹J.M. BRANDÃO, ¹J.L.A. VASCONCELOS, ¹C.L.B. CAVALCANTI, ^{1,2}E.I.C. BELTRÃO

¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco.
juliana.mbrandao@ig.com.br

²Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco

Introdução: O processo de glicosilação é alterado durante processos neoplásicos em glicoconjugados da superfície celular. A histoquímica com lectinas é uma ferramenta que pode auxiliar no diagnóstico do câncer ao analisar o conteúdo sacarídico do tecido. Criptatos de európio (cript-Eu³⁺) são complexos com propriedades luminescentes que, conjugados a biomoléculas, podem funcionar como sondas luminescentes. Este trabalho avaliou o potencial do conjugado, cript-Eu³⁺ e lectina, como sonda luminescente para o diagnóstico e/ou prognóstico de tumores de mama empregando a histoquímica com lectinas (HqL). **Métodos:** Biópsias de tecidos mamários foram utilizadas no estudo para HqL: Fibroadenoma (FIB, n=10); Carcinoma ductal invasivo (CDI, n=10) e tecido normal (n=4). As lectinas UEA-I e Con A (200 µg/mL), específicas para L-fucose e D-glicose/D-manose, respectivamente, foram incubadas com o criptato de Eu³⁺ (0,13 e 0,88 mg) por 2h a 25°C em PBS. Por fim, os tecidos foram analisados em espectrofluorímetro sendo a intensidade de emissão usada na comparação das amostras. **Resultados e Discussão:** Amostras de FIB e CDI exibiram marcação apenas quando marcadas com Con A-cript(Eu³⁺) (emissão média de 12x10⁶cts/s em FIB e 9,5 x 10⁶cts/s em CDI). Não foi registrada emissão em amostras normais. **Conclusão:** A intensidade de luminescência das sondas mostrou padrões diferentes, sugerindo o uso desses conjugados para identificar e, possivelmente, quantificar mudanças na expressão de carboidratos, tornando-as úteis como ferramenta auxiliar para o diagnóstico.

Apoio: CNPq, FACEPE.

Palavras-chave: Criptato de Eu³⁺, Lectina, Câncer de mama.



PADRÃO DIFERENCIAL DE EXPRESSÃO DE *N*-ACETILGLICOSAMINIL TRANSFERASES T2 E T3 EM LESÕES CERVICAIS UTERINAS PRÉ-MALGNAS E MALIGNAS

¹A.L.V. SILVA, ¹A.T.R. CLARK, ^{1, 2}M.J.B.M. RÊGO, ^{1, 2}E.I.C. BELTRÃO

¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco.
athurclark@hotmail.com

²Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco

RESUMO

A poliLacNAc é uma estrutura fundamental em glicoconjugados que é expressa em células/tecidos específicos e associada ao desenvolvimento e carcinogênese. As β 3GnTs desempenham um importante em sua síntese, especialmente β 3GnT2 e β 3GnT3. Suas expressões foram avaliadas com imunohistoquímica em 130 amostras de cérvix uterina humana, sendo 10 normais e 120 com lesão (NIC 1, NIC 2, NIC 3 e CE). β 3GnT3 foi expressa de maneira ubíqua em quase todas as amostras. Já a β 3GnT2 foi mais expressa nas amostras com NIC 3, havendo um aumento progressivo desde NIC 1, e decaindo nas amostras com CE. Os resultados indicam que β 3GnT2 está envolvida na progressão das lesões pré-malignas até o estabelecimento da lesão maligna, podendo dar vantagem durante este desenvolvimento mediando importantes eventos.

INTRODUÇÃO

O carcinoma escamoso (CE) da cérvix uterina normalmente é precedido por uma fase de lesão pré-invasiva, a neoplasia intraepitelial cervical (NIC) (1, 2). Tradicionalmente, as NICs são graduadas em NIC 1, NIC 2 e NIC 3, dependendo do grau de diferenciação (1). Um diagnóstico acurado de lesões pré-malignas é importante para a clínica, mas o diagnóstico histopatológico das NICs pode ser complicado (1).

Estudos de carboidratos de superfície celular são escassos e podem ser úteis para o entendimento do desenvolvimento deste tipo de lesão e seu diagnóstico, já que as células são cobertas com uma densa e complexa rede de glicoconjugados, que diferem entre tipos celulares e mudam de acordo com o desenvolvimento e diferenciação celular (3-6).

Sendo uma das mais comuns modificações pós-traducionais nas células eucarióticas (7-9), a glicosilação está envolvida em uma gama de eventos biológicos (3, 6, 10-14). Adicionalmente, transformações malignas são associadas a alterações nas cadeias de carboidratos em glicoconjugados, (3-5, 11) e podem influenciar direta ou indiretamente a progressão do câncer e o grau de malignidade (4, 5, 11).

Uma cadeia glicídica poli-N-acetilactosamina (poliLacNAc) é uma estrutura fundamental em glicoconjugados (5, 6, 15) e vem sido atribuída a ela envolvimento nas

funções de interações célula-célula, célula-matriz e capacidade de metástase no câncer (6, 15, 16).

A estrutura destes glicanos depende de enzimas, glicosidases e glicosiltransferases, e da disponibilidade de doadores e receptores de açúcares (substratos e co-substratos) dentro do retículo endoplasmático e do aparelho de Golgi (7, 9, 17). Uma enzima chave no processo de síntese das poliLacNAc são as *N*-acetilglicosaminil transferases (6, 14-20), entre elas destacam-se os isotipos β 3GnT2 e β 3GnT3.

OBJETIVOS

Investigar o padrão de expressão de duas *N*-acetilglicosaminil transferases, β 3GnT2 e β 3GnT3, em tecidos de cérvix uterina humana normais e com lesões pré-malignas e malignas e correlacionar com a progressão e desenvolvimento durante os diferentes estágios de malignidade.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras: lesões da cérvix uterina foram obtidas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/CCS/UFPE N° 195/09). As amostras foram coletadas e agrupadas de acordo com a sua classificação histológica, sendo 30 casos de cada lesão (NIC 1, NIC 2, NIC 3 e CE) e 10 casos de epitélio normal.

Imunohistoquímica: cortes de 4 μ m foram desparafinizados, hidratados, tratados com hidróxido de amônio e com tampão citrato (21, 22). Após isso, foram tratados com metanol-H₂O₂, bloqueados com albumina de soro bovina (BSA) em tampão fosfato de sódio (PBS), 100mM, pH 7,2 contendo NaCl 150mM. Em seguida, foram incubados os anticorpos primários (β 3GnT2 1:50 e β 3GnT3 1:100), separadamente. Os anticorpos secundários e terciários (Advance™ HRP – DAKO) foram incubados segundo o fabricante. A peroxidase foi visualizada com DAB-H₂O₂ e os núcleos com hematoxilina. O controle positivo da marcação foi realizado com amostras de trato gastrointestinal (19) e o negativo ao incubar secções de tecido substituindo o anticorpo primário por solução de bloqueio (BSA).

Imagens: a análise e captura das imagens foram realizadas em sistema digital de imagem com microscópio óptico Nikon Eclipse 50i acoplado a câmera digital Nikon DS-Fi1das. Áreas aleatórias foram analisadas considerando o número de células marcadas. A intensidade de marcação foi estabelecida de acordo com Dornelas (23), sendo: 0, marcação negativa; 1+, leve; 2+, moderada; e 3+, intensa. Para a análise estatística os resultados foram dicotomizados como positivos (3+ e 2+) e negativos (1+ e 0) (24, 25).

Estatística: o teste de Fischer foi utilizado para avaliar a relação entre a marcação positiva e os graus das lesões. Foram considerados significantes os casos quando $p < 0.05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

β 3GnT3 mostrou-se ser expressa, mesmo em pequenas quantidades, no citoplasma das as amostras – aproximadamente 99% (Figura 1-1a). Entretanto, sua expressão não foi estatisticamente significativa entre os grupos analisados (Figura 2). Já a expressão β 3GnT2 ocorreu no citoplasma, com maior intensidade que β 3GnT3, novamente em 99% das as amostras (Figura 1-2a), sendo mais expressa nas amostras de lesões com maior grau, especialmente em NIC 3 quando comparada com normal ($p=0.002$), NIC 1 ($p=0.009$) e NIC 2 ($p=0.03$) (Figura 2).

Em 2001, Shiraishi *et al* (19) demonstraram, por RT-PCR, que β 3GnT2 apresentou níveis significantes de expressão em vários tecidos, incluindo o útero, enquanto a β 3GnT3 era expressa em níveis menores. Nossos dados também apresentaram níveis mais altos da expressão de β 3GnT2 quando comparado com β 3GnT3 na cérvix uterina normal. Togayachi *et al* (26), também por RT-PCR, demonstrou que β 3GnT2 e β 3GnT3 são consideravelmente expressas em linhagens celulares humanas de adenocarcinoma de cólon, em células de carcinoma escamoso de pulmão, em adenocarcinoma de pulmão, câncer de estômago, hepatoblastoma, câncer prostático e de pâncreas.

Nossos dados demonstram a expressão de ambas as β 3GnTs em tecidos uterinos humanos transformados, havendo, no entanto, níveis maiores de β 3GnT2. Adicionalmente, nossos dados também demonstram uma progressiva expressão de β 3GnT2 durante a progressão da transformação da cérvix uterina. Em células transicionais de carcinoma de bexiga, Gromova *et al* (11), por RT-PCR, também observou níveis menores de transcritos de β 3GnT2 em tumores invasivos, comparando com suas contrapartes não invasivas. Esses achados mostram que as glicosiltransferases desempenham diferentes papéis de acordo com o tipo celular ou tecido envolvido.

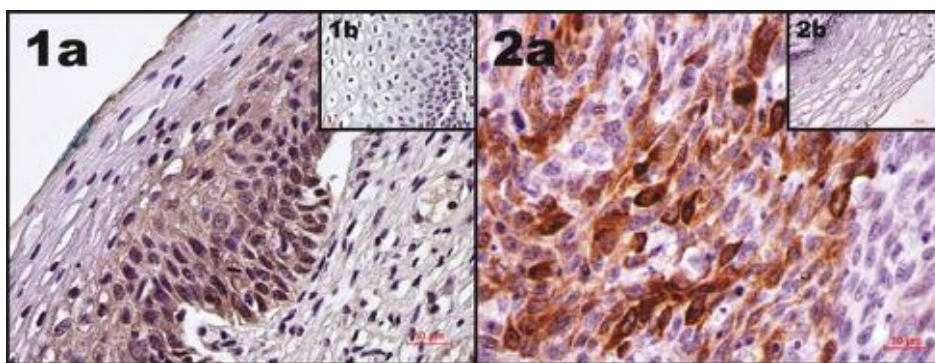


Figure 1: Imunohistoquímica de lesões malignas e pré-malignas da cérvix uterina humana: (1a) Marcação usando anti- β 3GnT3 de uma NIC 2, mostrando uma displasia moderada confinada aos 2/3 basais do epitélio; (2a) Marcação usando anti- β 3GnT2 de um carcinoma escamoso invasivo, mostrando marcação das células invasivas no estroma. (1b e 2b) Controles negativos dos respectivos ensaios.

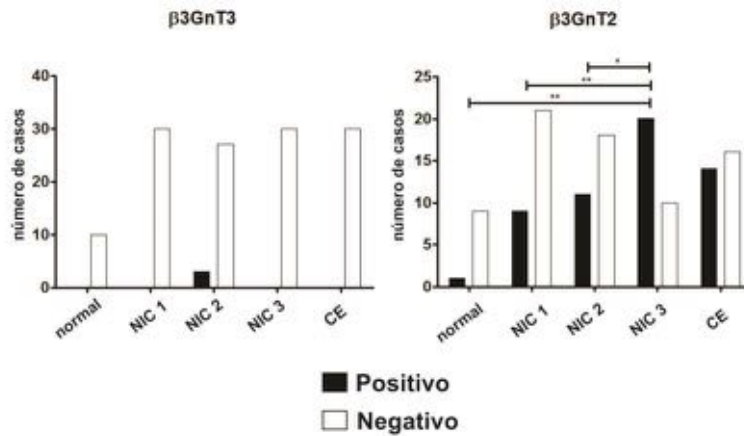


Figure 2: Análise estatística da marcação imunohistoquímica Anti-β3gnT3 e Anti-β3gnT2.

CONCLUSÕES

Houve uma diferença significativa no padrão de expressão da β3GnT2 entre as lesões uterinas. A β3GnT2 parece estar envolvida com a progressão das lesões pré-malignas, já que sua expressão aumenta com o aumento da grau da lesão e diminui com o estabelecimento da lesão maligna. Esse aumento durante a progressão das lesões pré-malignas pode conferir alguma vantagem ao desenvolvimento do tumor ao mediar importantes eventos, como diferenciação, hiperproliferação, desenvolvimento e metástase. Assim, pode haver um potencial envolvimento da β3GnT2 na progressão das lesões cervicais uterinas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo financiamento e fomento necessários para a realização destes resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (não corrigidas)

1. Martin CM, O'Leary JJ. Histology of cervical intraepithelial neoplasia and the role of biomarkers. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*. 2011;25(5):605-15. Epub 2011/06/04.
2. Tiltman AJ. The pathology of cervical tumours. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2005;19(4):485-500.
3. Couldrey C, Green JE. Metastases: the glycan connection. *Breast cancer research : BCR*. 2000;2(5):321-3. Epub 2001/03/16.
4. Kataoka K, Huh NH. A novel beta1,3-N-acetylglucosaminyltransferase involved in invasion of cancer cells as assayed in vitro. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002;294(4):843-8. Epub 2002/06/14.

5. Tateno H, Uchiyama N, Kuno A, Togayachi A, Sato T, Narimatsu H, et al. A novel strategy for mammalian cell surface glycome profiling using lectin microarray. *Glycobiology*. 2007;17(10):1138-46. Epub 2007/08/19.
6. Togayachi A, Kozono Y, Ishida H, Abe S, Suzuki N, Tsunoda Y, et al. Polylysosamine on glycoproteins influences basal levels of lymphocyte and macrophage activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(40):15829-34. Epub 2007/09/25.
7. Dojima T, Nishina T, Kato T, Uno T, Yagi H, Kato K, et al. Comparison of the N-linked glycosylation of human beta1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2 expressed in insect cells and silkworm larvae. *Journal of biotechnology*. 2009;143(1):27-33. Epub 2009/06/23.
8. Kang JG, Ko JH, Kim YS. Pros and cons of using aberrant glycosylation as companion biomarkers for therapeutics in cancer. *BMB reports*. 2011;44(12):765-71. Epub 2011/12/23.
9. Kato T, Suzuki M, Murata T, Park EY. The effects of N-glycosylation sites and the N-terminal region on the biological function of beta1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2 and its secretion. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;329(2):699-705. Epub 2005/03/02.
10. Demetriou M, Granovsky M, Quaggin S, Dennis JW. Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature*. 2001;409(6821):733-9. Epub 2001/02/24.
11. Gromova I, Gromov P, Celis JE. A novel member of the glycosyltransferase family, beta 3 Gn-T2, highly downregulated in invasive human bladder transitional cell carcinomas. *Molecular carcinogenesis*. 2001;32(2):61-72. Epub 2001/12/18.
12. Nakamura N, Yamakawa N, Sato T, Tojo H, Tachi C, Furukawa K. Differential gene expression of beta-1,4-galactosyltransferases I, II and V during mouse brain development. *Journal of neurochemistry*. 2001;76(1):29-38. Epub 2001/01/09.
13. Teneberg S, Leonardsson I, Karlsson H, Jovall PA, Angstrom J, Danielsson D, et al. Lactotetraosylceramide, a novel glycosphingolipid receptor for *Helicobacter pylori*, present in human gastric epithelium. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(22):19709-19. Epub 2002/03/27.
14. Togayachi A, Kozono Y, Kuno A, Ohkura T, Sato T, Hirabayashi J, et al. Beta3GnT2 (B3GNT2), a major polylysosamine synthase: analysis of B3GNT2-deficient mice. *Methods in enzymology*. 2010;479:185-204. Epub 2010/09/08.
15. Ishida H, Togayachi A, Sakai T, Iwai T, Hiruma T, Sato T, et al. A novel beta1,3-N-acetylglucosaminyltransferase (beta3Gn-T8), which synthesizes poly-N-acetyllysosamine, is dramatically upregulated in colon cancer. *FEBS letters*. 2005;579(1):71-8.
16. Tsuboi S, Sutoh M, Hatakeyama S, Hiraoka N, Habuchi T, Horikawa Y, et al. A novel strategy for evasion of NK cell immunity by tumours expressing core2 O-glycans. *EMBO J*. 2011;30(15):3173-85. Epub 2011/06/30.

17. Seko A, Yamashita K. Activation of beta1,3-N-acetylglucosaminyltransferase-2 (beta3Gn-T2) by beta3Gn-T8. Possible involvement of beta3Gn-T8 in increasing poly-N-acetyllactosamine chains in differentiated HL-60 cells. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(48):33094-100.
18. Narimatsu H. Human glycogene cloning: focus on beta 3-glycosyltransferase and beta 4-glycosyltransferase families. *Current opinion in structural biology*. 2006;16(5):567-75. Epub 2006/09/19.
19. Shiraishi N, Natsume A, Togayachi A, Endo T, Akashima T, Yamada Y, et al. Identification and characterization of three novel beta 1,3-N-acetylglucosaminyltransferases structurally related to the beta 1,3-galactosyltransferase family. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(5):3498-507. Epub 2000/10/24.
20. Togayachi A, Sato T, Narimatsu H. Comprehensive enzymatic characterization of glycosyltransferases with a beta3GT or beta4GT motif. *Methods in enzymology*. 2006;416:91-102. Epub 2006/11/23.
21. Lopes FF, Cruz MCFNd, Pereira ALdA, Silveira ÉJDd, Galvão HC, Souza LBd, et al. Análise imuno-histoquímica das citoqueratinas em ameloblastoma e tumor odontogênico adenomatóide. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2005;41:425-30.
22. Pedroso PMO, Pescador CA, Bandarra PM, Raymundo DL, Borba MR, Wouters F, et al. Padronização da técnica de imuno-histoquímica para raiva em amostras de tecido do sistema nervoso central de bovinos fixadas em formol e emblocadas em parafina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2008;28:627-32.
23. Dornelas MT, Rodrigues MF, Machado DC, Gollner AM, Ferreira AP. [Expression of cell proliferation and apoptosis biomarkers in skin spinocellular carcinoma and actinic keratosis]. *Anais brasileiros de dermatologia*. 2009;84(5):469-75. Epub 2010/01/26. Expressao de marcadores de proliferacao celular e apoptose no carcinoma espinocelular de pele e ceratose actinica.
24. dos Santos P, Zanetti J, Ribeiro-Silva A, Beltrao E. Beta 1 integrin predicts survival in breast cancer: a clinicopathological and immunohistochemical study. *Diagnostic Pathology*. 2012;7(1):104.
25. Petricevic B, Vrbanec D, Jakic-Razumovic J, Brcic I, Rabic D, Badovinac T, et al. Expression of Toll-like receptor 4 and beta 1 integrin in breast cancer. *Med Oncol*. 2012;29(2):486-94. Epub 2011/03/15.
26. Togayachi A, Akashima T, Ookubo R, Kudo T, Nishihara S, Iwasaki H, et al. Molecular cloning and characterization of UDP-GlcNAc:lactosylceramide beta 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase (beta 3Gn-T5), an essential enzyme for the expression of HNK-1 and Lewis X epitopes on glycolipids. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(25):22032-40. Epub 2001/04/03.



**PADRÃO DIFERENCIAL DE EXPRESSÃO DE POLI-N-
ACETILLACTOSAMINAS E N-ACETILGLICOSAMINA EM LESÕES
CERVICAIS UTERINAS PRÉ-MALGINAS E MALIGNAS**

¹A.T.R. CLARK, ¹A.L.V. SILVA, ^{1,2}M.J.B.M. RÊGO, ^{1,2}E.I.C. BELTRÃO

¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco.
athurclark@hotmail.com

²Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco

RESUMO

Glicoconjugados são expressos de forma diferenciada em células/tecidos específicos sendo associados ao desenvolvimento e carcinogênese. A expressão de poliLacNAc) e GlcNAc foram avaliadas com histoquímica com lectinas, utilizando PWM e WGA, respectivamente, em 130 amostras cérvix uterina humana, sendo 10 normais e 30 de cada de lesão NIC 1, NIC 2, NIC 3 e CE). A expressão de poliLacNAc foi maior nas amostras com CE, sendo progressivo com o aumento do grau da lesão, e ainda foi observada exclusivamente de maneira nuclear em 50% das amostras com CE. Esta expressão aumentada pode dar vantagem ao desenvolvimento do tumor ao mediar importantes eventos de interação celular, por exemplo. Além disso, quando expressas exclusivamente no núcleo podem ser um indicativo de um prognóstico reservado.

INTRODUÇÃO

Uma fase pré-neoplásica, caracterizada pelas neoplasias intraepiteliais cervicais (NICs), é normalmente um achado cito/histológico que precede o carcinoma escamoso (CE) da cérvix uterina (1, 2). As NICs são graduadas em NIC 1, NIC 2 e NIC 3, dependendo do grau de diferenciação (2). Um diagnóstico acurado de lesões pré-malignas é importante para a clínica, mas o diagnóstico histopatológico das NICs pode ser complicado (2).

Estudos de carboidratos de superfície celular são escassos e podem ser úteis para o entendimento do desenvolvimento deste tipo de lesão e seu diagnóstico precoce, já que as células são cobertas com uma densa e complexa rede de glicoconjugados, que diferem entre tipos celulares e mudam de acordo com o desenvolvimento e diferenciação celular (3-6). Sendo uma das mais comuns modificações pós-traducionais nas células eucarióticas (7-9), a glicosilação está envolvida em uma variada gama de eventos biológicos (3, 6, 10-14). Adicionalmente, transformações malignas são associadas a alterações nas cadeias de

carboidratos em glicoconjugados, (4-6, 13) contribuindo na progressão do câncer e no grau de malignidade (4, 5, 13).

Poli-N-acetilactosaminas (poliLacNAc), uma estrutura linear contendo repetições de unidades de *N*-acetilactosamina ($\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-3$)_n, é uma estrutura fundamental em glicolipídios e glicoproteínas (3, 5, 15). No câncer, as poliLacNAc e estruturas correlatadas desempenham importantes papéis em interações célula-célula, célula-matriz e capacidade de metástase (3, 15, 16). Esses sacarídios podem ser identificadas em tecidos pela lectina *Phytolacca americana* aglutinina (PWM), que reconhece três ou mais repetições de *N*-acetilactosaminas, e pela *Wheat germ* agglutinin (WGA), para *N*-acetilglicosamina.

OBJETIVOS

Investigar o padrão de expressão de duas carboidratos, GlcNAc e cadeias de poliLacNAc, em tecidos de cérvix uterina humana normais e com lesões pré-malignas e malignas e correlacionar com a progressão e desenvolvimento durante os diferentes estágios de malignidade.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras: lesões da cérvix uterina foram obtidas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/CCS/UFPE Nº 195/09). As amostras foram coletadas e agrupadas de acordo com a sua classificação histológica, sendo 30 casos de cada lesão (NIC 1, NIC 2, NIC 3 e CE) e 10 casos de epitélio normal.

Histoquímica com lectinas: cortes de 4 µm foram desparafinizados, hidratados, tratados com tripsina ou com neuraminidase e incubadas com metanol-H₂O₂. As lectinas PWM e WGA (20 µg/mL) foram então incubadas por 2h. A WGA, por ser biotinizada, foi visualizada utilizando o sistema polímero estreptavidina-peroxidase (DAKO, USA). A PWM foi visualizada pelo método indireto com incubação de solução de peroxidase após incubação com a lectina. A peroxidase foi visualizada com DAB- H₂O₂ e os núcleos com hematoxilina. No controle negativo de marcação as lectinas foram substituídas por PBS e no controle de inibição as lectinas foram incubadas inibidas pelo seus respectivos carboidratos, *N*-acetilactosaminas, e *N*-acetilglicosamina para PWM e WGA, respectivamente.

Imagens: a análise e captura das imagens foram realizadas em sistema digital de imagem com microscópio óptico Nikon Eclipse 50i acoplado a câmera digital Nikon DS-Fi1das. Áreas aleatórias foram analisadas considerando o número de células marcadas. A intensidade de marcação foi estabelecida de acordo com Dornelas (17), sendo: 0, marcação negativa; 1+, leve; 2+, moderada; e 3+, intensa. Para a análise estatística os resultados foram dicotomizados como positivos (3+ e 2+) e negativos (1+ e 0) (18, 19).

Estatística: o teste de Fischer foi utilizado par avaliar a relação entre a marcação positiva e os graus das lesões. Foram considerados significantes os casos quando $p < 0.05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença de resíduos terminais de GlcNAc foram mais encontradas no citoplasma e na superfície das amostras com lesões (Figura 1-1a), principalmente nas lesões NIC 1 quando comparada com o normal, NIC 2 e CE ($p < 0.0001$) e CIN 3 ($p = 0.0003$) (Figura 2). Também foi observada uma diminuição gradual com o aumento do grau da lesão (Figura 2).

Cadeias de poliLacNAc, assim como os resíduos terminais de GlcNAc, foram mais expressos no citoplasma e superfície celular das amostras com lesões (Figura 1-2a), sendo expressa em altos níveis nas amostras com CE, especialmente quando comparada com normal ($p = 0.03$), NIC 1 ($p = 0.02$) e NIC ($p = 0.004$) (Figura 2). Além disso, também foi observado um aumento da expressão das cadeias de poliLacNAc à medida que houve aumento do grau da lesão (Figura 2). Também observamos que, em aproximadamente 50% das amostras com CE, a expressão de poliLacNAc foi apenas nuclear (Figura 1-3a), enquanto que nas amostras com lesões pré-malignas e normais só foram observados alguns casos (Figura 2), mostrando uma diferença significativa quando comparado com as amostras normais ($p = 0.01$), NIC 1 ($p = 0.002$), NIC 2 ($p = 0.007$) e NIC 3 ($p = 0.04$).

Vários estudos tem demonstrado a importância da expressão de poliLacNAc em processos cancerígenos e em vários tipos de câncer, envolvidos durante diferenciação (20), hiperproliferação (21), resposta imune (16) e especialmente no crescimento e metastase (22-25). Nossos resultados demonstram um envolvimento com o processo cancerígeno no útero. Também podemos assumir que a diminuição da expressão de resíduos terminais de GlcNAc pode ser explicada pelo aparecimento de outros antígenos de carboidratos, como Sialil-Lewis A, Sialil-Lewis X, Lewis Y, Thomsen-Friedenreich (26) e poliLacNAs.

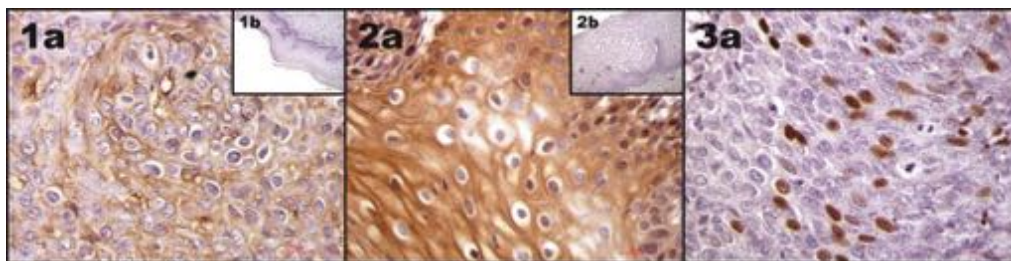


Figure 1: Histoquímica com lectinas de lesões pré-malignas e malignas da cérvix uterina humana: (1a) Marcação usando WGA do epitélio cervical com NIC2. (2a) Marcação usando PWM de uma NIC 1. (3a) Marcação nuclear usando PWM em um carcinoma escamoso invasivo. (1b e 2b) Controles negativos dos respectivos ensaios.

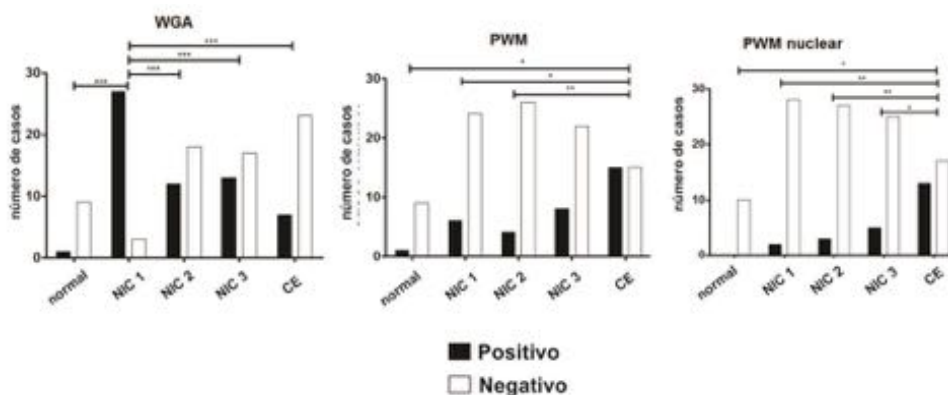


Figure 2: Análise estatística da marcação com histoquímica com lectinas usando WGA e PWM.

CONCLUSÕES

Houve uma diferença significativa no padrão de expressão da GlcNAc e das cadeias de poliLacNAc entre as lesões uterinas. A expressão de GlcNAc diminui com a progressão das lesões, sendo mais expressa na NIC 1. Já expressão de cadeias de poliLacNAc aumenta com a progressão da lesão até as lesões malignas, sendo mais expressas nos CEs. Esse aumento pode estar envolvido na aquisição de vantagens quanto ao desenvolvimento tumoral mediando eventos-chave para sua desdiferenciação. Além disso, quando expressas exclusivamente no núcleo podem ser um sinal de um prognóstico reservado para o paciente.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo financiamento e fomento necessários para a realização destes resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tiltman AJ. The pathology of cervical tumours. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2005;19(4):485-500.
2. Martin CM, O'Leary JJ. Histology of cervical intraepithelial neoplasia and the role of biomarkers. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*. 2011;25(5):605-15. Epub 2011/06/04.
3. Togayachi A, Kozono Y, Ishida H, Abe S, Suzuki N, Tsunoda Y, et al. Polylysine on glycoproteins influences basal levels of lymphocyte and macrophage activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(40):15829-34. Epub 2007/09/25.

4. Kataoka K, Huh NH. A novel beta1,3-N-acetylglucosaminyltransferase involved in invasion of cancer cells as assayed in vitro. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002;294(4):843-8. Epub 2002/06/14.
5. Tateno H, Uchiyama N, Kuno A, Togayachi A, Sato T, Narimatsu H, et al. A novel strategy for mammalian cell surface glycome profiling using lectin microarray. *Glycobiology*. 2007;17(10):1138-46. Epub 2007/08/19.
6. Couldrey C, Green JE. Metastases: the glycan connection. *Breast cancer research : BCR*. 2000;2(5):321-3. Epub 2001/03/16.
7. Dojima T, Nishina T, Kato T, Uno T, Yagi H, Kato K, et al. Comparison of the N-linked glycosylation of human beta1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2 expressed in insect cells and silkworm larvae. *Journal of biotechnology*. 2009;143(1):27-33. Epub 2009/06/23.
8. Kang JG, Ko JH, Kim YS. Pros and cons of using aberrant glycosylation as companion biomarkers for therapeutics in cancer. *BMB reports*. 2011;44(12):765-71. Epub 2011/12/23.
9. Kato T, Suzuki M, Murata T, Park EY. The effects of N-glycosylation sites and the N-terminal region on the biological function of beta1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2 and its secretion. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;329(2):699-705. Epub 2005/03/02.
10. Demetriou M, Granovsky M, Quaggin S, Dennis JW. Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature*. 2001;409(6821):733-9. Epub 2001/02/24.
11. Nakamura N, Yamakawa N, Sato T, Tojo H, Tachi C, Furukawa K. Differential gene expression of beta-1,4-galactosyltransferases I, II and V during mouse brain development. *Journal of neurochemistry*. 2001;76(1):29-38. Epub 2001/01/09.
12. Teneberg S, Leonardsson I, Karlsson H, Jovall PA, Angstrom J, Danielsson D, et al. Lactotetraosylceramide, a novel glycosphingolipid receptor for *Helicobacter pylori*, present in human gastric epithelium. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(22):19709-19. Epub 2002/03/27.
13. Gromova I, Gromov P, Celis JE. A novel member of the glycosyltransferase family, beta 3 Gn-T2, highly downregulated in invasive human bladder transitional cell carcinomas. *Molecular carcinogenesis*. 2001;32(2):61-72. Epub 2001/12/18.
14. Togayachi A, Kozono Y, Kuno A, Ohkura T, Sato T, Hirabayashi J, et al. Beta3GnT2 (B3GNT2), a major poly-lactosamine synthase: analysis of B3GNT2-deficient mice. *Methods in enzymology*. 2010;479:185-204. Epub 2010/09/08.
15. Ishida H, Togayachi A, Sakai T, Iwai T, Hiruma T, Sato T, et al. A novel beta1,3-N-acetylglucosaminyltransferase (beta3Gn-T8), which synthesizes poly-N-acetyl-lactosamine, is dramatically upregulated in colon cancer. *FEBS letters*. 2005;579(1):71-8.

16. Tsuboi S, Sutoh M, Hatakeyama S, Hiraoka N, Habuchi T, Horikawa Y, et al. A novel strategy for evasion of NK cell immunity by tumours expressing core2 O-glycans. *EMBO J.* 2011;30(15):3173-85. Epub 2011/06/30.
17. Dornelas MT, Rodrigues MF, Machado DC, Gollner AM, Ferreira AP. [Expression of cell proliferation and apoptosis biomarkers in skin spinocellular carcinoma and actinic keratosis]. *Anais brasileiros de dermatologia.* 2009;84(5):469-75. Epub 2010/01/26. Expressao de marcadores de proliferacao celular e apoptose no carcinoma espinocelular de pele e ceratose actinica.
18. dos Santos P, Zanetti J, Ribeiro-Silva A, Beltrao E. Beta 1 integrin predicts survival in breast cancer: a clinicopathological and immunohistochemical study. *Diagnostic Pathology.* 2012;7(1):104.
19. Petricevic B, Vrbanec D, Jakic-Razumovic J, Brcic I, Rabic D, Badovinac T, et al. Expression of Toll-like receptor 4 and beta 1 integrin in breast cancer. *Med Oncol.* 2012;29(2):486-94. Epub 2011/03/15.
20. Qiu H, Wu SL, Guo XH, Shen HJ, Zhang HP, Chen HL. Expression of beta1,3-N-acetylglucosaminyltransferases during differentiation of human acute myeloid leukemia cells. *Molecular and cellular biochemistry.* 2011;358(1-2):131-9. Epub 2011/07/02.
21. Kimura A, Terao M, Kato A, Hanafusa T, Murota H, Katayama I, et al. Upregulation of N-acetylglucosaminyltransferase-V by heparin-binding EGF-like growth factor induces keratinocyte proliferation and epidermal hyperplasia. *Experimental dermatology.* 2012;21(7):515-9. Epub 2012/06/22.
22. Dennis JW, Granovsky M, Warren CE. Glycoprotein glycosylation and cancer progression. *Biochimica et biophysica acta.* 1999;1473(1):21-34. Epub 1999/12/02.
23. Lau KS, Dennis JW. N-Glycans in cancer progression. *Glycobiology.* 2008;18(10):750-60. Epub 2008/08/15.
24. Miyoshi E, Terao M, Kamada Y. Physiological roles of N-acetylglucosaminyltransferase V(GnT-V) in mice. *BMB reports.* 2012;45(10):554-9. Epub 2012/10/30.
25. Srinivasan N, Bane SM, Ahire SD, Ingle AD, Kalraiya RD. Poly N-acetyllactosamine substitutions on N- and not O-oligosaccharides or Thomsen-Friedenreich antigen facilitate lung specific metastasis of melanoma cells via galectin-3. *Glycoconjugate journal.* 2009;26(4):445-56. Epub 2008/10/25.
26. Engelstaedter V, Fluegel B, Kunze S, Mayr D, Friese K, Jeschke U, et al. Expression of the carbohydrate tumour marker Sialyl Lewis A, Sialyl Lewis X, Lewis Y and Thomsen-Friedenreich antigen in normal squamous epithelium of the uterine cervix, cervical dysplasia and cervical cancer. *Histol Histopathol.* 2012;27(4):507-14. Epub 2012/03/01.



3º Encontro Brasileiro
para Inovação Terapêutica

1º Workshop
Rede RISH
Rede de Inovação em Insumos
para Saúde Humana
II Workshop
Estabilidade de Fármacos
e Medicamentos

21 e 22/10/2013
Campus UFPE

23 a 25/10/2013
Dorisol Recife
Grand Hotel

Interligando competências científicas, tecnológicas e industriais em espaços de saúde

ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE EM SAÚDE



O ESTUDANTE DE FARMÁCIA NO PET SAÚDE: VIVÊNCIA E EXPERIÊNCIA NA ATENÇÃO BÁSICA EM SAÚDE MENTAL INFANTOJUVENIL

¹R.S. SILVA; ²K.B.G. NÓBREGA

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco.
rafaelasouzasilva@ymail.com

²Departamento de Terapia Ocupacional, Universidade Federal de Pernambuco. kbgn@ig.com.br

Introdução: O PET Saúde é uma das estratégias do Programa Nacional de Reorientação da Formação Profissional em Saúde, que visa uma abordagem integral com ênfase na Atenção Básica. **Métodos:** Trata-se de um relato de experiência das ações desenvolvidas, no projeto “Rede de Atenção Psicossocial: Cuidados Integrals em Saúde Mental Infantojuvenil”, desenvolvido no âmbito do Programa de Educação Tutorial PET Saúde - UFPE, durante o período de novembro de 2012 a setembro de 2013. As informações foram obtidas do diário de campo e do relatório diário de frequência. **Resultados e Discussão:** Foram realizadas atividades de estudo, de pesquisa e de intervenção. Inicialmente buscou-se conhecer o funcionamento da unidade básica de saúde e o reconhecimento dos equipamentos da rede de cuidados. Em seguida, foi feito o mapeamento das crianças e adolescentes em sofrimento psíquico, em conjunto com a equipe da unidade, para o desenvolvimento de ações no território. Foram realizadas visitas domiciliares, acolhimento, discussão de casos e grupos com os usuários. **Conclusão:** Essa experiência permitiu a possibilidade de integração com diferentes áreas do conhecimento e a realização de ações coletivas, colaborando-se com a busca de estratégias para problemas comunitários, além de contribuir para a ampliação do conhecimento e da visão crítica, favorecendo a qualificação do profissional farmacêutico na rede de cuidados e na humanização do atendimento.

Apoio: Pet/Pró-Saúde III – Ministério da Saúde e Ministério da Educação

Palavras-chave: Atenção Primária à Saúde, Rede de Cuidados Continuados de Saúde, Cuidado da Criança, Saúde do Adolescente, Saúde Mental.



UTILIZAÇÃO DE NALTREXONA E BUPROPIONA COMO FÁRMACOS INIBIDORES DE APETITE EM SUBSTITUIÇÃO DOS ANFETAMINÍCOS NO TRATAMENTO DA OBESIDADE

¹ T.R.R. TIMÓTEO, ²L.P.SIQUEIRA

¹ Faculdade ASCES, Caruaru – PE taysatimoteo@hotmail.com

² Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Pernambuco.

Introdução: Atualmente, a busca pelo corpo perfeito está cada vez mais crescente e a utilização de medicamentos para obter resultados mais rápidos está sendo a opção de escolha. Diante da proibição pela ANVISA da prescrição e fabricação dos anorexígenos, outros medicamentos foram postos em seu lugar, um exemplo desse acontecimento é a utilização de bupropiona e naltrexona. **Métodos:** Foram pesquisados artigos nas bases científicas Scopus e Science Direct para elaboração do referencial teórico e receituários nas farmácias de manipulação da cidade de Caruaru – PE. Os dados foram organizados com o auxílio do Excel 2013. **Resultados e Discussão:** Segundos os dados fornecidos pelas farmácias de manipulação foi possível observar uma crescente prescrição de naltrexona de principalmente da bupropiona. As maiores classes prescritores da bupropiona são endocrinologistas, clínicos gerais e psiquiatras. Das prescrições que continham a bupropiona, apenas 9% apresentaram associação com Naltrexona, já das prescrições que continham a Naltrexona, 100% apresentaram associações com Bupropiona. **Conclusão:** Os efeitos obtidos por estes medicamentos pode ser observado a curto prazo, justificando, muitas vezes, seu uso indiscriminado. A combinação desses fármacos têm mostrado resultados muito parecidos com os anorexígenos, quando utilizados, sendo considerados os medicamentos de escolha para o tratamento da obesidade.

Apoio: CNPq.

Palavras-chave: Inibidores de Apetite, Naltrexona, Bupropiona.



3º Encontro Brasileiro
para Inovação Terapêutica

1 Workshop
Rede RISH
Rede de Inovação em Insumos
para Saúde Humana

II Workshop
Estabilidade de Fármacos
e Medicamentos

21 e 22/10/2013
Campus UFPE

23 a 25/10/2013
Dorisol Recife
Grand Hotel

Interligando competências científicas, tecnológicas e industriais em espaços de saúde

CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO EM SAÚDE



A DISPOSABLE IMMUNOSENSOR BASED ON AMINO-FUNCTIONALIZED CARBON NANOTUBES FOR CARDIAC TROPONIN T DETECTION

¹T.A. FREITAS, ¹A. B. MATTOS, ¹B.V.M. SILVA, ¹A.C.M.S. DIAS, ¹V.P.A. LANDIM, ²P.M.S. SILVA, ¹R.F. DUTRA

¹Laboratório de Engenharia Biomédica, Centro de Tecnologia e Geociências, Universidade Federal de Pernambuco. tatiannyassis@yahoo.com.br

²Laboratório de Glicoproteínas, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco.

ABSTRACT

A simple amino-functionalization method for carbon nanotubes (CNTs) and their application in an electrochemical immunosensor for human cardiac troponin is described. Multiwalled CNTs were amino-functionalized using ethylenediamine reagent to oriented immobilization of antibodies. Assays were designed by a fractional factorial study associated with Doehlert matrix. Structural modifications in the CNTs were confirmed by Fourier transform infrared spectroscopy. Amino-functionalized CNTs were attached to the screen-printed carbon electrode and a sandwich-type immunoassay was performed for cardiac troponin T detection. Under optimal conditions, the immunosensor showed a broad linear range (from 0.02 to 0.32 ng/mL) and a low limit of detection (0.016 ng/mL) in serum samples.

Keywords: immunosensor, amino-functionalization, carbon nanotubes, cardiac troponin T, acute myocardial infarction.

INTRODUCTION

Cardiovascular diseases are the leading cause of death globally according to the World Health Organization statistics. Among the cardiovascular diseases, acute myocardial infarction (AMI) is one of the most serious diseases that extremely affect people's health (1). In the past decades, cardiac troponins (cTnT and cTnI) have been recommended as the biomarkers of choice for the serological diagnosis and prognosis of AMI because of their high sensitivity and specificity (2,3). In particular, the cTnT levels increase 2–4 h after the AMI symptoms and could be elevated up to 14 days after the acute episode of myocardial damage (4,5). Thus, the development of a rapid and practical immunosensor for detecting cTnT in serum samples from patients with myocardial infarction is desirable due to its roles in cardiospecific diagnosis, risk stratification, prognostic risk assessment and therapeutic choices.

Screen-printing technology is a well-established and practical approach, ideal for development of electrochemical point-of-care testing. Screen-printed electrodes (SPEs) provide advantages of easy miniaturization and portable instrumentation, making possible the on-site detection of different target analytes (6). Several methods have been devoted to increase the surface area of SPEs and enhance their sensitivity for electrochemical detection, including the application of nanomaterials (7,8,9). The use of SPEs based on carbon nanotubes (CNTs) has attracted the interest of researchers in the field of electrochemical immunosensors, due to their excellent properties, such as easy surface functionalization, increase on the amount of immobilized biomolecules and in the electron transfer charge on the electrode surface (10).

OBJECTIVES

In this work, a simple method based on fractional factorial design has been proposed for amino-functionalization of the CNTs using ethylenediamine (EDA) as crosslinking reagent. After optimization of the functionalization process, amino-CNTs were employed to develop an immunosensor for cTnT, important biomarker for acute myocardial infarction.

MATERIAL AND METHODS

Electrochemical studies were performed using a μ Autolab III analysis system with GPES 4.9 software, Eco Chemie. Screen-printed carbon electrodes were purchased from DropSens. These electrodes incorporate a conventional three-electrode configuration, printed on ceramic substrate. Both working (disk-shaped) and counter electrodes were made of carbon inks, whereas the pseudoreference electrode and electric contacts were made of silver. Cyclic voltammeteries were performed at 100 mV/s scan rate in 0.1 M PBS (pH 7.0).

Prior to use, carboxylic groups of the multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) were activated using a solution of 0.1 M acetate buffer (pH 4.8) containing 0.1 M EDC and 0.2 M NHS (1:1). At the same time, amino groups of EDA were submitted to an acid treatment in 0.1 M H₂SO₄ solution for 2 h under stirring conditions at 60°C, changing their protonation state. After that, 1 mg activated MWCNTs was dispersed in 1 mL EDA and stirred for 2 h at room temperature. The resulting amino-MWCNTs were dried at 150°C and following dispersed in DMF under sonication during 2 h.

Working electrode surface was coated with 3 μ L of the amino-MWCNTs and dried at 40°C. Then, SPE surface was incubated with an aliquot of anti-cTnT (1 μ g/mL) for 1 h. To avoid non-specific binding, the modified electrode surface was blocked with an aliquot of 50 mM glycine solution for 2 h.

For evaluating the analytical response of the immunosensor, the modified electrodes were incubated with an aliquot of the cTnT at different concentrations for 30 min. After that, the electrode was incubated with anti-cTnT-HRP for 1 h. In each incubation step, the electrodes were carefully washed with 0.1 M PBS (pH 7.0).

RESULTS AND DISCUSSION

Amino-functionalization of the MWCNTs with EDA was investigated using a fractional factorial design, which shows the influence of various factors on the experimental results and the optimum setting for each factor. To optimize the different variables involving the amino-functionalization process of MWCNTs, a fractional factorial design associated with Doehlert matrix was used. The Pareto diagram demonstrated that the more significant effects in the reduction current were EDA concentration and time of acid treatment of the EDA. The factors were selected and simultaneously optimized by Doehlert design. EDA concentration was evaluated at five levels (10, 25, 50, 75 and 100%) and time of acid treatment of the EDA at three levels (1, 2 and 4 h). Figure 1 shows the surface response obtained for the experiments considering the previously obtained effects. The optimum conditions generated the highest current peak corresponding to 70% and 2.5 h of the EDA concentration and time of acid treatment of the EDA, respectively.

Human serum samples spiked with different cTnT concentrations were analyzed by chronoamperometry fixing the working potential at -0.3 V for 120 s. As shown in Figure 2, calibration plot exhibited a good linear correlation between 0.02 and 0.32 ng/mL cTnT ($r=0.985$, $n=5$, $p<0.001$). The limit of detection was estimated at 0.016 ng/mL showing a high sensitivity; thereby this immunosensor can be useful for cTnT determination in clinical routine, since the cutoff is found at approximately 0.02 ng/mL in the AMI diagnosis.

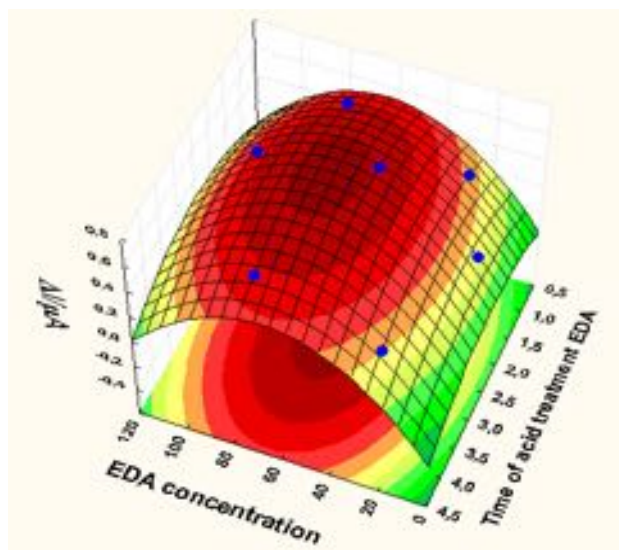


Figure 1. Surface response obtained from the Doehlert design employed for the optimization of the EDA concentration and time of acid treatment of the EDA in the MWCNT amino-functionalization procedure.

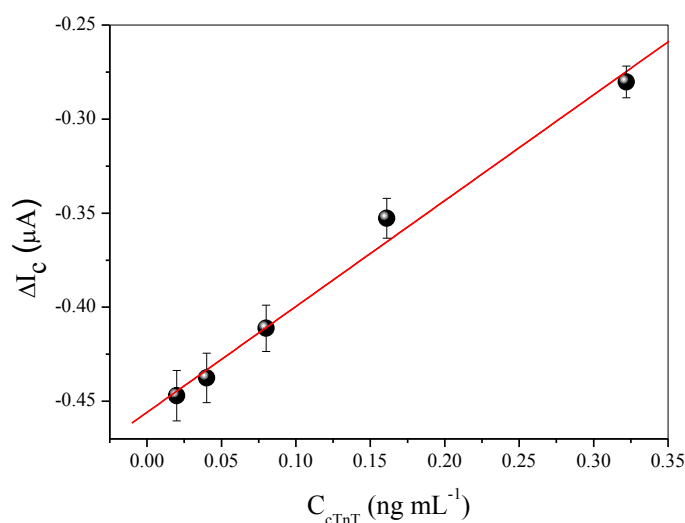


Figure 2. Calibration curve of the resulting immunosensor for cTnT detection in human serum.

CONCLUSIONS

Herein, it was proposed a simpler method for amino-functionalization of MWCNTs than previously described ones. It is not time-consuming and does not require costly multistep reactions, several coupling reagents or strictly controlled processes. The experimental conditions were optimized using a fractional factorial study showing that the protonation time and EDA concentration are limiting for successful of MWCNTs functionalization. It was possible an anti-cTnT oriented immobilization and development of an immunosensor for cTnT with high sensitivity and reproducibility for AMI diagnosis.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Brazilian agency. The assistance of the PROCAPE (Cardiac Emergency of Pernambuco, Recife - PE, Brazil) is also acknowledged.

REFERENCES

- (1) H. D. White, D. P. Chew, Acute myocardial infarction, *The Lancet*, 372 (2008) 570-58.
- (2) A.A. Mohammed, J.L. Januzzi, Clinical Applications of Highly Sensitive Troponin Assays, *Cardiology in Review*, 18 (2010) 12-19.
- (3) F.S. Apple, A.H.B. Wu, A.S. Jaffe, European Society of Cardiology and American College of Cardiology guidelines for redefinition of myocardial infarction: How to use existing assays clinically and for clinical trials, *American Heart Journal*, 144 (2002) 981-986.

- (4) J. Shen, W. Huang, L. Wu, Y. Hu, M. Ye, Thermo-physical properties of epoxy nanocomposites reinforced with amino-functionalized multi-walled carbon nanotubes, *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 38 (2007) 1331-1336.
- (5) Z. Yang, D. Min Zhou, Cardiac markers and their point-of-care testing for diagnosis of acute myocardial infarction, *Clinical Biochemistry*, 39 (2006) 771-780.
- (6) N. Serrano, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, Ex situ deposited bismuth film on screen-printed carbon electrode: a disposable device for stripping voltammetry of heavy metal ions, *Electroanalysis*, 22 (2010) 1460–1467.
- (7) M. Díaz-González, D. Hernández-Santos, M. B. González-García, A. Costa-García, Development of an immunosensor for the determination of rabbit IgG using streptavidin modified screen-printed carbon electrodes, *Talanta*, 65 (2005) 565–573.
- (8) P. Ekabutr, O. Chailapakul, P. Supaphol, Modification of disposable screen-printed carbon electrode surfaces with conductive electrospun nanofibers for biosensor applications, *Journal of Applied Polymer Science*, (2013) 1-9.
- (9) C.I.L. Justino, T.A.P. Rocha-Santos, A.C. Duarte, Advances in point-of-care technologies with biosensors based on carbon nanotubes, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 45 (2013) 24-36.
- (10) C. Singh, S. Srivastava, M.A. Ali, T.K. Gupta, G. Sumana, A. Srivastava, R.B. Mathur, B.D. Malhotra, Carboxylated multiwalled carbon nanotubes based biosensor for aflatoxin detection, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 185 (2013) 258-264.



ANÁLISE DO POLO FARMACOQUÍMICO E DE BIOTECNOLOGIA DE PERNAMBUCO ATRÁVES DO MODELO DE HÉLICE TRÍPLICE

¹MICHEL SATURNINO BARBOZA

¹Grupo de Pesquisa Sociedade e Natureza, Departamento de Ciências Geográficas, Universidade Federal de Pernambuco. michels.barboza@gmail.com

RESUMO

Um modelo com base no processo de inovação que articule se articule de forma tríplice, dinamizando e buscando interações universidade-indústria-governo constituem o substrato de análise desta pesquisa. Foram identificadas através do Modelo de Hélice Tríplice proposto por Henry Etzkowitz as interações entre os seus elementos a partir da instalação do Polo Farmacoquímico e de Biotecnologia de Pernambuco. O trabalho coloca o papel da geração e fomento da inovação como combustível de uma sociedade baseada na produção e no conhecimento. Esses pilares compõem alternativas significativas para o desenvolvimento brasileiro e especificamente em Pernambuco. Os fortalecimentos dos espirais da tríplice hélice compõem o conjunto de desafios de promoção da inovação em Pernambuco.

INTRODUÇÃO

O nível de adensamento técnico e sua capacidade de integração com os diversos pontos no interior e exterior do território brasileiro definirá a situação hierárquica do Pólo Farmacoquímico e de Biotecnologia situado no município de Goiana em Pernambuco. Pode-se apresentar, para o referido caso de Goiana, um pólo que inicialmente contraria as lógicas da eminente teoria, quando se estabelece em uma área periférica e num município com pouca tradição industrial de alta tecnologia, um centro de produção em hélice tríplice. Os imperativos tecnológicos no território constituem um lócus de possibilidades frente ao contexto produtivo industrial e das formas de reprodução do espaço. No desenvolvimento das lógicas capitalistas de produção industrial a inovação é recuperada como um estágio da compreensão da técnica enquanto elemento articulador da produção e em uma economia baseada no conhecimento e na competitividade. A proposta do Pólo Farmacoquímico adaptado ao modelo de hélice tríplice reforça as diferenças dos denominados parques científicos pernambucanos e nordestinos, das estruturas e funcionamento dos sistemas de empresas de capital de risco, às incubadoras e ao parque científico e tecnológico. Neste contexto, Etzkowitz (2009) apresenta os contrastes das teorias que privilegiam o governo e as empresas na geração de inovação, pois, a hélice tríplice foca na universidade, esta por sua vez, como importante geradora de empreendedorismo e tecnologia, bem como as investigações críticas. As interações entre Governo Universidade e Empresas funcionam como uma importante alternativa

frente aos desafios da inovação regional, e no caso desta pesquisa, uma possibilidade de articulação com as políticas públicas e privadas na produção de produtos farmacológicos e biotecnológicos.

OBJETIVOS

Na constituição do território do Pólo Farmacológico e de Biotecnologia de Pernambuco a compreensão dos processos de interação entre a Universidade, o Governo e as Indústrias como os principais agentes produtores da inovação regional, a partir do modelo de hélice tríplice constituem o locus central de análise desta pesquisa. As interações entre esses três agentes figuram a base para as transformações socioterritoriais propostas para a Goiana considerando a divisão territorial do trabalho para o Estado de Pernambuco.

MATERIAIS E MÉTODOS

No contexto da análise metodológica do modelo de hélice tríplice que sirva de substrato para a compreensão do processo e das alternativas do Pólo Farmacológico e de Biotecnologia de Pernambuco refere-se a uma plataforma para a “formação de instituições”, a criação de novos formatos organizacionais para promover a inovação, como uma síntese de elementos da hélice tríplice. A hélice tríplice captura essa transformação de papéis e relacionamento como espirais entrelaçadas em diferentes relações de um com o outro. No regime *laissez-faire* da hélice tríplice, a indústria é a força impulsionadora, com outras duas espirais como estruturadoras de suporte ancilar; em um regime estatista, o governo tem um papel de liderança sobre a academia e a indústria. As espirais raramente saem iguais; uma geralmente serve como força motivadora, a organizadora da inovação, em torno da qual as outras giram. A instituição que age como espiral central muda como o tempo, já que uma espiral substitui a outra como força motriz em uma configuração da hélice tríplice. Foi somada aos procedimentos acima descritos a coleta de dados secundários em bases do CNPq, CAPES, IBGE, IPEA e a consulta a documentação bibliográfica e iconográfica sobre o tema.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A instalação do complexo industrial farmacológico em Goiana chega ao Estado de Pernambuco no momento em que se avança na dimensão da inovação, deixando a perspectiva desse fenômeno enquanto apenas melhoria dos produtos industriais, e assumindo uma configuração recente de que a inovação constitui um conjunto de formas de relacionamentos entre a formação e empresas, altas tecnologia e crescimento econômico. A sociedade baseada no conhecimento fomenta um dos importantes contextos da produção do espaço por parte da sociedade, dos governos e das empresas, no entanto, este contexto se concretiza com a acentuação do capital financeiro e das possibilidades de reprodução do capital industrial contemporâneo. Para o pólo de Goiana, as perspectivas de que o conhecimento se apresente como principal fomentador

das lógicas de produção das denominadas ‘novas’ atividades industriais, capitaneadas pelas unidades no pólo e pela automobilística FIAT, representam a inserção de um imperativo tecnológico em que não necessariamente configure a geração de novos conhecimentos. A importância das instituições, centros de pesquisas e especialmente das universidades brasileiras para o pólo, pois, estes se encontram no cerne das estratégias de inovações. A inserção do Pólo apresentou uma estimativa de inserção no contexto regional de um arranjo produtivo tecnológico com grande possibilidade de geração de inovação para a saúde no Nordeste, e particularmente em Pernambuco. Desta maneira, a proposta de instalação do pólo farmacológico significou uma oportunidade de integração ente setores produtivos dinâmicos, com vistas a minimização dos desníveis regionais para a consolidação de competências científicas, industriais e tecnológicas para o Brasil.

CONCLUSÕES

As lacunas no desenvolvimento regional podem ser preenchidas a partir de um centro da inovação e da pesquisa. O pólo é o conjunto de organizações políticas, entidades industriais e universidades que trabalham em conjunto para melhorar as condições locais para a inovação, formando a hélice tríplice. No entanto, a prerrogativa de assumir o papel de liderança para solucionar as crises de inovação no pólo ficou a cargo do governo estadual e das possíveis parceiras com instituições de ensino superior e centros de pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BICUDO JÚNIOR, Edison Claudino. Produção de medicamentos no território brasileiro: política farmacêutica e política territorial In: **GEOUSP** - Espaço e Tempo, São Paulo, Nº 25, pp. 123 - 137, 2009.

BOSCHMA, R. The competitiveness of regions from a evolutionary perspective. In: **Regional Studies**, 38 (9)., 2004.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INSUMOS ESTRATÉGICOS. DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA. **Política nacional de ciência, tecnologia e inovação em saúde**. 2. ed.– Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2008.

CAPES. COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR. **Plano Nacional de Pós-Graduação – PNPg 2011-2020**. vol.1. Brasília: CAPES, 2010.

CGEE. **Ciência, tecnologia e inovação para o desenvolvimento das Regiões Norte e Nordeste do Brasil: Novos desafios para a política nacional de CT&I**. – Brasília: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2011.

CORRÊA, Roberto Lobato. Inovações espaciais urbanas – algumas reflexões. In: **CIDADES: Revista Científica**. vol.07.n.11. 2010. Presidente Prudente: Grupo de Estudos Urbanos; Expressão Popular, 2010.p.149-159.

ETZKOWITZ, Henry. **Hélice tríplice: universidade-indústria-governo: inovação em ação**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2009.

FOLKE, C. Resilience: the emergence os a perspective for social-ecological systems analyses. In: **Global Environmental Change**. 16. P.253-267., 2006.

HOLANDA, Ariosto. **Ciência e tecnologia: marcos históricos**. Centro de Documentação e Informação. Coordenação Edições Câmara. Brasília, 2011.

LÖWY, Michael. A teoria do desenvolvimento desigual e combinado. In: *Actuel Marx*, 18, 1995. Tradução de Henrique Carneiro. Disponível in: http://www.controversia.com.br/uploaded/pdf/13596_lowy.pdf

PERNAMBUCO. **Relatório Final do Plano Diretor do Pólo Hemofarmo**. Goiana, Pernambuco. Multiconsultoria: Recife, 2006.

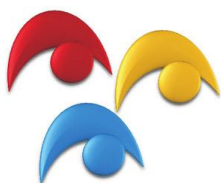
PIRAGIBE, Clélia. Ciência, tecnologia e inovação na Califórnia: a perspectiva empresarial. In: CGGE. **Nova geração de política em ciência, tecnologia e inovação: Seminário Internacional** - Brasília, DF: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2010. p.115-138.

SANTOS, Milton. **A Natureza do Espaço: Técnica e Tempo, Razão e Emoção**. 4.ed. 4.reimpr. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2008.

SILVA, Ana Rosa Cavalcanti. **A abordagem do desenvolvimento local sustentável pela mídia: o caso do Pólo Farmacoquímico de Pernambuco**. Mestrado Profissional em Gestão do Desenvolvimento Local Sustentável. Recife, UPE/FACAP.2011.

SUZIGAN, Wilson; ALBUQUERQUE, Eduardo da Motta e. A interação universidades e empresas em perspectiva histórica no Brasil. In: SUZIGAN, Wilson; ALBUQUERQUE, Eduardo da Motta e; CAIRO, Silvio Antonio Ferraz.(Orgs.). **Em busca da inovação: interação universidade-empresa no Brasil**. Belo Horizonte: Autêntica Editora, 2011.p.17-43.

SUZIGAN, Wilson; ALBUQUERQUE, Eduardo da Motta e; CAIRO, Silvio Antonio Ferraz.(Orgs.). **Em busca da inovação: interação universidade-empresa no Brasil**. Belo Horizonte: Autêntica Editora, 2011.



APLICAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO NO ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

¹A. P. OLIVEIRA-MENDES, ¹B.C. OLIVEIRA, ¹M.C.A.B. CASTRO, ¹M.A. SOUZA, ¹M.E.F. BRITO, ¹V.R.A. PEREIRA

¹Laboratório de Imunogenética, Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ/PE.
andresadeolinda@gmail.com

RESUMO

Embora estudos avaliem a resposta humoral na LTA, ainda não está completamente esclarecido o papel de anticorpos específicos na imunidade contra *Leishmania*. Sabe-se que ainda não existe um diagnóstico considerado padrão-ouro da LTA, e com isso a técnica de citometria de fluxo foi utilizada como meio de avaliação clínica-laboratorial de portadores de LTA ativa e após cura clínica. Considerando ainda as aplicabilidades da citometria de fluxo (CF), foram iniciadas atividades dos isotipos IgG com a padronização do IgG1. A análise comparativa dos índices de desempenho demonstrou que CF foi superior a IFI. Além disso, a técnica permitiu identificar a cura na maioria dos pacientes comparada à IFI, proporcionando perspectivas para o monitoramento de cura pós-terapêutica da LTA.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é causada por diferentes espécies de *Leishmania*. No Brasil, o agente etiológico que tem maior incidência é a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, transmitida por flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*. É considerada uma doença em expansão, com uma incidência anual de cerca de 35.000 casos¹, o que constitui um grave problema de saúde pública. Embora altos títulos de anticorpos possam ser encontrados em todas as manifestações clínicas da LTA, geralmente se aceita que a resposta imune protetora na infecção por *Leishmania* seja essencialmente celular, relegando a participação dos anticorpos a segundo plano². Estudos voltados para a análise da resposta imune humoral na LTA têm abordado o papel das imunoglobulinas em mecanismos imunopatológicos envolvidos na resistência e/ou patogênese da infecção; além disso, também avaliam o uso em investigações sorológicas no diagnóstico e no monitoramento da eficácia pós-tratamento^{3,4,5,6}. Além dos desafios sócio-econômicos que agravam ainda mais o problema da LTA, o diagnóstico da doença demonstra dificuldades^{7,8,9}. Como ainda não existe um teste de diagnóstico considerado padrão-ouro para a LTA, e o mesmo é realizado pela associação dos aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, é necessária a associação de vários

elementos para se chegar ao diagnóstico definitivo¹⁰. Assim, devido às limitações dessas técnicas, abordagens imunológicas alternativas vêm sendo empregadas. Uma delas é a citometria de fluxo, tecnologia que mede e analisa simultaneamente diversas características físicas de partículas individuais, à medida que o fluxo do fluido passa por um feixe de luz, permitindo com isso a detecção de anticorpos anti-*Leishmania*^{11,12}.

OBJETIVOS

O objetivo do trabalho foi a utilização da técnica de citometria de fluxo como meio de avaliação clínica-laboratorial de portadores de LTA ativa e após cura clínica. Considerando as aplicabilidades da citometria de fluxo, foi também realizada no presente estudo uma nova abordagem utilizada na pesquisa de anticorpos com aplicabilidade superior aos diferentes protocolos de detecção e revelação convencionais, que teve como objetivo a padronização da melhor diluição do isotipo IgG1 para ser utilizado na citometria de fluxo com aplicabilidade no diagnóstico e critério de cura da LTA.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas 14 amostras de soro inativadas que foram centrifugadas e o sobrenadante alíquotado e estocado a -20°C até o uso. Formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* foram expandidas em meio Schneider's. Em seguida, os parasitos foram submetidos a baixa centrifugação e lavados em salina tamponada contendo 10% de SFB. O sedimento formado foi homogeneizado, a alíquota de parasitos da suspensão foi contada e a concentração ajustada para os ensaios de imunofluorescência indireta (IFI) e citometria de fluxo. Os pacientes que demonstraram títulos a partir de 1:20 foram considerados positivos na IFI. Na padronização do isotipo IgG1, soros de indivíduos com infecção ativa para LTA confirmada (CI) e indivíduos sem manifestação clínica (SI) (residentes em área não endêmica para LTA em PE) foram diluídos (1:64 a 1:8192) e incubados na presença de parasitos de *L (V) braziliensis*. Em seguida, foram novamente incubados na presença do anti-IgG1 humana, empregando-se diluições seriadas de 1:100 a 1:6400; e reincubados na presença da estreptavidina conjugada a ficoeritrina-PE na diluição de 1:400.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos soros avaliados, 92,85% (13/14) foram positivos para o teste de imunofluorescência indireta antes do tratamento. Um ano após o tratamento com Glucantime, 61,54% (8/13) foram positivos; dois anos após o tratamento 70% (7/10) e 5 anos após o tratamento 50% (5/10) foram positivos (figura 1).

Para IgG1, os resultados demonstraram alta reatividade nas sete diluições do conjugado testadas, com PFP $\geq 20\%$ no grupo CI para LTA. Considerando o menor valor de PFP para o grupo SI, onde PFP $\leq 20\%$, a diluição 1:1600 do anti-IgG1 demonstrou ser a melhor diluição, afim de garantir a sensibilidade do método de citometria de fluxo como ferramenta diagnóstica da LTA. A análise global dos resultados obtidos sugere que a citometria de fluxo aplica-se ao rastreamento da LTA como parte da pesquisa em um paciente, uma vez que o teste foi positivo na presença da doença. A análise comparativa dos índices de desempenho demonstrou que citometria de fluxo foi superior a IFI, indicando que a técnica é uma alternativa diagnóstica com aplicabilidade no estudo da LTA.

CONCLUSÕES

Portanto, a técnica permitiu identificar a cura na maioria dos pacientes comparada à IFI, proporcionando perspectivas para o monitoramento de cura pós-terapêutica da LTA através da metodologia empregada. O estudo demonstrou que os ensaios sorológicos baseados na citometria de fluxo constituem um campo com grandes possibilidades de crescimento e acreditamos que a aplicação da citometria de fluxo, na detecção de LTA em pacientes antes e pós-tratamento possa contribuir para a obtenção de um método de maior sensibilidade e especificidade, com aplicação diagnóstica e como critério de cura na LTA.

AGRADECIMENTOS

A FACEPE pelo apoio financeiro, a Lucas F. Rocha pelo apoio técnico e ao CPqAM/FIOCRUZ pelos recursos para o desenvolvimento do estudo. E a colaboração com o Dr. Olindo Assis Martins-Filho do CPqGM/FIOCRUZ.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- MS/MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Controle da Leishmaniose tegumentar americana**. 2. ed. Brasília, 2007.
- 2- LIEW, F.; O'DONNELL, C.A. Immunology of leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 32, p. 161-259, 1993.
- 3- O'NEIL CE, et al. *Leishmania (Viannia) panamensis* – specific IgE and IgA antibodies relation to expression of human tegumentary leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 49: 181-188, 1993.
- 4- RODRIGUEZ, V., et al. The IgG isotypes of specific antibodies in patients with American cutaneous leishmaniasis; relationship to the cell-mediated immune response. **Parasity Immunology**, v. 18, n.7, p. 341-345, 1996.

- 5- MOLESLEH, I.M., et al. Serodiagnosis of cutaneous leishmaniasis in Jordan using indirect antibody test and the enzyme-linked immunosorbent assay. **Acta Tropica**, v. 59, n.2, p. 163-172, 1995.
- 6- CHIARI, C.A. et al. Reação de Imunofluorescência indireta no controle de tratamento da leishmaniose tegumentar americana. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 15, n. 5, p. 298-303, 1973.
- 7- BRITO, M. E. F., et al. Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. **Clinical and diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 7, n. 2, p. 318-321, Mar. 2000.
- 8- BRITO, M. E. F., et al. Clinical epidemiological profile of American tegumentary leishmaniasis at the Pinto Sugar Mill in Moreno Municipality, Greater Metropolitan Recife, Pernambuco State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n.10, p. 2445-2448, Oct, 2008.
- 9- KAR, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 21, n. 2, p. 123-152, 1995.
- 10-TAVARES, C.A., et al. Molecular diagnosis of leishmaniasis. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v.3, n. 5, p. 657-667, 2003.
- 11-ROCHA, R. D. R., et al. Anticorpos antipromastigotas vivas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, detectados pela citometria de fluxo, para identificação da infecção ativa de leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 6, p. 551-562, Nov/Dec. 2002.
- 12- ROCHA, R. D. 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 and International Health**, Oxford, v.11, n. 2, p. 156-166, Feb. 2006.



AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E DA RESPOSTA DOS RECEPTORES BETA - ADRENÉRGICOS CARDÍACOS NA PROLE SUBMETIDA AO DIABETES GESTACIONAL

¹D.R.F. OLIVEIRA, ¹G.M.R.F. SANTOS, ¹G.I.B.P. DUARTE, ¹C.O. SILVA

¹Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Cardiovascular, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco. bio_diegorafael@hotmail.com

Introdução: Diabetes gestacional (DG) pode ter consequências deletérias na função cardiovascular da prole adulta. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do DG sobre o metabolismo lipídico e a resposta dos receptores beta-adrenérgicos cardíacos na prole. **Métodos:** Ratas Wistar foram acasaladas e no 7º dia de gestação o DG foi induzido com estreptozotocina (42mg/kg, i.p). A prole foi dividida em 2 grupos: controle (ND; n=7) e diabetes gestacional (DG; n=7). Aos 4 meses de idade, foram realizadas dosagens de glicose, triglicerídeos, colesterol total (CT) e HDL. Após 24 horas, os animais foram sacrificados e os corações perfundidos (Langendorff) à pressão constante. Foram registradas a pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE) e a frequência cardíaca (FC). **Resultados e Discussão:** Os níveis de glicemia, CT e triglicerídeos foram elevados na prole DG quando comparados a prole ND. Em preparações de coração isolado, a infusão de isoproterenol (ISO) induziu um aumento ($p < 0,001$) da PSVE. Este efeito inotrópico foi significativo na concentração de 10^{-6} e 10^{-4} M. Entretanto, houve uma atenuação do efeito inotrópico na prole DG, mostrando que a sensibilidade para o ISO foi reduzida. **Conclusão:** Os resultados sugerem que a hiperglicemia durante a gestação induz alterações metabólicas na prole, o que poderá favorecer ao aparecimento das doenças cardiovasculares na vida adulta. Ademais, a resposta beta-adrenérgica em preparações de coração isolado, está comprometida.

Apoio: CNPq, FACEPE.

Palavras-chave: diabetes mellitus experimental, estreptozotocina, hiperglicemia.



BIOSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA A DETECÇÃO DE GLICOPROTEÍNAS NO SORO DE PACIENTES CONTAMINADOS POR DENGUE

^{1,2}D.M.N. LUNA, ²M.D.L. OLIVEIRA, ³M.L. NOGUEIRA, ^{1,2}C.A.S ANDRADE

¹Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco.

²Laboratório de biodispositivos Nanoestruturados, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco.

³Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
deboramluna@hotmail.com

RESUMO

A dengue é uma doença considerada um problema de saúde pública mundial. Desta forma, novos métodos para o diagnóstico precoce e em tempo real são necessários. Neste trabalho propomos o desenvolvimento de um biossensor constituído por membranas lipídicas e lectina para a detecção de glicoproteínas presentes no soro de pacientes contaminados pelo vírus da dengue (sorotipo 1, 2 e 3). A eficiência do biossensor foi avaliada por técnicas eletroquímicas. Os resultados demonstraram padrão distinto de resposta para os sorotipos analisados quando comparado ao controle, sendo mais expressiva para o sorotipo-3. Os resultados obtidos sugerem que o biossensor desenvolvido foi efetivo sendo uma alternativa promissora para o diagnóstico da dengue.

INTRODUÇÃO

O vírus da dengue (DENV) representa um problema de saúde pública de alta morbidade e mortalidade, com cerca de 40% da população mundial em risco de contrair a doença (WHO, 2009). Os quatro sorotipos existentes do vírus (DENV-1, -2, -3, -4) podem causar diversos sintomas clínicos que compreende desde um estado febril ao choque hipovolêmico, sendo, portanto, de extrema relevância o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico rápidos e precisos. Biossensores apresentam a vantagem de possibilitar diagnóstico em tempo real de forma específica e com facilidade operacional. Por outro lado, é reconhecido que determinadas patologias podem ser diagnosticadas na identificação de carboidratos por biossensores (ZENG et al., 2012).

Em se tratando da doença dengue, sabe-se que em estágios precoces da doença existe um aumento na expressão de glicoproteínas presentes no soro do paciente infectado (XU et al., 2006). Desta forma, neste trabalho, biossensores foram obtidos através da imobilização da lectina *Concanavalina A* (ConA), uma lectina que se liga especificamente a resíduos de glicose e manose, sobre camadas lipídicas automontadas. Lipídios têm sido utilizados em biossensores principalmente por diminuir a interação com espécies eletroatrativas e favorecer a amplificação do sinal de resposta (RAMSDEN, 1998). Além disso, proporcionam um ambiente natural compatível com a imobilização de proteínas impedindo a sua desnaturação.

OBJETIVOS

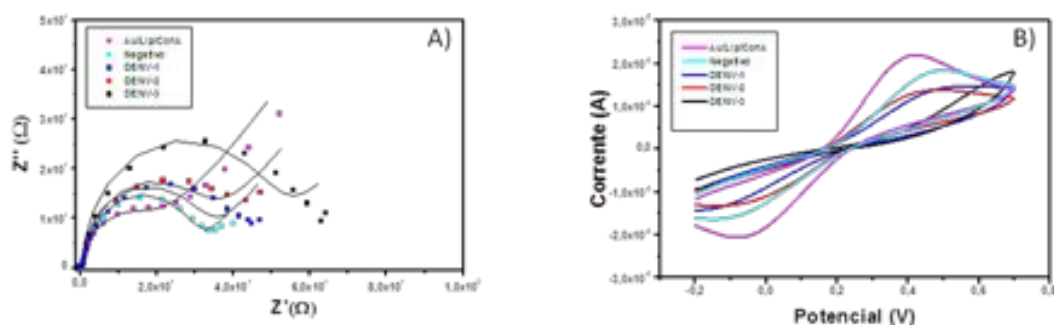
O presente trabalho propõe o desenvolvimento de um biossensor constituído por camadas lipídicas automontadas e ConA para detectar glicoproteínas presentes no soro de pacientes contaminados por dengue através de técnicas eletroquímicas de caracterização voltametria cíclica (VC), espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE).

MATERIAIS E MÉTODOS

A lectina *Concanavalina A* e o lipídio 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC) foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA). Os soros dos pacientes contaminados por dengue foram cedidos pelo Laboratório de Virologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) e previamente caracterizados utilizando RT-PCR. Tampão fosfato salino (PBS) (pH 7,4) contendo 0,1 M de CaCl_2 e 0,1 M de MnCl_2 foi utilizado para preparar as soluções de Con A. A água ultrapura foi obtida do sistema de purificação (Millipore-Synergy). Todos os produtos químicos e solventes foram de grau analítico e utilizados sem purificação adicional. Vesículas lipídicas (lipossomas) foram preparadas por hidratação do filme lipídico. Inicialmente, uma solução 1mM de DPPC em clorofórmio/metanol (9:1, v/v) foi submetida a rotaevaporação (25 min a $40\pm 1^\circ\text{C}$). Posteriormente, o filme lipídico foi então hidratado com 1mL de PBS a 0.2 M (pH 7.4). A suspensão foi mantida em agitação magnética por 40 min. Para obtenção da camada sensora, foi adicionado 2 μL da suspensão de lipossomas na superfície do eletrodo de ouro e em seguida lavado com água ultrapura para remoção dos lipídios não adsorvidos. Posteriormente, 1mL de ConA (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi incubado na camada automontada dos lipídios. Finalmente o eletrodo modificado Au-lipídio-Con A foi exposto por 20 min ao soro na concentração 1:10 diluída em 10 mM de PBS pH 7.4. Para as medidas eletroquímicas foi utilizado o potenciostato/galvanostato PGSTAT 128N (Autolab, Eco Chemie, The Netherlands) com interface com o computador e sonda redox de ferro-ferricianato de potássio (10mM, pH 7.4). Os resultados obtidos representam a média de três medidas independentes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Fig. 1 representa a caracterização eletroquímica por EIE (Fig. 1A) e VC (Fig. 1B) do sistema sensor e frente à exposição aos soros diluídos (1:10) dos pacientes contaminados e do controle. A presença do soro controle proporcionou um discreto aumento do diâmetro do semicírculo e na variação da resistência a transferência de carga (ΔR_{CT}) de 17,5 k Ω para 24,4 k Ω o que demonstra o reconhecimento de resíduos glicídicos. De fato, existe uma vasta quantidade de glicoproteínas presentes no soro as quais podem ser reconhecidas pela ConA (SPARBIER, 2007). Contudo, a resposta ao soro DENVIII foi considerada maior ($\Delta R_{CT} = 48,4$ k Ω) quando comparada aos soros DENV-1 ($\Delta R_{CT} = 32,3$ k Ω) e DENVII ($\Delta R_{CT} = 30,6$ k Ω). Desta forma, o DENV III induziu maior expressão de glicoproteínas plasmáticas reconhecidas pela ConA. A infecção pelo vírus da dengue provoca uma resposta inflamatória que vai depender de uma variedade de fatores tais como o sorotipo do vírus e as condições imunológicas do hospedeiro (GLUBER, 1998; KURANE, 2007).



De acordo com a Fig. 1B, podemos observar que houve diminuição da corrente dos picos do par redox sendo mais expressivo durante a exposição ao soro contaminado com DENVIII. Isto ocorre devido ao fato de que o complexo glicoproteína-lectina provoca uma camada bloqueadora da transferência de elétrons dificultando a difusão da sonda redox.

CONCLUSÕES

Foi possível a obtenção de biossensor com alta sensibilidade e especificidade constituído por camada lipídica automontada e lectina para o reconhecimento de glicoproteínas presentes no soro de pacientes contaminados com DENV-1, DENV-2 e DEV-3. A presente estratégia de montagem do biossensor é uma promissora alternativa para o diagnóstico da dengue.

AGRADECIMENTOS

FACEPE, CNPq e Rede de Nanobiotecnologia-CAPES.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**. v.11, p. 480-496. 1998.

KURANE, I. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.30, p.329-340.2007.

RAMSDEN, J.J. Biomimetic protein immobilization using lipid bilayers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 13, p.593–598. 1998.

SPARBIER, K.; ASPERGER, A.; RESEMANN, A.; KESSLER, I.; KOCH, S.; HENZEL, T.; STEIN, G.; VORWER, G.L.; SUCKAU, D.; KOSTRZEWA, M. Analysis of Glycoproteins in Human Serum by Means of Glycospecific Magnetic Bead Separation and LC-MALDI-TOF/TOF Analysis with Automated Glycopeptide Detection. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 18, p.252-258. 2007.

WHO. 2009. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Disponível em : <<http://www.who.int/topics/dengue/en/>>. Acesso em : 26/09/2013.

XU, H.; DI, B.; PAN, Y.X.; QIU, L.W.; WANG, Y.D.; HAO, W.; HE, L.J.; YUEN, K.Y.; CHE, X.Y. Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural protein NS1: implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 2872-2878. 2006.

ZENG, X.; ANDRADE, C.A.S.; OLIVEIRA, M.D.L., SUN, X.-L. Carbohydrate-protein interactions and their biosensing applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402 p. 3161- 3176. 2012.



CARACTERIZAÇÃO DO DERIVADO TIAZACRIDÍNICO (LPSF/AA-6) ATRAVÉS DA TÉCNICA DE LC-MS

¹V.S. SALES, ²M.G.R. PITTA, ¹M.R. GALDINO-PITTA, ¹I.R. PITTA

¹Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, Núcleo de pesquisa em inovação terapêutica Suely Galdino. Universidade Federal de Pernambuco. vanessa-soares@hotmail.com

²Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino, Universidade Federal de Pernambuco.

Acridinas são moléculas heterocíclicas que possuem potente atividade antitumoral, consistindo em um promissor agente terapêutico para o tratamento do câncer, o presente estudo objetivou realizar análises de caracterização estrutural do composto 3-acridin-9-ilmetil-5-(4-bromo-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona LPSF/AA-6. As análises foram realizadas com o auxílio da técnica de espectrometria de massas (EM), que somada à capacidade de separação da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), forneceu espectros detalhados da molécula, permitindo a realização de estudos de comprovação.

INTRODUÇÃO

O câncer se caracteriza pelo crescimento desordenado de células que podem invadir e se espalhar para diversas regiões do corpo. Atualmente doenças neoplásicas são as principais causadoras de morte no mundo, só no período de 2012/2013 o INCA estima a ocorrência de 518.510 casos novos de câncer no Brasil¹. Visando proporcionar alternativas mais eficazes para o tratamento desta enfermidade novos fármacos têm sido sintetizados, a partir de moléculas com promissora atividade antineoplásica, dentre elas a acridina, que consiste numa molécula heterocíclica que pode se intercalar entre os pares de base do DNA e também, bloquear a ação das enzimas topoisomerase I e II². Diversos derivados acridínicos podem ser sintetizados variando-se apenas a posição e o tipo de substituinte presente na molécula, como a 3-acridin-9-ilmetil-5-(4-bromo-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona estudada, esta apresenta um átomo de bromo no anel benzilidênico, que influenciará em sua atividade biológica. A avaliação da atividade antitumoral *in vitro* do LPSF/AA-6 mostrou que este composto é bastante ativo para a linhagem de células HCT-8 (cólon) com 96,6 % de inibição celular. Já na linhagem SF-295 (sistema nervoso central) apresentou 62,2 % de inibição e na linhagem MDA-MB435 (melanoma) apresentou 85,3% de inibição³. Tendo em vista a grande importância dessa molécula no âmbito da saúde, a elucidação estrutural do derivado tiazacridínico LPSF/AA-6 é fundamental para confirmação estrutural, determinação do grau de pureza e compreensão do perfil de fragmentação da mesma. Estes podem ser determinados através de ferramentas analíticas como Espectrometria de Massas que detecta íons pela razão massa/carga e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência que permite a separação dos componentes presentes na amostra.

OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo realizar a elucidação estrutural do derivado acridínico 3-acridin-9-ilmetil-5-(4-bromo-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona LPSF/AA-6 através da técnica de Espectrômetro de Massas (EM) acoplada à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

MATERIAIS E MÉTODOS

Para elucidação estrutural do composto (LPSF/AA-6) utilizou-se a técnica analítica de espectrometria de massas – aparelho ESI-MS (n) HCTultra, acoplado ao CLAE – aparelho HPLC LC-20AT – ambos os equipamentos pertencentes a Central Analítica do Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT-SG) da UFPE. Para início da análise foi pesada uma alíquota de 0,21 mg da LPSF/ AA-6 e preparada uma solução à concentração de 8.68×10^{-8} M, os solventes usados foram água e acetonitrila grau LC-MS Chrosmasolv (Sigma Aldrich) para obtenção de uma solução da amostra. No CLAE , a fase móvel A foi a acetonitrila e a fase movel B foi constituída de metanol com à 0,1% de ác.fórmico. O volume de injeção foi de 20 μ l, o fluxo de injeção da amostra foi de 0.2 ml/min e a temperatura do forno foi de 35° C, sendo o tempo final de corrida de 11 min distribuídos da seguinte forma : Aos 10 min 60% de B, aos 10 min 80% de B e por fim aos 11 min 60% de B. Os parâmetros do EM também foram acertados como a voltagem do capilar que foi de 4500 V, além de ser utilizado o hélio como gás de arraste, temperatura do gás de secagem foi de 250°C, o scan durante a análise foi de 100 a 600 *m/z*, o fluxo para introdução da amostra em ESI para obtenção do +MS2 foi de 180 μ L/h e foi utilizado nitrogênio como gás nebulizador à pressão de 10 psi

Tabela 1: Tempo de retenção e porcentagem das fases móveis utilizadas para obtenção de cromatograma do LPSF/ AA-6

Tempo de retenção LPSF/AA-6	60% B	80% B	60% B
3.5 min	0.01 min	5 min	6 min
3.4 min	0.01 min	10 min	11 min

Fase Móvel A: Acetonitrila LC-MS

Fase Móvel B: Metanol LC-MS com 0,1% de Ácido Fórmico

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os picos característicos do espectro de +MS2 (Figura 1) foram: 474.9, que corresponde à captação de um próton H⁺ do composto LPSF/AA-6 (PM: 474.0). O pico 235.1 contém a porção da acridina e parte da tiazolidina que foi fragmentada e o pico 193.1 corresponde a

fração acridínica da molécula. O cromatograma (Figura 2) obtido durante a análise consta em apenas um pico de 475, comprovando a pureza da amostra.

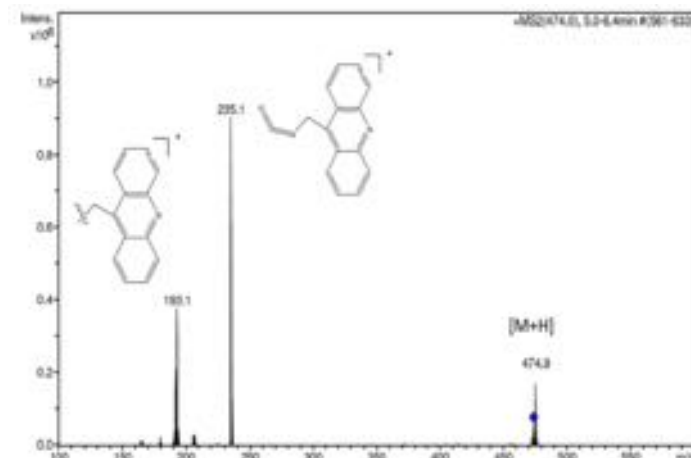


Figura 1: Espectro de Massas +MS2 do LPSF AA-6 (M = 474).

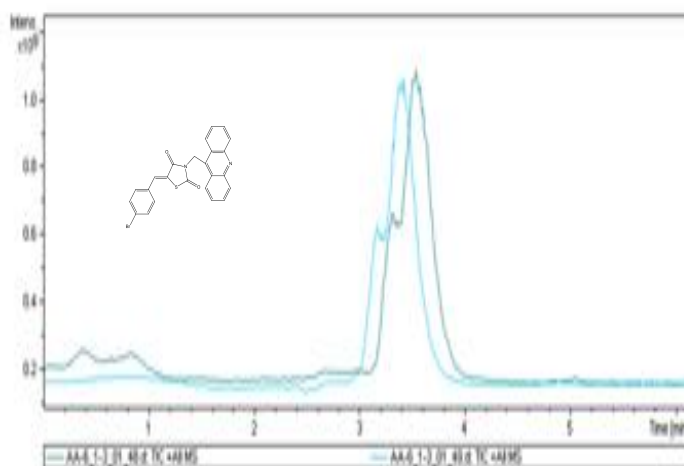


Figura 2: Cromatograma do produto LPSF AA - 6 com tempo de saída de 3.5 min

CONCLUSÕES

Com o auxílio das técnicas de espectrometria de massas e Cromatografia líquida de alta eficiência, conseguiu-se obter a comprovação estrutural da LPSF/AA-6 pela interpretação dos espectros, como também a comprovação da pureza do produto através do cromatograma.

AGRADECIMENTOS

MEC-SESu, UFPE, CNPq, INCT-if, LPSF e NUPIT SG.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

¹ Estimativa 2012. Incidência de câncer no Brasil. Disponível em:

<<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?ID=2>> acessado em 04 out 2013;

² SURDON, V.; MAZOYER, S.; PIQUE, V.; GALY, J-P. Synthesis of new bis and tetracridines.

Molecules, v.6, p.673-82, 2001 in GALDINO-PITTA, M. **Novos agentes anticancer tiazacridinicos substituidos: síntese, estrutura e efeitos biológicos**. 2010. Dissertação (mestrado) – Universidade federal de Pernambuco, Cidade universitária, PE, 2010.

³ GALDINO-PITTA,

M.R.; SOUZA, E.S.; BARROS, F.W.A.; FILHO, M.O.M.; PESSOA, C.O.; HERNANDES, M.Z., DE LIMA, M.C.A.; GALDINO, S.L.; PITTA, I.R. Synthesis and in vitro anticancer activity of novel thiazacridine Derivatives. **medicinal chemistry research**. New York, set 2012.



CARACTERIZAÇÃO DO DERIVADO TIAZACRIDÍNICO LPSF/AA-4 ATRAVÉS DA TÉCNICA LC-MS

**¹R.R. CARVALHO, ¹R.D. SILVA, ²M.G.R. PITTA, ¹M. R. GALDINO-PITTA, ¹I.
R. PITTA**

¹Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco. renata.rodrigues0@yahoo.com.br

²Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino, Universidade Federal de Pernambuco

RESUMO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, Câncer consiste num conjunto de mais de 100 doenças cujo crescimento desordenado de células invadem tecidos e órgãos. Uma alternativa para evitar a propagação desta doença seria o crescente interesse no desenvolvimento de fármacos a partir de derivados de Acridina ($C_{13}H_9N$), considerada mais potente e menos tóxica em relação a outros fármacos já no mercado. A molécula LPSF/AA-4 foi caracterizada pela técnica de Cromatografia líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a Espectroscopia de Massas (MS), importante ferramenta analítica que oferece informações sobre a estrutura da molécula de maneira segura e rápida através de identificação pelos picos presentes nos espectros.

INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença que consiste na proliferação descontrolada de células transformadas em tecidos e órgãos, referindo-se cientificamente ao termo neoplasia¹. Segundo estudos estatísticos da Organização Mundial de Saúde (OMS) o câncer é a terceira causa de óbitos no mundo com 12% e no Brasil, as estimativas para o ano de 2013 apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer². As acridinas ($C_{13}H_9N$) e seus derivados apresentam relevância no campo do desenvolvimento de medicamentos para estabelecer novos agentes quimioterápicos³. São consideradas menos tóxicas e mais potentes em detrimento a outros medicamentos já no mercado. Tais derivados interagem com o DNA interferindo na sua síntese, replicação através da intercalação, inibição da enzima topoisomerase I e II⁴, impedindo que células cancerosas se espalhem⁵. Estudos realizados pelo grupo evidenciam que a molécula LPSF/AA-4 apresenta promissora atividade para a linhagem celular HCT-8 (carcinoma de cólon), ressaltando a necessidade de conhecimento acerca dessa molécula⁶.

OBJETIVOS

O estudo teve como objetivo caracterizar e elucidar estruturalmente a molécula derivada da acridina LPSF/AA-4 através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE) acoplada à Espectrometria de Massas (EM).

MATERIAIS E MÉTODOS

A caracterização estrutural do LPSF/AA-4 foi realizada na Central Analítica do Núcleo de Pesquisa e Inovação Terapêutica Suely Galdino(NUPIT SG) da UFPE utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência(CLAE) (HPLC LC-20AT/ESI-MS(n) HCT ultra Shimadzu) acoplada ao Espectrômetro de Massas(HCT Ultra Bruker Daltonics).

Pesou-se uma alíquota 0,34mg na balança analítica(shimadzu AUW 220D),preparou-se uma solução estoque com acetonitrila LC-MS chromasolv(Sigma Aldrich) na concentração de $6,097 \times 10^{-4}$ M. Uma diluição a partir da solução estoque foi realizada adicionando-se 1000 μ L da mistura(água LC-MS chromasolv e acetonitrila LC-MS chromasolv) com concentração final de $1,195 \times 10^{-5}$ M.A fase móvel empregada foi: A-Acetonitrila LC-MS e B- Metanol/0,1% Ácido Fórmico.O volume injetado foi 20 μ L,o fluxo na coluna analítica foi 0,2 ml/min e a temperatura do forno foi 35°C.A coluna cromatográfica utilizada foi a analítica de fase reversa(C₁₈).Utilizou-se o gradiente: 0.01min-60%B; 5min-80%B;6min-60%B,com tempo total de corrida 6 min. As análises por espectrometria de Massas foram realizadas no modo positivo os espectros de íons totais foram (M+H)⁺ e +MS2,tipo ionização por eletrospray(ESI-EM),os parâmetros adotados foram:voltagem do capilar 4500V e o hélio como gás de arraste;temperatura do gás de secagem foi 250°C;scan utilizado durante a análise foi 100 a 600 *m/z*;nitrogênio como gás nebulizador à pressão 10psi.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sistema utilizado para saída do composto LPSF/AA-4 foi adequado para sua identificação, apresentando tempo de retenção 3.6 min(figura 1) na coluna.O composto LPSF/AA-4 apresentou-se satisfatoriamente puro, mesmo com pequena impureza no tempo 3.3 min.Os picos característicos do espectro de MS *m/z* (%) foram: (M+H)⁺ 411.0 (100),correspondente ao íon molecular do composto LPSF/AA-4 (PM: 410.0). Com relação aos resultados obtidos dos isótopos do íon molecular temos MS *m/z* (%): 412.0(27.3); 413.0(10.6) e 414.0(1.5). O pico 234.9(97.6) contém a porção da acridina e parte da tiazolidina que foi fragmentada e o pico 193.0(44.5) corresponde a fração acridínica da molécula(figura 2).

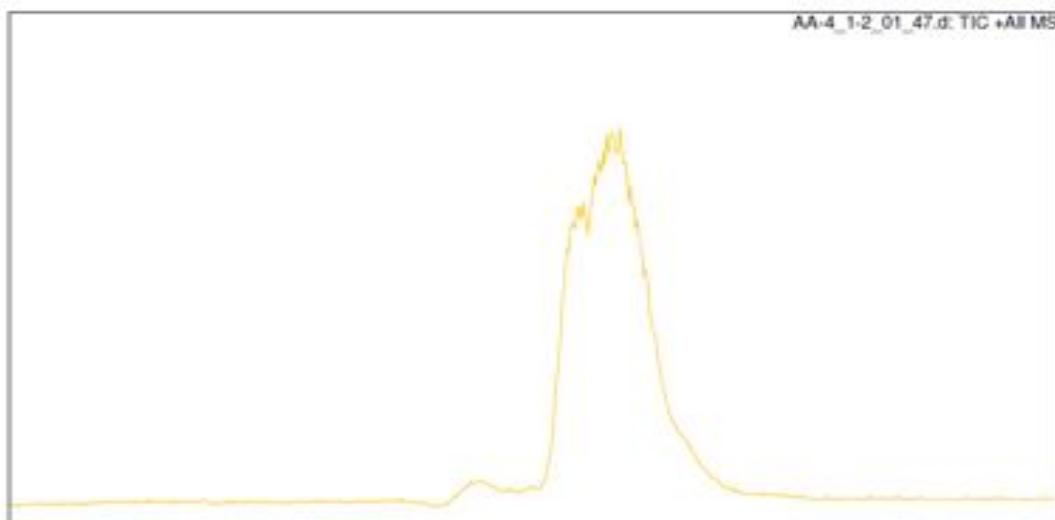


Figura 1: Cromatograma do composto LPSF-AA4(M = 410).

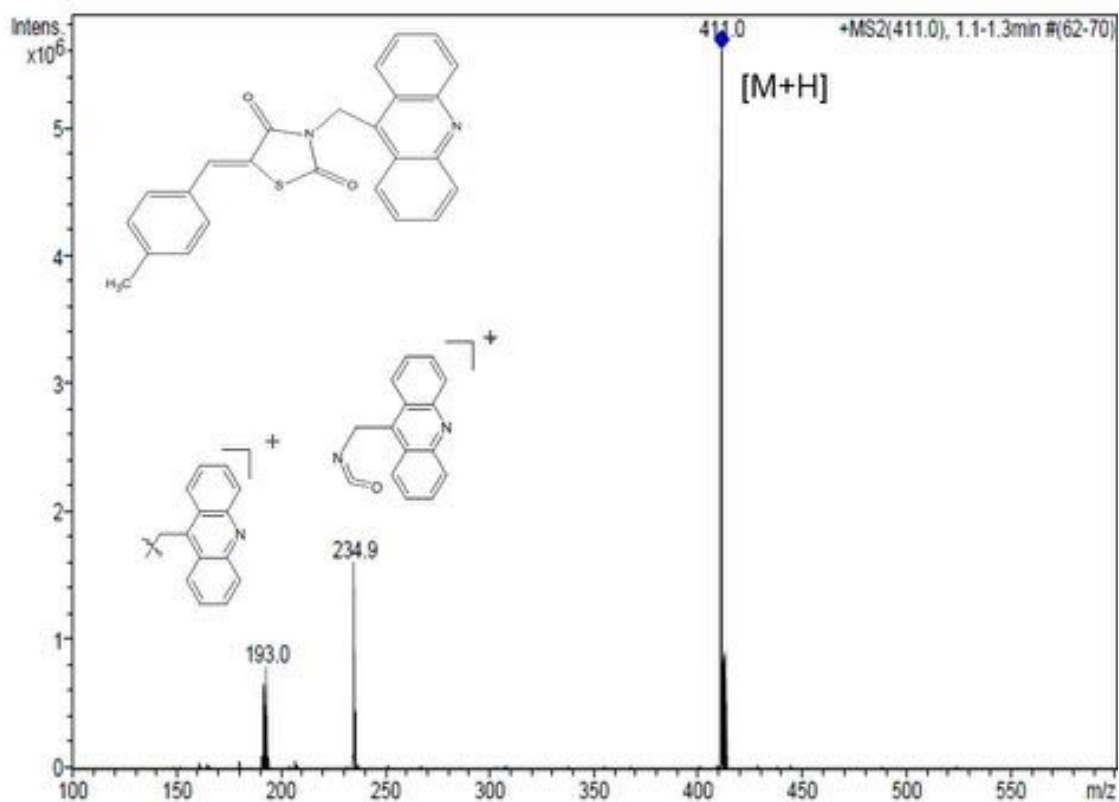


Figura 2: Espectro de Massas por IES (modo positivo) +MS2 do composto LPSF-AA4(M = 410).

CONCLUSÕES

A 3-acridina-9-metil-5-(4-metil-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/AA-4) foi identificada pela técnica LC-MS de forma rápida e eficaz através da interpretação dos fragmentos obtidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

¹ALMEIDA, V. L. ET AL. **Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução.** Química Nova Vol.28, No.1,118-129,2005.

²Estimativa 2012 Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?ID=2> Acessado em:04/10/2013.

³GHOSH R,BHOWMIK S,BAGCHI A,DAS D,GHOSH S (2010)**Chemotherapeutic potential of 9-phenyl acridine:biophysical studies on its binding to DNA.**Eur Biophys J39:1243–1249. doi:10.1007/s00249-010-0577-z

⁴SURDON,V.:MAZOYER,S.:PIQUE,V.;GALY,J-P.**Synthesis of New Bis and Tetracridines.** Molecules,v.6, p.673-82, 2001.

⁵GALDINO-PITTA,M. R. ET AL.**Synthesis and in vitro anticancer activity of novel thiazacridine derivatives.**Medicinal Chemistry Research,New York,22:2421–2429, September,2012. Doi:10.1007/s00044-012-0236-2

⁶PCT/BR2012/000421.**Thiazacridines used in anti-cancer therapy.**LINS GALDINO, Suely;DA ROCHA PITTA,Ivan;DO CARMO ALVES DE LIMA,Maíra;GALDINO DA ROCHA PITTA,Marina;ARAUJO BARROS,Francisco Washington;DO Ó PESSOA,Claudia;DE MORAES FILHO,Manoel Odorico;DA ROCHA PITTA,Maira Galdino. International Filing Date:24.10.2012



COMPARAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA DESINFESTAÇÃO DE FOLHAS DE BOLDO DO CHILE (*VERNONIA CONDENSATA* BAKER) NO ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

¹SANTOS, A. C. A.; ¹NASCIMENTO, T. L.; ²LIMA, B. J. R. C.; ³MAGALHÃES O.M.C.; ⁴ARAUJO, B.C.; ⁴VIANA, D.C.F.; ⁴NUNES, T.R.S.; ¹SOUZA-MOTTA, C. M.

¹Micoteca URM, Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco
aeda.araujo@ufpe.br

²Laboratório de Fungos Fitopatogênicos, Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco

³Laboratório de Micologia Médica, Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco.

⁴Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco.

RESUMO

As plantas medicinais no Brasil são utilizadas de várias maneiras e com diferentes propósitos. Boldo do chile, *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae) é utilizada como analgésico e antiinflamatório. Micro-organismos endofíticos são aqueles que vivem no interior de plantas sem causar danos. Nessa interação, os fungos podem desempenhar funções relevantes para saúde vegetal. Para o isolamento dos micro-organismos endofíticos é necessário que retiremos os micro-organismos epifíticos. Estes podem provocar danos diretos e indiretos ao vegetal. Comparamos diferentes técnicas de desinfestação, adequando o processo de desinfestação, poderemos aumentar 6,25% à taxa de colonização fúngica, que aumentará conseqüentemente o conhecimento da diversidade e riqueza de espécies isoladas da planta em estudo.

INTRODUÇÃO

As plantas medicinais no Brasil podem ser utilizadas de diversas maneiras e com diferentes propósitos, sob a forma de chás e/ou outros preparos caseiros (Rates, 2001). O Boldo do chile, *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae), é um arbusto amplamente distribuído no Brasil e é utilizado na medicina popular atribuindo-se atividades analgésica e antiinflamatória a essa planta. (Grandi *et al.*, 1988; Rizzo *et al.*, 1999; Frutuoso *et al.*, 1994).

Microrganismos endofíticos são aqueles que vivem no interior de plantas, sem causar danos aparentes aos seus hospedeiros (Azevedo *et al.*, 2002). Dessa relação simbiótica os fungos podem desempenhar funções relevantes para saúde vegetal, protegendo as plantas contra pragas e patógenos, aumentando o crescimento, enraizamento, resistência a estresses e produzir compostos químicos como enzimas,

alcalóides, hormônios e antibióticos (Peixoto Neto *et al.*, 2002). Vários estudos demonstram o potencial de utilização dos fungos endofíticos em processos biotecnológicos e ambientais e tem contribuído para o conhecimento da diversidade de fungos endofíticos (Siqueira *et al.*, 2011; Bezerra *et al.*, 2012; Bezerra *et al.*, 2013).

Para o isolamento dos micro-organismos endofíticos é necessário que retiremos os micro-organismos epifíticos. Os micro-organismos contaminantes provocam danos pela colonização de tecidos, podendo eliminar no meio, metabólitos tóxicos as plantas (Montarroyos, 2000). A desinfestação é necessária para a preservação da integridade da planta em estudo. Esse trabalho destinou-se a comparação de diferentes técnicas e verificação da taxa de colonização de fungos endofíticos em folhas de Boldo do Chile.

OBJETIVOS

- Aplicar dois tipos de protocolos para desinfestação com concentrações de hipoclorito de sódio diferentes;
- Verificar a eficácia dos métodos de desinfestação;
- Verificar a taxa de crescimento fúngico de cada grupo;
- Comparar os resultados obtidos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletadas 20 (vinte) folhas totalmente expandidas de dois indivíduos de Boldo do Chile (*Vernonia condensata* Baker) no jardim didático do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sendo 10 (dez) folhas de cada indivíduo. Todas as folhas não apresentavam lesões e foram conduzidas ao Laboratório da Coleção de Culturas – Micoteca URM da UFPE, para isolamento dos fungos endofíticos. As folhas foram lavadas em água corrente para a remoção da poeira e outros resíduos e depois submetidas às técnicas de desinfestação, para eliminação dos micro-organismos epifíticos.

A primeira técnica, Grupo A, utilizada para 10 amostras, de acordo com Araújo *et al.* (2002), que consistiu na imersão, em câmara asséptica, das folhas em etanol 70% por 1 minuto, em hipoclorito de sódio (2-2,5 % de cloro ativo) por 4 minutos, em etanol 70% por 30 segundos e lavados três vezes em água destilada e esterilizada. A segunda técnica de desinfestação, Grupo B, consistiu na imersão, em câmara asséptica, das folhas em água destilada e esterilizada por 30 segundos, etanol 70% por 1 minuto e 30 segundos, em hipoclorito de sódio (1,5 % de cloro ativo) por 2 minutos e 30 segundos, em etanol 70% por 30 segundos e lavados duas vezes em água destilada e esterilizada.

Após a desinfestação, de cada folha, foram retirados oito fragmentos de 2,5 x 2,5 mm (Gamboa *et al.*, 2002). Esses fragmentos foram distribuídos sobre a superfície do meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) acrescido de cloranfenicol (100 µg/mL), em placas de Petri e incubados a temperatura ambiente ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) por 7 dias. Para verificação da eficácia da desinfestação, de cada Grupo foi retirado 100 microlitros da água da última lavagem transferidos para o meio de cultura e incubados nas mesmas condições.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o período de 7 dias foram observados o crescimento de colônias nos fragmentos dos grupos A e B. Nas amostras do Grupo A foi observado o crescimento em média de 6 fragmentos por folha, já nas amostras do Grupo B apresentaram 7 fragmentos com crescimento fúngico em média por folha.

A taxa de colonização ($TC\%$) foi calculada pela razão entre o número de fragmentos com crescimento fúngico (Nf) e o número total de fragmentos (Nt) ($TC = Nf/Nt \times 100$) (Araújo *et al.*, 2002) expressa em percentagem.

A taxa de colonização do Grupo A foi de 81,25% e a do Grupo B foi de 87,50% mostrando uma diferença de 6,25 % entre os Grupos A e B .

As placas controle não apresentaram nenhum tipo de crescimento de colônia fúngica, concluindo que a desinfestação epifítica foi realizada com sucesso.

Também foi observado durante o experimento que as folhas submetidas a uma concentração maior de hipoclorito de sódio, Grupo A, apresentaram maior oxidação , demonstrando cor verde escura a enegrecida, o que pôde levar a uma diminuição na quantidade de espécimes de fungos endofíticos provenientes deste Grupo. As folhas submetidas a concentração de 1.5 % de hipoclorito de sódio apresentaram uma menor oxidação, apenas alguns pontos escuros ou enegrecidos foram observado, o que pôde aumentar substancialmente a quantidade de espécimes de fungos endofíticos, pois as espécies mais sensíveis ao hipoclorito de sódio neste caso não foram tão expostas a estresse oxidativo quanto as do primeiro Grupo.

CONCLUSÕES

Cada tipo de folha vegetal suporta uma concentração diferente de hipoclorito de sódio. Adequando o processo de desinfestação com a capacidade oxidativa da planta, a taxa de colonização de fungos endofíticos pode ser aumentada e conseqüentemente será maior também a riqueza e a diversidade de espécies isoladas.

AGRADECIMENTOS

PROEXT/UFPE, PROPESQ/UFPE, FACEPE e Incubadora de Tecnologias Sociais-INCUBATECS-UFPE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, W. L.; Lima, A. O. S.; Azevedo, J. L.; Marcon, J.; Sobral, J. K.; Lacava, P. T. **Manual: Isolamento de microorganismos endofíticos**. ESALQ, Piracicaba, 2002, 86 p.

AZEVEDO, J. L., SERAFINE, L. A., BARROS, N. M. **Microorganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais**. In: Serafine, L. A., Barros N. M., Azevedo, J. L. (eds.) *Biotecnologia: avanços na agricultura e na indústria*. Caxias do Sul, Editora da Universidade de Caxias do Sul, pp. 233-265, 2002.

BEZERRA, J. D. P., LOPES, D. H. G., SANTOS, M. G. S., SVEDESE, V. M., PAIVA, L. M., ALMEIDA-CORTEZ, J. S., SOUZA-MOTTA, C. M. 2012. **Riqueza de microorganismos endofíticos em espécies da família Cactaceae**. *Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas* 9(2): 19-23.

BEZERRA, J. D. P., SANTOS, M. G. S., BARBOSA, R. N., SVEDESE, V. M., LIMA, D. M. M., FERNANDES, M. J. S., GOMES, B. S., PAIVA, L. M., ALMEIDA-CORTEZ, J. S., SOUZA-MOTTA, C. M. 2013. **Fungal endophytes from cactus *Cereus jamacaru* in Brazilian tropical dry forest: a first study**. *Symbiosis*. doi: 10.1007/s13199-013-0243-1.

DE LIMA, Gustavo Barbosa; GOMES, Bruno Severo. **Efeito inibitório in vitro de extrato vegetal de lippia alba (mill.) Ne brown (erva cidreira) frente à dermatófitos preservados na Micoteca URM**.

GRANDI T. S. M., DA-TRINDADE J. A., PINTO M. J. F., FERREIRA L. L. & CATELLA A. C., **Plantas medicinais de Minas Gerais**, Brasil, Acta Botanica Brasileira, 3 cap.,1988. 185p.

MONTARROYOS, A. V. V.. **Contaminação in vitro**. ABCTP Notícias, Brasília, n. 36, p. 5-10, 2000.

PEIXOTO-NETO, A. S. P.; Azevedo, J. L.; Caetano, L. C. **Microorganismos endofíticos em plantas: Status atual e perspectivas**. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 3(4): 69-72, 2004.

PEIXOTO-NETO, P. A. S.; Azevedo, J. L.; Araújo, W. L. **Microorganismos endofíticos**. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* 29, 2002. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio29/micro.asp>> Acesso em: 18/02/2013.

RATES, S. M. K. **Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino da farmacognosia**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.11, n.2, p.57-69, 2001. Disponível em: <<http://www.farmacognosia.ufpr.br>>. Acesso em: 20/02/2013.

RIZZO J. A., CAMPOS I. F. P., JAIME M. C., MUNHOZ G. & MORGADO W..
Utilização de plantas medicinais nas cidades de Goiás e Pirenópolis, Estado de Goiás, Rev Cienc Farm, 20 (1999) 431p.

SIQUEIRA, M. V., BRAUN, U., SOUZA-MOTTA, C. M. 2008. *Corynespora subcylindrica* sp. nov., a new hyphomycete species from Brazil and a discussion on the taxonomy of corynespora-like genera. *Sydowia* 60(1): 113–122.

SIQUEIRA, V. M., CONTI, R., ARAÚJO, J. M., SOUZA-MOTTA, C. M. 2011. Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. and their antimicrobial activity. *Symbiosis* 53: 89–95.



CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS DO COMPOSTO CANDIDATO A FÁRMACO ANTICÂNCER LPSF/AA-3

¹R.D. SILVA, ¹R.R. CARVALHO, ²M.G.R. PITTA, ¹I.R. PITTA, ¹M.R. GALDINO-PITTA

¹Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino, Universidade Federal de Pernambuco. *renatha_danielle@hotmail.com

²Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino, Universidade Federal de Pernambuco

RESUMO

O câncer é uma das doenças mais prevalentes em todo o mundo. Diante disso, sente-se a necessidade de produzir novos medicamentos mais eficazes, seguros e menos tóxicos. Compostos que destacam-se neste aspecto são as acridinas, obtidas a partir de derivações de anéis heterocíclicos. O derivado acridínico LPSF/AA-3 (3-Acridin-9-il-metil-5-(4-metóxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona), estudado neste trabalho, teve atividade anticâncer satisfatória, comprovada nas linhagens SF-295, HCT-8 e MDA-MB435, quando comparada a doxorubicina como padrão positivo. A elucidação estrutural do composto LPSF/AA-3 foi obtida através da ferramenta analítica da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas.

INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado ao conjunto de doenças que caracterizam-se por apresentar um crescimento desordenado de células, que levam à formação de tumores, e podem atingir vários tecidos e órgãos do organismo¹. Por ser uma das principais causas de morte em todo o mundo e ainda não se ter conhecimento de sua cura definitiva, o descobrimento e desenvolvimento de novos fármacos, mais eficazes, seguros e menos tóxicos, tem sido alvo do interesse de vários pesquisadores. Dentre os candidatos a fármacos anticâncer, destacam-se as acridinas, que são obtidas a partir de derivações de anéis heterocíclicos, apresentam um elevado espectro de atividades farmacológicas, e seus principais mecanismos de ação são a intercalação ao DNA, interrompendo o ciclo celular e consequente apoptose, e o bloqueio das enzimas topoisomerases I e II, fundamentais para a replicação e transcrição do DNA^{2,3,4}. O derivado tiazacridínico LPSF/AA-3 foi sintetizado no Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos. Estudos realizados por GALDINO-PITTA, M.R *et al* testaram-o nas seguintes linhagens: SF-295 (SNC), HCT-8 (carcinoma de cólon) e MDA-MB435(melanoma), apresentando respectivamente moderada (59,5%), alta (86,7%) e moderada (84,2%) atividade anticâncer, comparada a doxorubicina (91,1% ; 95,2% e 93,6%), que foi

utilizada como padrão positivo^{3,4}. A elucidação estrutural desse composto é de fundamental importância para comprovação da estrutura e pureza da molécula sintetizada. Uma importante técnica analítica utilizada no presente trabalho foi a Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS). Essa importante ferramenta analítica tem contribuído para a caracterização estrutural de diversos compostos orgânicos, devido a sua facilidade de análise, sensibilidade, alta resolução e rapidez.

OBJETIVOS

Este trabalho teve o objetivo de realizar a caracterização estrutural do composto candidato a fármaco anticâncer LPSF/AA-3, através da técnica de Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas.

MATERIAIS E MÉTODOS

A Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas foi realizada na Central Analítica do Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT SG) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), utilizando o aparelho modelo HPLC LC-20AT /ESI-MS(n) HCTultra. Inicialmente, foi pesada uma alíquota de 0,10 mg do composto LPSF/AA-3 em balança analítica SHIMADZU AUW220D para a preparação de uma solução-estoque. Esta solução-estoque foi feita solubilizando-se 0,10 mg do LPSF/AA-3 em 400 uL de Acetonitrila LC-MS Chromasolv. Em seguida, diluiu-se 20 uL desta solução em uma mistura de 1000uL contendo água LC-MS Chromasolv e Acetonitrila LC-MS Chromasolv, tendo como concentração final $11,5 \times 10^{-6}$ mol/L. A amostra preparada foi injetada no HPLC-MS utilizando acetonitrila (fase móvel A) e metanol a 0,1% de ácido fórmico (fase móvel B). O volume de injeção da amostra foi de 20 uL/min, o fluxo de injeção foi de 0,2 ml/min, a temperatura do forno foi de 35 °C e o tempo total da corrida foi de 6 minutos, distribuídos da seguinte forma: 0,01-5 min (60% B), 5-6 min (80% B), 6 min (60% B). Como parâmetros do Espectrômetro de Massas previamente ajustados, voltagem do capilar foi de 4500 V e utilizou-se o hélio como gás de arraste. A temperatura do gás de secagem foi de 250 °C. O Scan utilizado durante a análise foi de 100 a 600 m/z e foi utilizado nitrogênio como gás nebulizador à pressão de 10 psi. Foram obtidos o cromatograma e o espectro de MS^+ e $MS2^+$ do composto analisado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O composto LPSF/AA-3 (3-Acridin-9-il-metil-5-(4-metóxi-benzilideno)-tiazolidina-2 ,4-diona) é um sólido amarelo amorfo, de fórmula molecular $C_{25}H_{18}N_2O_3S$ e peso molecular de 426 g/mol. Após a realização da análise, foram obtidos o cromatograma (Figura 1-A), apresentando um pico correspondente ao composto em estudo (pico 1), com tempo de retenção de 3,3 minutos e o seu espectro de MS em

modo positivo (Figura 1-B), $(M+H)^+$ 427.0 (100). A Espectrometria de Massas foi realizada pelo método de ionização por elétron-spray, MS e MS2 em modo positivo, pois a molécula apresenta sítios susceptíveis à captação de prótons H^+ . Os picos característicos do MS m/z (%) foram: $(M+H)^+$ 427.0 (100), que corresponde ao íon molecular do composto (PM: 426.0). Os resultados obtidos com relação aos isótopos do íon molecular apresentaram as seguintes intensidades relativas: 427.0 (100), 428.0 (28.4), 429.0 (7.3) e 430.0 (1.3). O +MS2 (Figura 2) apresentou os picos 427.0 (98) e 428.0 (100) correspondentes à captação de 1 e 2 prótons H^+ , respectivamente. O pico 411.9 (16.1) refere-se a fragmentação da metila do grupo metóxi presente na posição 4 do anel benzílico. O pico 234.9 (77.2) contém a porção da acridina e parte da tiazolidina que foi fragmentada ($C_{15}H_{11}N_2O$) e o pico 193.0 (44.6) corresponde a fração acridínica ($C_{14}H_{11}N$) da molécula. A molécula não foi bem ionizada no modo negativo, pois todos os seus hidrogênios estão estabilizados, inclusive pela ressonância dos anéis aromáticos.

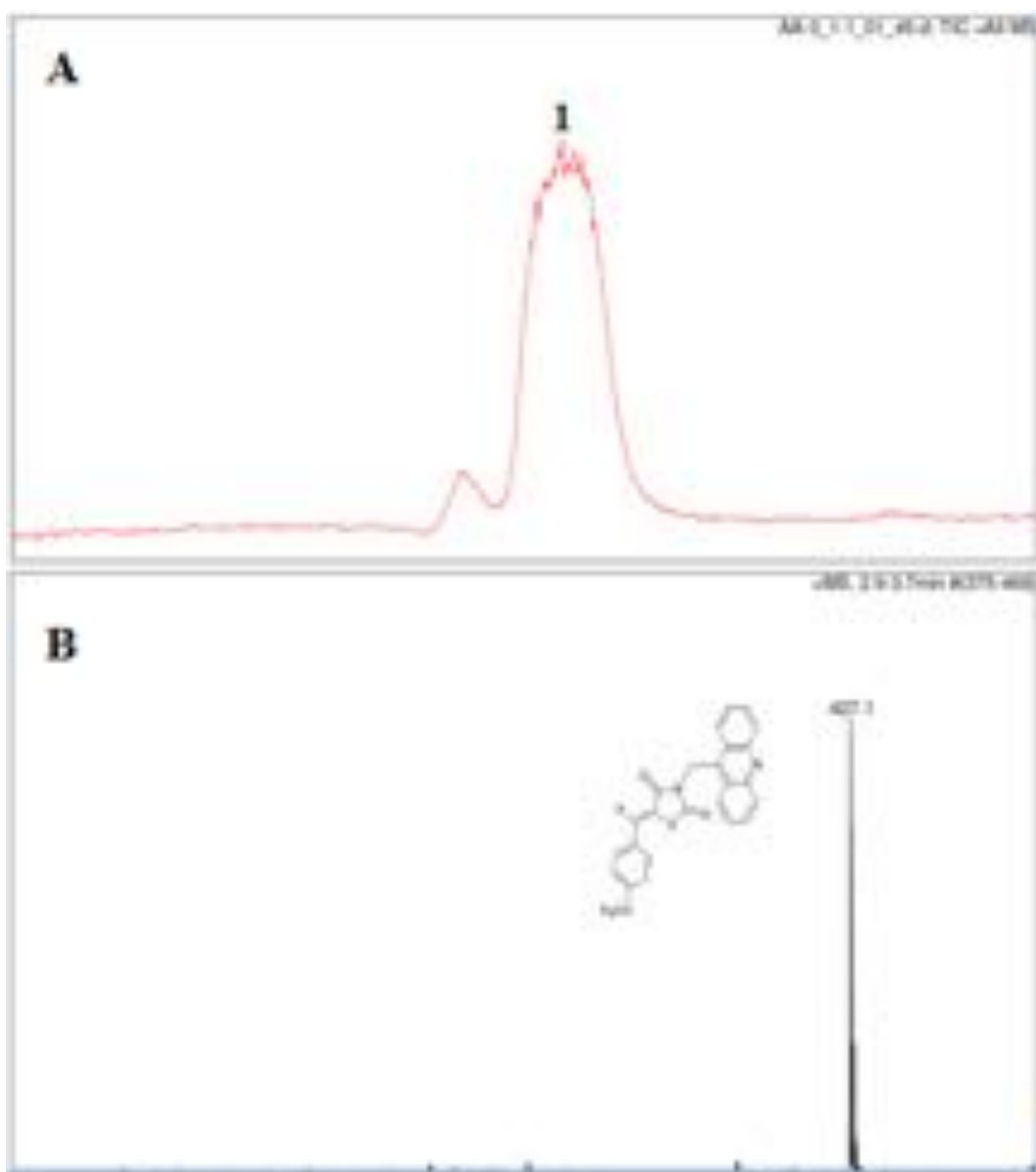


Figura 1: A- Cromatograma do LPSF/AA-3, B- Espectro de MS^+ do LPSF/AA-3 (PM=426).

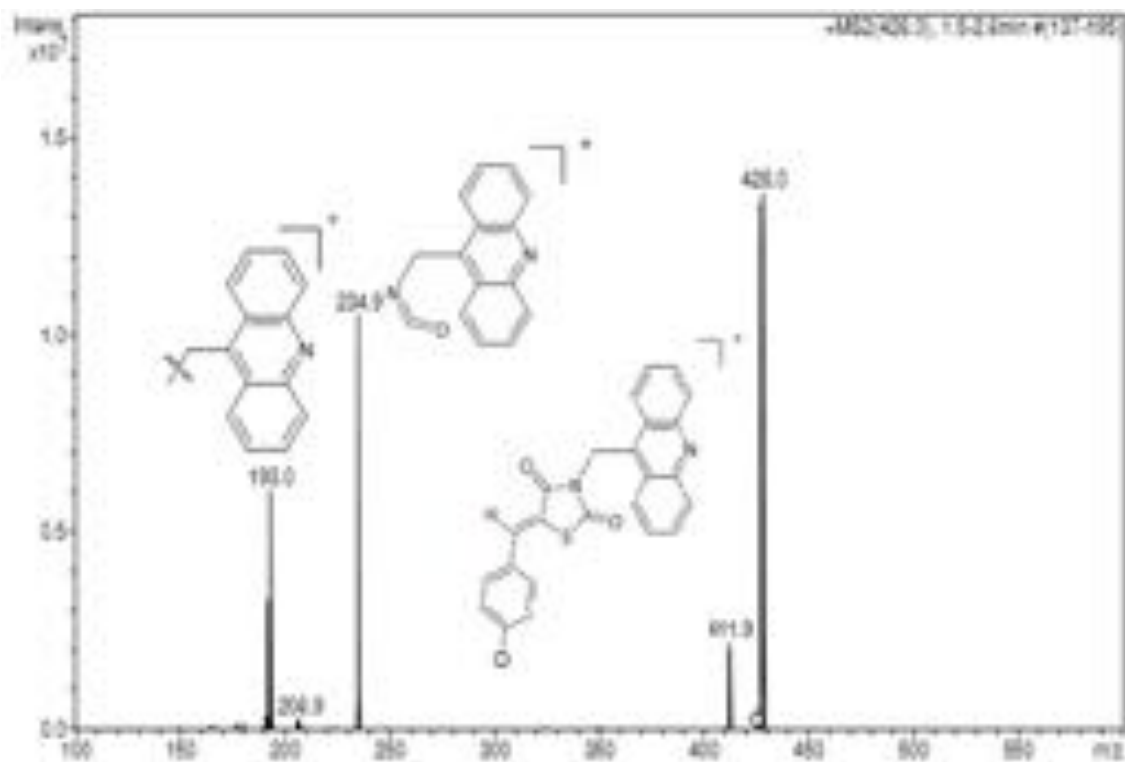


Figura 2: Espectro de MS²⁺ do LPSF/AA-3.

CONCLUSÕES

O composto LPSF/AA-3 teve sua estrutura comprovada através da ferramenta analítica da Cromatografia Líquida acoplada à Espectroscopia de Massas (LC-MS), que possibilitou uma análise rápida e eficiente. A interpretação do cromatograma e dos espectros de massa foram imprescindíveis para a elucidação estrutural do mesmo, sendo uma técnica amplamente utilizada no estudo de diversas substâncias orgânicas, tornando-se um poderoso aliado das pesquisas científicas.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT-if), ao Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF) e ao Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT SG).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

¹ Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>> Acesso em 06/10/2013.

² SURDON, V.; MAZOYER, S.; PIQUE, V.; GALY, J.-P. Synthesis of New Bis and Tetracridines. **Molecules**, v.6, p.673-82, 2001.

³ M.R.GALDINO-PITTA. **Novos Agentes Anticâncer Tiazacridínicos Substituídos: Síntese, Estrutura e Efeitos Biológicos**. Recife, 2010.

⁴ PCT/BR2012/000421. **Thiazacridines used in anti-cancer therapy**. LINS GALDINO, Suely; DA ROCHA PITTA, Ivan; DO CARMO ALVES DE LIMA, Maria; GALDINO DA ROCHA PITTA, Marina; ARAUJO BARROS, Francisco Washington; DO Ó PESSOA, Claudia; DE MORAES FILHO, Manoel Odorico; DA ROCHA PITTA, Maira Galdino. International Filing Date: 24.10.2012.



DESENVOLVIMENTO DE FILMES NANOESTRUTURADOS DE NANOTUBOS DE CARBONO E POLI-L-LISINA PARA DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DA INTERAÇÃO LECTINA CRAMOLL-CARBOIDRATO

¹P.M.S. SILVA, ¹L.C.B.B. COELHO, ²V.P.A. LANDIM, ²B.V.M. SILVA, ²R.F. DUTRA, ¹M.T.S. CORREIA

¹Laboratório de Glicoproteínas, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco. priscilamssilva@gmail.com

²Laboratório de Pesquisa Diagnóstica, Laboratório de Engenharia Biomédica, Universidade Federal de Pernambuco

RESUMO

Alterações no perfil de glicosilação celular são associadas a patologias e podem ser estudadas com lectinas. Neste trabalho, um filme condutor de nanotubos de carbono e Poli-L-Lisina foi empregado para imobilização da lectina CramoLL e detecção eletroquímica da interação com carboidratos. A técnica de voltametria cíclica foi utilizada para caracterização das etapas de construção do biossensor. Os valores de corrente foram inversamente proporcionais às concentrações de glicose, manose e metil- α -D-manopiranosídeo. Estes dados demonstram a eficiência desse filme para detecção eletroquímica da interação lectina-carboidrato, podendo ser aplicado no diagnóstico de doenças associadas a alterações na glicosilação.

Palavras-chave: Nanotubos de carbono; Poli-L-Lisina; CramoLL; biossensor.

INTRODUÇÃO

Glicosilação é uma das mais importantes modificações pós-traducionais em eucariotos. Suas alterações indicam desequilíbrios como doenças, acompanhadas por mudanças na glicosilação em células e glicoproteínas (Taniuchi et al., 2011). A propriedade das lectinas de interagir com carboidratos habilita-as como moléculas de reconhecimento, sendo valiosos instrumentos para a investigação estrutural de glicanos em patologias. Lectinas de leguminosas apresentam especificidade para diferentes carboidratos (Sharon & Lis, 1990). CramoLL, lectina isolada de sementes da leguminosa *Cratylia mollis*, reconhece manose/glicose, e seus sítios interagem com metil- α -D-manopiranosídeo (Souza, 2003). Há registros de aplicações em estudos de glicosilação (Lima et al., 2010; Brustein et al., 2012).

Os métodos convencionais de sondagem de glicanos exigem extensa configuração técnica. Superando estes desafios, os biossensores são tecnologias alternativas mais simplificadas. Estes dispositivos têm como princípio a conversão de uma resposta biológica em um sinal eletrônico mensurável através de um sistema de detecção específico, gerando resposta rápida e precisa (Cavalcanti et al., 2012).



Nanotubos de carbono proporcionam aos biossensores maior sensibilidade, pois aceleram a transferência de elétrons, aumentam a área de superfície e possibilitam a funcionalização química, podendo interagir com biomoléculas e polímeros (Gomes-Filho et al., 2012). Grupos reativos de filmes derivados de poliaminoácidos têm sido explorados em biossensores para imobilização de biomoléculas. Poli-L-Lisina é um polipeptídeo hidrossolúvel rico em grupos amino, biocompatível, biodegradável e estrutura flexível e catiônica que possibilita a conjugação com biomoléculas e nanomateriais (Jalit et al., 2008; Wang et al., 2010).

OBJETIVOS

Neste trabalho, um biossensor eletroquímico baseado no uso de filmes de nanotubos de carbono funcionalizados com grupos carboxílicos (NTCs-COOH) e Poli-L-Lisina (PLL) é proposto para imobilização da lectina CramoLL e detecção da interação com monossacarídeos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais e equipamentos

A PLL e glicina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA), NTCs-COOH da DropSens (Oviedo, ESP) e $K_3Fe(CN)_6$, $K_4Fe(CN)_6$ e KCl da Vetec, (São Paulo, BRA). A preparação lectínica CramoLL 1, 4 foi obtida por um protocolo estabelecido por Correia e Coelho, 1995. As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando sistema tri-eletródico composto por um eletrodo de carbono vítreo (ECV) como eletrodo de trabalho, um eletrodo auxiliar de platina e um eletrodo de referência de Ag/AgCl conectados a potenciostato modelo Ivium (Ivium Technologies, NDL). As medidas de voltametria cíclica (VC) foram obtidas na faixa de potencial de $-0,4$ V a $0,7$ V, a velocidade de varredura de 50 mV/s, em solução de 5 mmol/L de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ preparada em 100 mmol/L de KCl.

Construção da plataforma sensora nanoestruturada

Inicialmente, a superfície do ECV foi polida com alumina (Al_2O_3) $0,5$ μ m durante 3 min e em seguida lavada com água destilada. Após o polimento, a superfície limpa do ECV foi modificada com uma alíquota de 20 μ L de uma solução de NTCs-COOH dispersa em PLL. Esta solução foi obtida através da suspensão de 1 mg de NTCs-COOH em 1 mL de uma solução de 1 mg/mL de PLL ($50:50$ v/v etanol/água). A mistura foi submetida à sonicação durante 30 min até obtenção de uma solução homogênea. Após a formação do filme de NTCs-COOH em PLL, 10 μ L de solução de CramoLL (200 μ g/mL) foi imobilizada sobre a superfície modificada durante 1 h à temperatura ambiente. Para bloquear grupos reativos livres, o eletrodo foi



subsequentemente incubado com uma solução de glicina 50 mmol/L por 1 h. Posteriormente, o ECV foi incubado com diferentes soluções dos carboidratos glicose, manose e metil- α -D-manopiranosídeo nas concentrações de 50; 100; 150; 200 e 250 μ g/mL.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ECV após a modificação com o filme de NTCs-COOH em PLL apresentou um aumento de 87 % da área calculado de acordo com os dados do software Ivium (Figura 1). Após a imobilização de CramoLL observa-se uma discreta redução das correntes anódica e catódica, devido à formação de uma camada isolante pela biomolécula. Após o bloqueio com glicina, os eletrodos modificados foram expostos às soluções dos monossacarídeos em diferentes concentrações (Figura 2). Para glicose, o sistema saturou na concentração de 150 μ g/mL, onde houve um aumento na corrente gerada, indicando menor interação com o açúcar. Os dados de corrente anódica para manose demonstraram uma saturação na menor concentração testada (50 μ g/mL), devido à alta afinidade de CramoLL com o monossacarídeo (Correia & Coelho, 1995). Para Metil- α -D-manopiranosídeo, a redução dos picos de oxidação e redução foi coerente com o aumento da concentração até a concentração de 150 μ g/mL. Esses dados demonstram que a CramoLL manteve sua atividade após ser imobilizada na superfície modificada quando submetidas à interação com diferentes monossacarídeos. Assim, a plataforma sensora padronizada apresentou resultados reprodutíveis, estáveis e sensíveis para detecção da interação lectina-carboidrato.

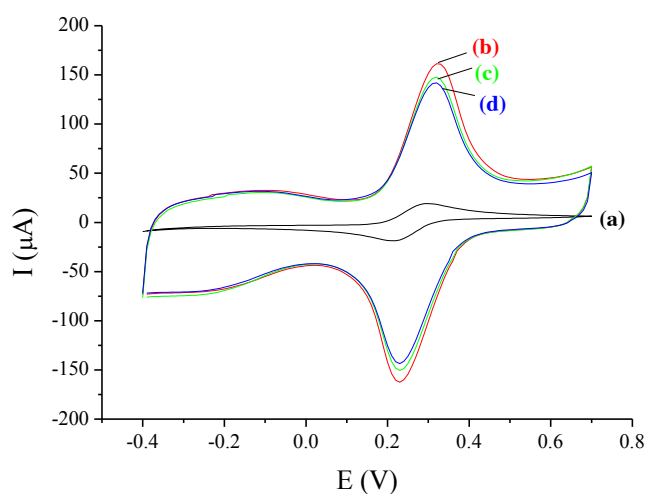


Figura 1. VCs das etapas de construção da plataforma sensora: (a) ECV limpo, (b) ECV/ NTC-COOH-PLL, (c) ECV/ NTC-COOH-PLL/CramoLL e (d) ECV/ NTC-COOH-PLL/CramoLL/ Glicina. Medidas realizadas em uma solução de 5 mmol/L de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ preparado em 100 mmol/L de KCl.

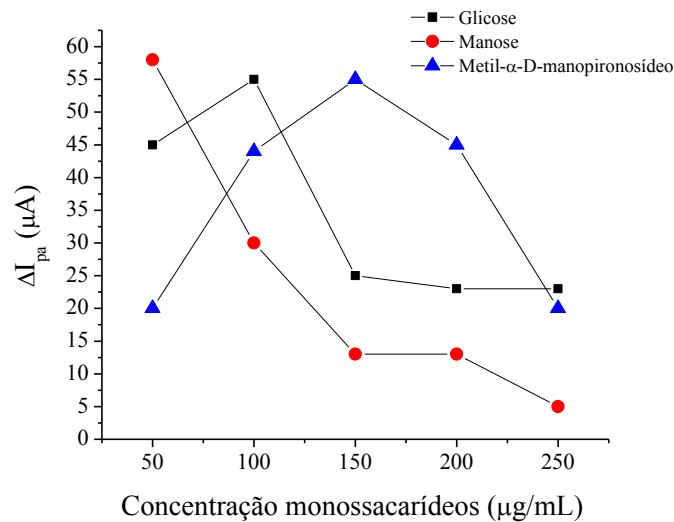


Figura 2. Variação da corrente de pico anódico do ECV em relação às diferentes concentrações dos monossacarídeos glicose, manose e metil- α -D-manopiranosídeo. Medidas realizadas em uma solução de 5 mmol/L de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ preparado em 100 mmol/L de KCl.

CONCLUSÕES

A utilização de PLL com NTCs pode ser uma técnica útil para imobilização de lectinas e emprego na fabricação de biossensores eletroquímicos para futuras aplicações diagnósticas. Pretende-se empregar outras técnicas como impedância eletroquímica e análise por infravermelho para investigar a funcionalidade da superfície e otimizá-la. O sistema apresentou boa reprodutibilidade e poderá ser testado para análise de glicoproteínas anormais em soros de pacientes com patologias como câncer.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE); Ao CNPq; A Capes; Ao Laboratório de Glicoproteínas da UFPE; Ao Laboratório de Pesquisa Diagnóstica da UFPE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Brustein, V. P. et al. **Chemiluminescent Detection of Carbohydrates in the Tumoral Breast Diseases.** Appl Biochem Biotechnol, v.166, 268–275, 2012.

Cavalcanti, I. T. et al. **A label-free immunosensor based on recordable compact disk chip for early diagnostic of the dengue virus infection.** Biochemical Engineering Journal, v. 67, p. 225– 230, 2012.



Correia, M. T. S. & Coelho, L. C. B. B. **Purification of a Glucose/Mannose Specific Lectin, Isoform 1, from Seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean).** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 55, p. 261-273, 1995.

Gomes-Filho, S. L. R., et al. **A carbon nanotube-based electrochemical immunosensor for cardiac troponin T.** Microchemical Journal, v. 109, p. 10-15, 2013.

Jalit, Y. et al. **Glassy carbon electrodes modified with multiwall carbon nanotubes dispersed in polylysine.** Electroanalysis, v. 20 (15), p. 1623-1631, 2008.

Lima, A. L. R. et al. **Histochemical Evaluation of Human Prostatic Tissues with *Cratylia mollis* Seed Lectin.** Journal of Biomedicine and Biotechnology, v. 2010, Artigo ID 179817, 6 páginas.

Sharon, N.; Lis, H. **Legume lectins- a large family of homologous proteins.** FASEB J., v. 4, p. 3198-3208, 1990.

Souza, G. A. et al. **Amino acid sequence and tertiary structure of *Cratylia mollis* seed lectins.** Glycobiology, v. 13, p. 961, 2003.

Taniuchi, K. et al. **Overexpression of GalNAc-transferase GalNAc-T3 Promotes Pancreatic Cancer Cell Growth.** Oncogene, v. 30, n. 49, p. 4843–4854, 2011.

Wang, J.; Zhang, S.; Zhang, Y. **Fabrication of chronocoulometric DNA sensor based on gold nanoparticles/poly(L-lysine) modified glassy carbon electrode.** Analytical Biochemistry, v. 396, p. 304–309, 2010.



DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR NANOESTRUTURADO BASEADO NO USO DE NANOTUBOS DE HALOISITA PARA DETECÇÃO DA TROPONINA T CARDÍACA HUMANA

¹V. P. A. LANDIM, ²P. M. S. SILVA, ¹B.V.M. SILVA, ¹T. A. FREITAS, ¹A.C.M.S. DIAS, ¹R.F. DUTRA

¹Laboratório de Engenharia Biomédica, Universidade Federal de Pernambuco.
paulolandimpl@gmail.com

²Laboratório de Glicoproteínas, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco.

RESUMO

O desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos para detecção da troponina T, um importante marcador do infarto, tem se destacado como uma ferramenta alternativa aos métodos tradicionais. Com o objetivo de aprimorar o desempenho analítico destes dispositivos, neste trabalho, nanotubos derivados da haloisita foram empregados para imobilização dos anticorpos anti-cTnT. As técnicas de voltametria cíclica e de pulso diferencial foram empregadas para caracterização do imunossensor. Um filme nanoestruturado ótimo foi obtido na concentração de 5 mg/mL de nanotubo. Entre as etapas de construção do imunossensor, uma redução dos picos redox foi observada evidenciando uma contribuição resistiva das camadas.

Palavras-chave: imunossensor eletroquímico; nanotubos de haloisita; troponina T; infarto agudo do miocárdio.

INTRODUÇÃO

Atualmente, a troponina T cardíaca humana tem sido empregada na rotina laboratorial como marcador “padrão-ouro” para o diagnóstico do infarto, devido a sua alta sensibilidade e especificidade. A quantificação deste biomarcador cardíaco entre as 72 e 92 h após o evento isquêmico fornecem informações importantes na avaliação da extensão da lesão do miocárdio (APPLE & MORROW, 2012; STEEN *et al.*, 2006). Por essa razão, a utilização de um sensor que possa monitorar em alguns minutos esse marcador é essencial para o tratamento e prognóstico do paciente infartado, de modo simples, prático e seguro.

Nesse contexto, os imunossensores surgem como ferramentas analíticas promissoras, devido ao seu baixo custo, praticidade, alta sensibilidade e confiabilidade para detecção de diferentes analitos na ordem de ng/mL. A etapa de modificação da interface sensora e imobilização do imuno-reagente é um dos passos fundamentais no projeto de um imunossensor mais sensível e reprodutível. Neste aspecto, diferentes



nanomateriais metálicos e carbonáceos têm sido explorados no aprimoramento da interface sensora (YANG *et al.*, 2010). Recentemente, nanotubos de haloisita (HNTs), têm recebido atenção de pesquisadores, sendo investigados como materiais promissores para aplicações em diversas áreas, tais como na formação de nanocompósitos com matrizes, imobilização de enzimas, liberação controlada de fármacos, remoção de metais, suporte para nanopartículas metálicas e construção de sensores e biossensores. Esses nanomateriais apresentam propriedades promissoras na imobilização de biomoléculas, devido a sua excelente biocompatibilidade e alta superfície reativa, além de serem considerados economicamente viáveis por sua ocorrência natural no meio ambiente (PRICE, GABER & LVOV, 2001).

OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de uma plataforma sensora nanoestruturada empregando nanotubos de haloisita para detecção de níveis clínicos da cTnT.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais e equipamentos

A cTnT humana e os anticorpos monoclonais anti-cTnT foram adquiridos da Calbiochem. Ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$), ferrocianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]$), *N*-hidroxi succinimida (NHS), *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e a glicina foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os HNTs modificados com aminopropiltrietoxisilano (0,5-5% wt) e octadecilamina (15-35% wt) também foram adquiridos da Sigma-Aldrich. As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando sistema tri-eletródico composto por um eletrodo de carbono vítreo (ECV) como eletrodo de trabalho, um eletrodo auxiliar de platina e um eletrodo de referência de Ag/AgCl conectados ao potenciostato modelo Ivium (Ivium Technologies).

Construção do ECV nanoestruturado

Inicialmente, a superfície do ECV foi polida com alumina (Al_2O_3) 0,5 μm durante 3 min e em seguida lavada com água destilada. Após o procedimento de limpeza, o ECV foi modificado com um filme de HNTs (5 mg/mL) preparado em clorofórmio. 3 μL da solução de HNTs foram depositados sobre o ECV e deixados por 10 min em uma estufa ajustada a uma temperatura de 40°C. Os grupos carboxílicos terminais dos anticorpos



anti-cTnT foram ativados com uma solução de EDC (2 mM) e NHS (5 mM) preparada em tampão PBS (10 mM; pH 7,4) durante 90 min para imobilização na superfície sensora do ECV modificada com HNTs. A mistura foi incubada à temperatura ambiente em eppendorfs® estéreis. Uma alíquota de 3 μ L da solução de anticorpos anti-cTnT ativados foi pipetada sobre a superfície do ECV/HNT e mantida durante 60 min em câmara úmida, à temperatura ambiente. Os sítios livres não-específicos foram em seguida bloqueados utilizando uma solução de glicina (50 mM) preparada em água, durante 30 min.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A estabilidade do filme de HNTs em clorofórmio (5 mg/mL) foi avaliada submetendo o ECV modificado a 20 ciclos voltamétricos em uma solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (5 mM) preparada em KCl (100 mM). Os valores dos picos anódicos e catódicos dos voltamogramas cíclicos (VCs) apresentaram um desvio padrão relativo de 3,2% e 2,9%, respectivamente. Após o estudo da estabilidade do filme de HNTs na interface sensora, foi realizado um estudo de concentração do filme de nanotubos. Diferentes soluções de HNTs nas concentrações de 1 a 10 mg/mL foram adsorvidas sobre o ECV limpo (**Figura 1**). Os valores em corrente dos picos anódico e catódico exibiram uma resposta máxima na concentração de 5 mg/mL. Esta foi adotada como concentração ótima para os estudos subsequentes.

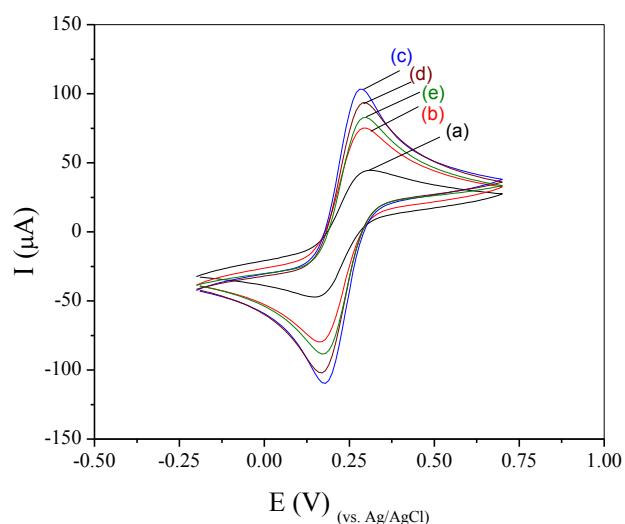


Figura 1. VCs do ECV modificado com diferentes concentrações de HNTs: (a) 1 mg/mL, (b) 2,5 mg/mL; (c) 5 mg/mL, (d) 7,5 mg/mL e (e) 10 mg/mL. Medidas realizadas em uma solução de 5 mM de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ preparada em 100 mM de KCl.

A caracterização eletroquímica da modificação gradual da superfície do eletrodo foi realizada por meio de voltametria de pulso diferencial. Após modificação da



superfície do ECV com o filme de HNT, foi observada uma redução de 7,43% no pico da corrente. Esse perfil mostra a contribuição resistiva do filme de HNT. A redução na corrente também foi observada após imobilização do anti-cTnT devido à natureza isolante do anticorpo. O mesmo efeito na corrente foi notado após o bloqueio de ligações não-específicas com incubação do eletrodo com glicina (50mM). A carga negativa da glicina atua impedindo a transferência de elétrons entre as espécies aniônicas do eletrólito e a superfície do eletrodo, como demonstrado pela redução dos picos redox (**Figura 2**).

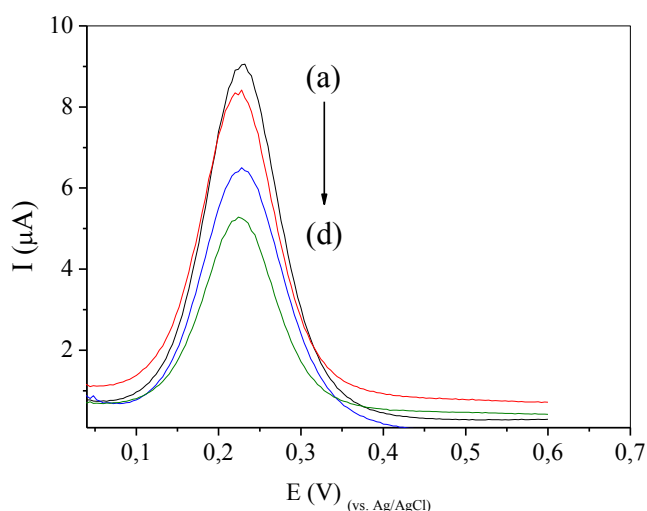


Figura 2. Voltamograma de pulso diferencial das etapas de construção da plataforma sensora: (a) ECV limpo, (b) ECV/HNT; (c) ECV/HNT/Anti-cTnT e (d) ECV/HNT/Anti-cTnT/Glicina. Medidas realizadas em uma solução de 5 mM de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ preparada em 100 mM de KCl

CONCLUSÕES

O filme nanoestruturado de HNT mostrou-se bastante estável e reprodutível eletroquimicamente, podendo ser empregado para imobilização orientada dos anticorpos anti-cTnT utilizando seus grupos amino funcionais. Entretanto, mais ensaios devem ser realizados para otimização de outros parâmetros analíticos e determinação de diferentes concentrações de cTnT em amostras de soro de pacientes saudáveis e infartados.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, FACEPE e CAPES pelo suporte para o desenvolvimento do trabalho.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APPLE, F.S.; MORROW, D.A. Delta cardiac troponin values in practice: are we ready to move absolutely forward to clinical routine? **Clinical Chemistry**, v. 58, p. 8-10, 2012.

PRICE, R.R., GABER, B.P. & LVOV, Y.M. (2001) In-vitro release characteristics of tetracycline hcl, khellin and nicotinamide adenine dinucleotide from halloysite; a cylindrical mineral. *Journal of Microencapsulation*, 18, 713.

STEEN, H.; GIANNITSIS, E.; FUTTERER, S.; MERTEN, C.; JUENGER, C.; KATUS, H. A. Cardiac troponin T at 96 hours after acute myocardial infarction correlates with infarct size and cardiac function. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 48, p. 2192-2194, 2006.

YANG, W.; RATINAC, K.R.; RINGER, S.P.; THORDARSON, P.; GOODING, J.J.; BRAET, F. Carbon Nanomaterials in Biosensors: Should You Use Nanotubes or Graphene? **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, p. 2114–2138, 2010.



DESENVOLVIMENTO DE NANOCARREADORES DE VITAMINAS DO COMPLEXO B PARA USO NA TERAPÊUTICA TÓPICA DE ÚLCERAS VENOSAS DE MEMBROS INFERIORES

¹*E.M.F. FALCÃO, ^{2,3}M.G.R. PITTA, ⁴A. G. SILVA JUNIOR, ¹R.R. DA SILVA, ³M.D.L. OLIVEIRA, ^{2,3}C.A.S. ANDRADE.

¹ Doutorando em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE.

*E-mail: ericoarrudafalcao@hotmail.com.

²Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, UFPE.

³ Departamento de Bioquímica, UFPE.

⁴Aluno de Iniciação Científica, UFPE.

RESUMO

A úlcera venosa (UV) é uma patologia de extrema relevância acometendo cerca de 1% a 3% da população mundial adulta. A UV surge em virtude da presença de insuficiência venosa crônica sendo responsável por aproximadamente 75% do total das úlceras de membros inferiores. Atualmente, não há no mercado opção terapêutica tópica para úlceras de membros inferiores que seja eficaz plenamente. Desta forma, há constante mudança de conduta terapêutica e conseqüente desestímulo a continuidade do tratamento. A presente proposta visa o desenvolvimento de nanocarreadores lipossomais imobilizados em hidrogéis contendo vitaminas do complexo B, sendo, portanto, uma iniciativa inovadora para o tratamento tópico de úlceras de membros inferiores.

INTRODUÇÃO

As vitaminas folato, cobalamina e piridoxina possuem propriedades antioxidantes e em conjunto com enzimas específicas, participam do metabolismo do aminoácido essencial metionina (VENÂNCIO, BURINI e YOSHIDA, 2004). A deficiência dessas vitaminas e principalmente do folato determina estresse oxidativo e lesão tecidual, em virtude do acúmulo de homocisteína. A homocisteína é um aminoácido não essencial, formado como produto intermediário do metabolismo da metionina e que apresenta um grupamento sulfidril (-SH) responsável por suas propriedades oxidativas. Níveis elevados desta molécula resultam em maior estresse oxidativo devido a presença de radicais livres de oxigênio. O aumento no estresse oxidativo determina disfunção da microcirculação ao nível do endotélio que altera suas características, tornando-se pró-coagulante. Esta disfunção leva a vasoconstrição, adesão plaquetária e formação de microtrombos que em última análise determina hipóxia tecidual e morte celular, podendo

contribuir para o aparecimento de úlceras de membros inferiores (VENÂNCIO, BURINI e YOSHIDA, 2004; WEISS et al, 2003). Pacientes com insuficiência venosa crônica e úlcera venosa apresentam níveis mais elevados de homocisteína (SAM et al, 2003). A associação de folato (vitamina B9), cobalamina (vitamina B12) e piridoxina (vitamina B6) constituem uma alternativa tópica para cicatrização de úlcera venosa de membros inferiores por estímulo à replicação celular epitelial, aumento da microcirculação e efeito antioxidante local (FENECH, 2001; KAMBUROGLU et al, 2011).

Os sistemas nanoestruturados visam obter uma liberação controlada do fármaco e proporcionar uma atividade terapêutica prolongada, facilitando a adesão dos pacientes, diminuindo os efeitos colaterais e melhorando a eficácia do tratamento. Lipossomas são vesículas esféricas formadas por uma bicamada lipídica (TORCHILIN e WEISSIG, 2013). Poucos estudos têm sido realizados para o desenvolvimento de compósitos de lipossomas e gel, tais como para a imobilização de lipossomas em matrizes de poli(N-isopropilacrilamida) (LIU, LI e LIANG, 2012) e colágenos (WEINER, CARPENTER-GREEN e SOEHNGEN, 1985). Alginato é um polissacarídeo biocompatível e biodegradável obtido de algas, consistindo de blocos de homopolímero de manurato e guluronato (ULLRICH et al, 2013). O alginato de sódio é hidrossolúvel e rapidamente forma gel com cátions multivalentes como o Ca^{2+} . Esta propriedade é utilizada para a encapsulação de vários compostos hidrossolúveis tais como enzimas (SRIVASTAVA et al, 2005) e células (XU et al, 2008). Em adição, o alginato é utilizado em curativos de feridas em virtude de suas propriedades hemostáticas (THOMAS et al, 2000). Desta forma, nanocarreadores lipossomais imobilizados em hidrogéis contendo folato, cobalamina e piridoxina atuam na diminuição da inflamação local, bem como no estímulo da multiplicação celular e aumento do leito microvascular nutridor.

Nanocarreadores lipossomais imobilizados em hidrogel contendo folato, cobalamina e piridoxina além das características mencionadas, proporcionam atividade terapêutica prolongada, facilitando a adesão dos pacientes, diminuindo os efeitos colaterais e melhorando a eficácia do tratamento.

OBJETIVO

Desenvolvimento e caracterização de nanocarreadores lipossomais imobilizados em hidrogel de alginato. Nesta primeira etapa não houve encapsulação das vitaminas folato, cobalamina e piridoxina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os lipossomas brancos contendo fosfatidilcolina e colesterol (Sigma-Aldrich®) foram preparados de acordo com o método modificado de Amselen et al (1990). Os lipossomas brancos imobilizados em hidrogel de alginato (Sigma-Aldrich®) foram preparados de acordo com Ullrich et al (2003).

A avaliação do tamanho dos nanocarreadores foi realizada pelo método de espalhamento dinâmico de luz e as medidas de potencial zeta foram realizadas pelo

método de eletroforese utilizando um instrumento Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern, Reino Unido) (ANDRADE et al, 2009).

A análise morfológica das amostras foi realizada através de microscopia eletrônica de varredura, onde a amostra foi depositada sobre uma superfície de eletrodo de disco e colocada sobre um suporte de alumínio fixado com cola de carbono. Após este procedimento a amostra a ser analisada foi submetida a um processo de metalização com ouro utilizando uma evaporadora de revestimento fino (BalTec-SCD-050) e examinado com o uso de um microscópio eletrônico de varredura (JSM-5900, JEOL, Japão) (DE OLIVEIRA et al., 2005).

Os lipossomas brancos foram submetidos a testes de estabilidade acelerada com o objetivo de determinar a durabilidade dos mesmos. O objetivo dos testes de estabilidade acelerada foi submeter os lipossomas brancos a condições de estresse que simulassem processos como esterilização, transporte e armazenamento. Os lipossomas foram submetidos a estresse mecânico de 150 oscilações por minuto a 37° C durante 48 horas (Polytest® 20 Bioblock Scientific), centrifugação a 1.300 x grama por 1 hora (KN-70 Centrifuge, Kubota, Japão) e congelamento a $-18 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 16 horas seguido de descongelamento a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 8 horas (ANDRADE et al, 2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os constituintes dos lipossomas, concentrações utilizadas, tamanho e potencial zeta dos lipossomas e dos lipossomas em gel de alginato.

Tabela 1. Caracterização da amostra de lipossomas (1) e da amostra de lipossomas com alginato (2), dissolvidos em tampão fosfato. [C]: concentração de colesterol, [F]: concentração de fosfatidilcolina e [A]: alginato.

Amostra	[C] em g	[F] em g	[A] em g	Diâmetro (nm)	Potencial Zeta (mV)
1	0,028	0,196	-	147,95	$-26,3 \pm 10,2$
2	0,028	0,196	0,3	194,26	$-52,6 \pm 4,3$

O potencial zeta é uma técnica amplamente utilizada para determinação do potencial elétrico da superfície das nanopartículas o qual é influenciado pelas mudanças iônicas na interface com o meio dispersante. Valor em módulo em ~ 30 mV é importante para se obter uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, evitando, através de forças repulsivas, a agregação de nanopartículas adjacentes (SCHAFFAZICK et al., 2003; MOHANRAJ e CHEN, 2006). Na Tabela 1 são apresentados os valores de potencial zeta dos sistemas analisados. Os lipossomas utilizados neste estudo são constituídos por fosfatidilcolina e o potencial zeta negativo obtido reflete a presença de algumas impurezas ácidas como, por exemplo, o fosfatidilglicerol (LEWANDOWSKA et al., 2010).

Em relação ao diâmetro dos lipossomas obteve-se valor médio de 147,95 nm (Fig. 1). Os valores de diâmetros obtidos neste estudo encontram-se na faixa de valores médios descritos previamente na literatura (SCHAFFAZICK et al., 2003). Analisando o hidrogel de alginato com lipossomas observa-se a presença de um pico duplo, o que reflete a resposta dos lipossomas e partículas de hidrogel de alginato (Fig. 1). O maior diâmetro médio dos lipossomas (194,26 nm) em hidrogel de alginato pode ser justificado pelo efeito solvente do hidrogel em presença de grupos alquil da fosfatidilcolina o que determina aumento de tamanho dos lipossomas (LIU, LI e LIANG, 2012).

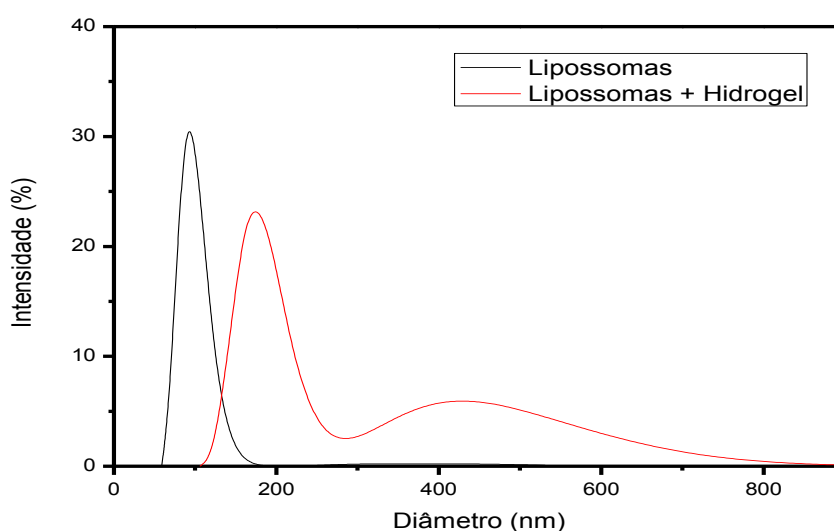


Figura 1. Caracterização do tamanho da amostra de lipossomas brancos e lipossomas brancos em hidrogel de alginato.

A maior estabilidade de lipossomas contendo fosfatidilcolina em hidrogel de alginato deve-se a presença de íons Ca^{2+} e polímeros negativamente carregados de alginato (ULLRICH et al, 2013). Além disso, o confinamento de lipossomas entre os polímeros de hidrogel, também determinada maior estabilidade e consequente liberação controlada de fármacos (LIU, LI e LIANG, 2012).

A Figura 2 apresenta a análise morfológica das amostras realizada por microscopia eletrônica de varredura. Na Figura 2a observa-se partículas esféricas bem dispersas e com perfil heterogêneo, apresentando diâmetro médio em concordância com as medidas do espalhamento dinâmico de luz. Na Figura 2b é observado a característica morfológica do hidrogel de alginato com lipossomas onde é notada a presença de partículas esféricas na matriz do hidrogel correspondente aos lipossomas (LIU, LI e LIANG, 2012).

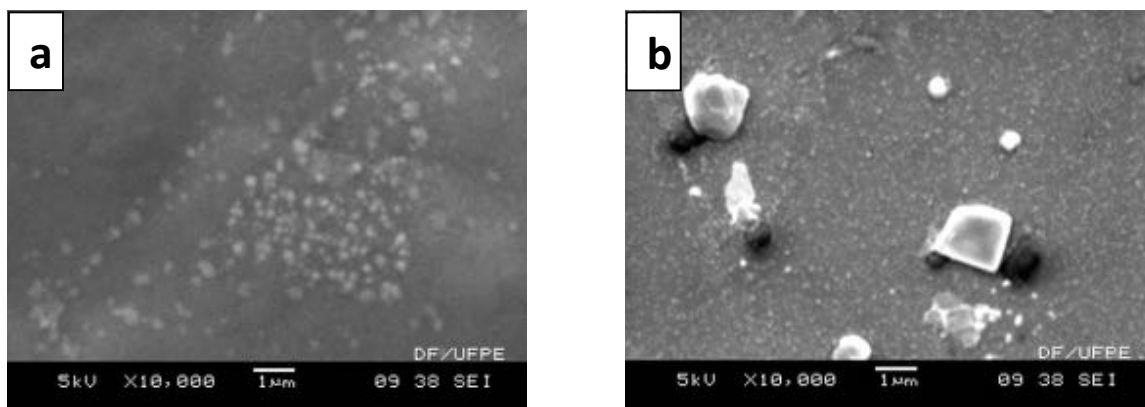


Figura 2. Microfotografia de lipossomas brancos (a) e hidrogel de alginato contendo lipossomas brancos (b).

Em relação aos testes de estabilidade, obteve-se, ao final dos mesmos, lipossomas e hidrogel de alginato com lipossomas brancos com aspecto homogêneo, comprovando a estabilidade.

CONCLUSÃO

Nesta etapa inicial foram obtidos lipossomas e hidrogel de alginato com lipossomas com sucesso. Os sistemas analisados foram estáveis e com boa miscibilidade. Os sistemas obtidos se apresentam promissores para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de vitaminas.

REFERÊNCIAS

1. AMSELEN, S.; GABIZOND, A.; BARENHOLZ, Y. Optimization and upscaling of doxorubicin-containing liposomes for clinical use. **Am. Pharm. Assoc.** v. 79, p. 1045-1052, 1990.
2. ANDRADE, C. A. S.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B., et al. Antitumor activity of Cratylia mollis lectin encapsulated into liposomes. **Int J Pharm.** v. 278, p. 435-445, 2004.
3. ANDRADE, C. A. S.; OLIVEIRA, M. D. L.; MAGALHAES, N. S. S., et al. Comparison of the interfacial properties of Eugenia uniflora and Triticum vulgare lectins. **Coll. Surf. B.** v. 68, n. 1, p. 7-12, 2009.
4. DE AGUIAR, E. T.; PINTO, L. J. ; FIGUEIREDO, M. A.; SAVINO, N. S. Diretrizes sobre Diagnóstico, Prevenção e Tratamento da Sociedade Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vascular (SBACV). Úlcera de Insuficiência Venosa Crônica. **J Vasc Br.** v. 4, p. 195-200, 2005.

5. DE OLIVEIRA, H. P.; ANDRADE, C. A. S.; DE MELO, C. P. Optical and dielectric properties of polypyrrole nanoparticles in a polyvinylalcohol matrix. **Synth. Met.** v. 155, p. 631-634, 2005.
6. FENECH, M. The role of folic acid and vitamin b12 in genomic stability of human cells. **Mutat Res.** v. 475, p. 57-67, 2001.
7. KAMBUROGLU, H.O.; UZUN, H.; BITIK, O. et al. The effects of hyperhomocysteinemia on the microcirculation of skin flaps. **Plast Reconstr Surg.** v. 128, n. 3, p.124e-130e, 2011.
8. LEWANDOWSKA, J.; KEPCZYNSKI, M.; BEDNAR, et al. Silicone-stabilized liposomes. **Colloid and Polymer Science.** v. 288, n. 1, p. 37–45, 2010.
9. LIU, Y; LI, Z; LIANG, D. Behaviors of liposomes in a thermo-responsive poly(N-isopropylacrylamide) hydrogel. **Soft Matter.** v. 8, n. 16, p. 4517-4523, 2012.
10. MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research.** v. 5, n. 1, p. 561-573, 2006.
11. SAM, R.C.; BURNS, P.J.; HOBBS, S.D., et al. The prevalence of hyperhomocysteinemia, methylene tetrahydrofolate reductase C677T mutation, and vitamin B12 and folate deficiency in patients with chronic venous insufficiency. **J Vasc Surg.** v. 38, n. 5, p.904-908, 2003.
12. SCHAFFAZICK, R. S.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, R. A. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova.** v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.
13. SRIVASTAVA, R.; BROWN, J.Q.; ZHU, M.J. et al. Stabilization of glucose oxidase in alginate microspheres with photoreactive diazo resin nanofilm coatings. **Biotechnol Bioeng.** v. 91, n. 1, p. 124-131, 2005.
14. THOMAS, S. **J Wound Care.** v. 9, n. 2, p. 56-60, 2000.
15. TORCHILIN, V.P.; WEISSIG, V. Liposomes: A practical Approach. New York: Oxford University Press, 2003. 396 p.
16. ULLRICH, M.; HANUŠ, J.; DOHNAL, J. et al. Encapsulation stability and temperature-dependent release kinetics from hydrogel-immobilised liposomes. **J Colloid Interface Sci.** v. 394, p. 380-385, 2013.
17. VENÂNCIO, L.S.; BURINI, R.C.; YOSHIDA, W.B. Hiper-homocysteinemia na doença arterial periférica. **J Vasc Bras.** v. 3, n. 1, p.31-37, 2004.
18. WEINER, A.L.; CARPENTER-GREEN, S.S.; SOEHNGEN, E.C. et al. Liposome-Collagen Gel Matrix: A Novel Sustained Drug Delivery System. **J. Pharm. Sci.** v. 74, p. 922-925, 1985.
19. WEISS, N.; HEYDRICK, S.J.; POSTEA O., et al. Influence of hyperhomocysteinemia on the cellular redox state-impact on homocysteine-induced endothelial dysfunction. **Clin Chem Lab Med.** v. 41, n. 11, p.1455-1461, 2003.
20. XU, T.; KINCAID, H.; ATALA, A. et al. High-throughput production of single-cell microparticles using an inkjet printing technology. **J Manuf Sci.** v. 130, n. 2, p. 124-128, 2008.



MODELAGEM COMPUTACIONAL NA ÁREA DE SAÚDE: UMA CONTRIBUIÇÃO BIOTECNOLÓGICA PARA O DIAGNÓSTICO DA OSTEOPOROSE

¹V. P. Silva, R. ^{1,2}Cássia-Moura, ³M. M. Valença

¹Instituto de Ciências Biológicas, DCF - Biofísica, Laboratório de Modelagem
Biológica, Universidade de Pernambuco. vps180@gmail.com

² International Centre for Theoretical Physics, na Itália

³Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco

Introdução: A osteoporose é definida como uma doença esquelética sistêmica progressiva caracterizada por baixa densidade mineral óssea (DMO), deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, ou ambos, com um consequente aumento da fragilidade óssea e suscetibilidade à fratura. A densitometria óssea é o melhor preditor de uma futura fratura óssea. De acordo com a Organização mundial de saúde, a medição da DMO com o Dxa (dual-energy X-ray absorptiometry) é o método “padrão ouro” para o diagnóstico da osteoporose. Neste método a DMO do paciente é comparada com uma população de referência, sendo considerada a idade, peso, altura, sexo e etnia. O objetivo deste estudo foi desenvolver um modelo matemático que possibilita que a DMO seja estimada através da densitometria óssea. **Material e Métodos:** A modelagem matemática foi realizada com interpolação volumétrica por *spline* local. O modelo foi testado em dados de DMO de 5761 pacientes. **Resultados e Discussão:** Neste estudo foi desenvolvido um modelo que é uma função matemática $F(x, y, z)$ que mimetiza as relações de dados $(x_i, y_i, z_i; f_i)$. Sendo assim, $F(x_i, y_i, z_i) = f_i, i = 1, 2, \dots, n$, onde x, y , e z representam, respectivamente, idade, altura e peso de um paciente. O modelo foi testado em dados de DMO, obtidos através da Dxa. **Conclusão:** O modelo possibilitou um diagnóstico mais preciso da osteoporose, tornando possível a detecção precoce do quadro de osteopenia, o qual é reversível.

Apoio: CAPES

Palavras-chave: Osteoporose, Densidade mineral óssea, Dxa.



OBTENÇÃO DE BIOSSENSOR CONSTITUÍDO POR MEMBRANAS E LECTINA NA DETECÇÃO DE GLICOPROTEÍNAS NO SORO DE PACIENTES INFECTADOS POR DENV-3

^{1,2*}D.M.N. LUNA, ²M.D.L. OLIVEIRA, ³M.L. NOGUEIRA, ^{1,2}C.A.S ANDRADE

¹Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. deboramluna@hotmail.com

²Laboratório de biodispositivos Nanoestruturados, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco. deboramluna@hotmail.com

³Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

RESUMO

A dengue é doença viral mais transmitida entre os humanos, considerada endêmica nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Atualmente a imunização e tratamento eficazes ainda se encontram em estágio de pesquisa. Desta forma, o diagnóstico precoce é considerado um importante aliado no combate à doença. Um biossensor constituído por lipídio e lectina foi obtido neste trabalho e o padrão de resposta frente à diferentes diluições do soro do paciente contaminado com DENV-3 foi avaliado por técnicas eletroquímicas. Nossos resultados demonstraram que foi possível a detecção de glicoproteínas presentes no soro e que a resposta se encontrou mais expressiva no soro do paciente contaminado com a doença quando comparado ao controle, além disso, apresentou-se linear com o aumento da concentração.

INTRODUÇÃO

O vírus da dengue (DENV) representa um problema de saúde pública mundial com cerca de 40% da população mundial em risco de contrair a doença (WHO, 2009). Os quatro sorotipos existentes do vírus (DENV1, 2, 3, 4) podem igualmente causar o espectro de sintomas clínicos que compreende desde um estado febril ao choque hipovolêmico. A intensidade da resposta do hospedeiro vai depender de uma complexidade de fatores tais como o vetor transmissor, a virulência do sorotipo e presença de anticorpos pré-existentes no hospedeiro (AN et al., 2004). Apesar destes dados, autores afirmam que em uma infecção primária, os sorotipos DENV-1 e -3 são apontados como mais severos em detrimento dos sorotipos DENV-2 e DENV-4 (FERREIRA et al., 2010). Desta forma, por não existir imunização e tratamento específico atualmente, se faz necessário o diagnóstico precoce para que medidas de prevenção e monitoramento de área de risco sejam reforçadas. Biossensores apresentam a vantagem de possibilitar diagnóstico em tempo real, de forma específica, com

facilidade operacional e alta sensibilidade. Em se tratando da doença dengue, sabe-se que em estágios precoces da doença existe um aumento na expressão de glicoproteínas presentes no soro do paciente infectado (XU et al., 2006). Além disso, os lipídios têm sido utilizados em biossensores principalmente por diminuir a interação com espécies eletroatrativas e favorecer a amplificação do sinal de resposta (RAMSDEN, 1998). Em adição, proporcionam um ambiente natural compatível com a imobilização de proteínas impedindo a sua desnaturação. Assim, neste trabalho, biossensores constituídos por *Concanavalina A* (ConA), uma lectina que reconhece especificamente resíduos de glicose e manose foi imobilizada sobre camadas lipídicas automontadas.

OBJETIVOS

O presente trabalho propõe o desenvolvimento de um biossensor constituído por camadas lipídicas automontadas e ConA para detectar o perfil de resposta de glicoproteínas presentes no soro de pacientes contaminados por dengue sorotipo 3 (DENV-3), por técnicas eletroquímicas de caracterização: voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE).

MATERIAIS E MÉTODOS

A lectina *Concanavalina A* e o lipídio 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC) foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA). Os soros dos pacientes contaminados por dengue foram cedidos pelo Laboratório de Virologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) e previamente caracterizados utilizando RT-PCR. Tampão fosfato salino (PBS) (pH 7,4) contendo 0,1 M de CaCl_2 e 0,1 M de MnCl_2 foi utilizado para preparar as soluções de Con A. A água ultrapura foi obtida do sistema de purificação (Millipore-Synergy). Todos os produtos químicos e solventes foram de grau analítico e utilizados sem purificação adicional. Vesículas lipídicas (lipossomas) foram preparadas por hidratação do filme lipídico. Inicialmente, uma solução 1mM de DPPC em clorofórmio/metanol (9:1, v/v) foi submetida a rotaevaporação (25 min a $40\pm 1^\circ\text{C}$). O filme lipídico foi então hidratado com 1mL de PBS a 0.2 M (pH 7.4). A suspensão foi mantida em agitação magnética por 40 min. Em seguida, 2 μL da suspensão de lipossomas foi adsorvido na superfície do eletrodo de ouro por 15 min e lavado com água ultrapura para remoção dos lipídios não adsorvidos. Posteriormente, 1mL de ConA (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi incubado na camada automontada dos lipídios. Finalmente o eletrodo modificado Au-lipídio-Con A foi exposto por 20 min ao soro na concentração 1:10 diluída em 10 mM de PBS pH 7.4. Para as medidas eletroquímicas foi utilizado o potenciostato PGSTAT 128N (Autolab, Eco Chemie, The Netherlands) interfaciado com o computador e sonda redox de ferro-ferricianato de potássio 10mM pH 7.4. Os resultados obtidos representam a média de três medidas independentes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Fig. 1 representa a caracterização eletroquímica por EIE (Fig. 1A) e VC (Fig. 1B) da obtenção do sistema sensor. A Fig. 1A demonstra que o eletrodo de ouro apresenta um pequeno semicírculo do diagrama de Nyquist o que indica baixa resistência à transferência de elétrons (R_{CT}). Após a modificação com lipídio e Con A ocorre um sucessivo aumento no diâmetro do semicírculo o que indica aumento da resistência à transferência de íons da sonda redox para a superfície do eletrodo devido a adsorção de biomoléculas (BARD; FAULKNER, 2001). De acordo com a Fig 1B, após cada etapa de obtenção do sistema sensor, a corrente de pico redox diminui devido à diminuição na cinética de transferência de elétrons entre o eletrodo e a solução eletrolítica de Ferro-ferricianato de potássio. A camada lipídica sobre a superfície do eletrodo de ouro diminui a corrente de pico redox de -30 e 36 mA para -20 e 35 mA respectivamente.

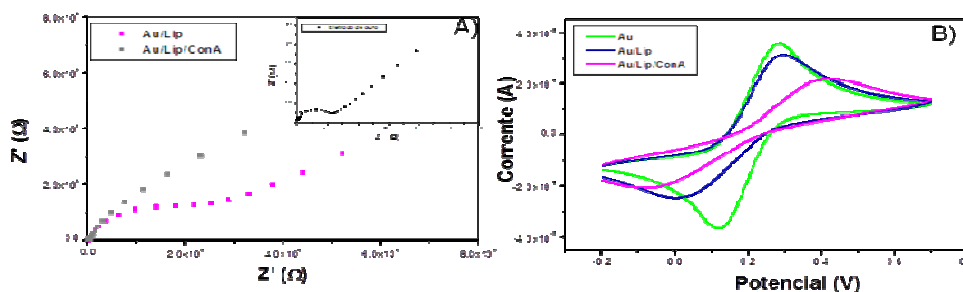


Figura 1. Diagrama de Nyquist (a) e Voltametria Cíclica (b) das etapas de obtenção do biossensor.

Após a imobilização de Con A no eletrodo Au/Lipídio a corrente de pico redox novamente decresce para -8 and 16 mA o que indica sucesso na imobilização (Fig. 2B). A presença do soro controle proporcionou um discreto aumento do diâmetro do semicírculo (Fig. 2A) e na variação da resistência a transferência de carga de 17,5 k Ω para 24,4 k Ω o que demonstra o reconhecimento de resíduos glicídicos. De fato, existe uma vasta quantidade de glicoproteínas presentes no soro as quais podem ser reconhecidas pela ConA (SPARBIER, 2007). A resposta ao soro DENVIII foi considerada expressiva $R_{CT} = 48,4$ k Ω (diluição 1:10) e 25,4 k Ω (diluição 1:2000). A infecção pelo vírus da dengue provoca uma resposta inflamatória no hospedeiro o que pode justificar o aumento de glicoproteínas presentes no soro.

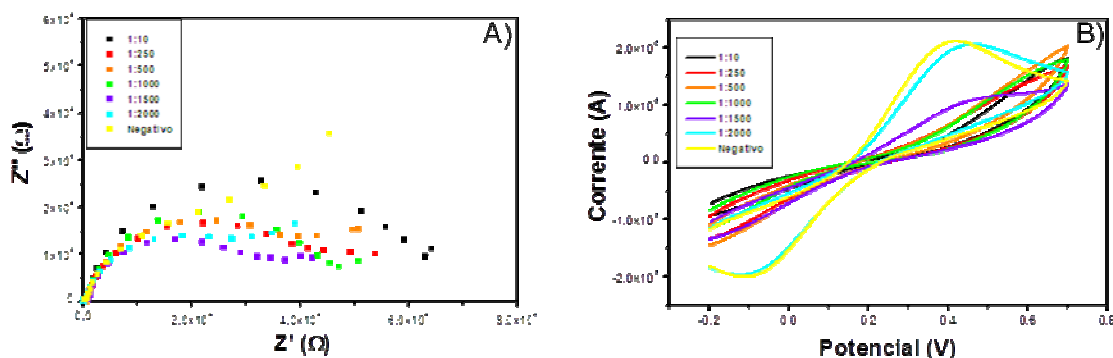


Figura 2. Diagrama de Nyquist (a) e Voltametria Cíclica (b) do biossensor após a exposição ao soro infectado com DENV-3 em diferentes diluições (1:10; 1:250; 1:500; 1:1000; 1:1500; 1:2000) (v/v).

CONCLUSÕES

Foi possível a obtenção de biossensor eletroquímico com alta sensibilidade constituído por camada lipídica automontada e lectina para o reconhecimento de glicoproteínas presentes no soro de pacientes contaminados com DENV- 3. A presente estratégia de montagem do biossensor é uma alternativa promissora para o diagnóstico da dengue.

AGRADECIMENTOS

FACEPE, CNPq e Rede de Nanobiotecnologia-CAPES.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AN, J.; ZHOU, D. -S.; ZHANG, J. -L. ET AL. Dengue-specific CD8+ T cells have both protective and pathogenic roles in dengue virus infection. **Immunology Letters**, v. 95, p. 167–174, 2004.

BARD, A.J.; FAULKNER, L.R. Electrochemical methods: fundamentals and applications, 2nd ed., **New York**, 2001.

FERREIRA, G. P; FIGUEIREDO, L. B.; COELHO, L. F. L. et al. Dengue virus 3clinical isolates show different patterns of virulence in experimental mice infection. **Microbes and Infection**, v. 12, p.546-554, 2010.

RAMSDEN, J.J. Biomimetic protein immobilization using lipid bilayers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 13, p.593–598. 1998.

SPARBIER, K.; ASPERGER, A.; RESEMANN, A.; KESSLER, I.; KOCH, S.; HENZEL, T.; STEIN, G.; VORWER, G.L.; SUCKAU, D.; KOSTRZEWA, M. Analysis of Glycoproteins in Human Serum by Means of Glycospecific Magnetic Bead Separation and LC-MALDI-TOF/TOF Analysis with Automated Glycopeptide Detection. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 18, p.252-258. 2007.

XU, H.; DI, B.; PAN, Y.X.; QIU, L.W.; WANG, Y.D.; HAO, W.; HE, L.J.; YUEN, K.Y.; CHE, X.Y. Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural protein NS1: implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 2872-2878. 2006.

WHO. 2009. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Disponível em : <<http://www.who.int/topics/dengue/en/>>. Acesso em : 26/09/2013.



SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE HIDRÓXIDO DUPLO LAMELAR A BASE DE CÁLCIO E ALUMÍNIO PARA OBTENÇÃO DE EXCIPIENTE FUNCIONAL

¹M.L.C.M. GONÇALVES, ²D.A.F. FONTES, ²I.M.F. OLIVEIRA, ¹J.L.SOARES-SOBRINHO, ⁴L.A. ROLIM, ¹M.A.M. LYRA, ³L.L.LUZ, ³A.S. BARRETO, ³S. ALVES-JUNIOR, ²P. J. ROLIM-NETO.

¹Laboratório de Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco. marialuizacmoura@hotmail.com

²Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco

³Laboratório de Terras Raras, Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco

⁴Universidade Federal do Vale do São Francisco.

RESUMO

A síntese de hidróxidos duplos lamelares (HDL's) iniciou-se em 1942 com Feitknecht, que sintetizou uma grande quantidade destes compostos baseando-se na precipitação controlada de soluções aquosas contendo cátions metálicos com uma solução alcalina (FEITKNECHT, 1942). A importância dos HDL's está em suas várias aplicações: catalisadores; antiácidos; estabilizadores; suporte para liberação controlada de fármacos, etc., tornando-o um material promissor. No presente trabalho, foram realizadas sínteses de HDL a base de Ca e Al, utilizando como precursores $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,017M) e $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, sob diferentes condições de síntese, visando obter um material com melhor qualidade.

INTRODUÇÃO

Os HDL's possuem ocorrência natural e sintética ser sintetizados em laboratório com rota simples e de baixo custo, obtendo material sólido com alto nível de pureza. Sendo aqueles que contêm no domínio interlamelar (entre as lamelas) espécies aniônicas, podendo ser chamados quando também de “argilas aniônicas”, pois apresentam uma estrutura bidimensional organizada e poros flexíveis como argilo-minerais (MARTIN, PINNAVAIA. 1986, BOTAN et al. 2011).

O método de preparação é um fator importante na obtenção de compostos puros. A síntese mais comum de materiais do tipo hidróxidos duplos lamelares é a de co-precipitação, porém existe diversas outras sínteses como síntese método sal-óxido, síntese hidrotérmica e síntese por microondas.

O desenvolvimento científico e tecnológico que ocorreu durante o século XX permitiu o entendimento das razões para o uso e das propriedades das argilas e

argilominerais, diretamente relacionados com o tamanho coloidal e a estrutura cristalina. Essas propriedades são relacionadas com a alta área superficial, ótimas propriedades reológicas e excelente capacidade de adsorção. No campo da saúde, são utilizadas como antiácidos, em kits de diagnósticos e ultimamente estudados como excipiente farmacêutico (KIBBE, 2000; CARRETERO, 2002, HOYO, 2007).

OBJETIVOS

Realizar sínteses de hidróxidos duplos lamelares a base de Cálcio e Alumínio, com o intuito de investigar bons parâmetros para se obter o material de interesse.

MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizou-se na síntese do Hidróxido Duplo Lamelar de Cálcio e Alumínio (Ca-Al-HDL), o Nitrato de Alumínio nonahidratado [Al(NO₃)₃.9H₂O] (VETEC-134), Nitrato de Cálcio Tetra hidratado [Ca(NO₃)₂.4H₂O] (VETEC-663) e hidróxido de sódio P.A. (DINÂMICA - Lote 14109). Em todo o processo da síntese utilizou-se água deionizada fervida.

Na síntese inicial usou-se a técnica de co-precipitação, descrita por Shafiei e colaboradores (2013). Em um enlarmeyer adicionou-se 50 ml de uma solução de NaOH 0,1 M, e em seguida 100 ml de uma solução contendo uma certa concentração Ca(NO₃)₂.4H₂O (0,017M) e Al(NO₃)₃.9H₂O (0,010M), é gotejada a uma razão de um mililitro por minuto. Todo processo de síntese foi realizado sob agitação constante, temperatura ambiente e pH $10 \pm 0,5$, após seu término as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a uma rotação de 4.000 RPM. Depois, lavadas com água deionizada fervida para retirar o excesso de hidroxilas provenientes do NaOH, e secas a temperatura ambiente em dessecador. Na 1^a etapa da síntese testou-se 3 tempos diferentes de reação (4, 14 e 24 horas), com o intuito de observar qual o tempo de reação que seria mais viável a reação proposta. Na 2^a etapa da síntese utilizou-se como tempo de reação 14 horas, foram analisadas variações em 2, 3 e 5 vezes a concentração inicial dos reagentes de partida, objetivando uma síntese com um rendimento maior.

A difração de raios X foi obtida em equipamento Bruker D8 Advance X-Ray diffract meter ($K\alpha(\text{Cu})$ 1,54 Å), na faixa de 5° to 50°, step 0.01° e tempo de aquisição de 1 segundo.

As curvas de TG foram obtidas no intervalo de temperatura de 20-900 °C, utilizando o equipamento Shimadzu TGA 50, sob atmosfera de nitrogênio com fluxo (50 mL min⁻¹) e razão de aquecimento de 10°C min⁻¹, utilizando 3 mg de amostra em porta amostra de alumina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Obteve-se para os tempos de síntese 4, 14 e 24 horas, respectivamente 0,0183g, 0,0320g e 0,0268g, pôde-se perceber que a síntese obtida em 14 horas proporcionou o maior rendimento; seguidas das sínteses de 24 e 4 horas. Estes compostos foram

analisados frente à técnica de DRX, para comparar as suas características estruturais (figura 1A).

Analisando os difratogramas da figura 1A, pode-se notar que as estruturas das três amostras foram semelhantes, representadas pelos mesmos picos de difração com intensidades bem próximas. Porém, estes difratogramas mostram-se bem diferentes do que se conhece na literatura para o Ca-Al-HDL (Shafiei et al; 2013). Os difratogramas obtidos apresentaram mais fases, com intensidades diferentes, as quais podem ser provenientes dos reagentes de partida.

A partir do aumento da concentração dos reagentes da síntese, obtiveram-se condições de sínteses favoráveis à formação de estruturas cristalinas semelhantes às do composto sintetizado por Shafiei e colaboradores (2013); principalmente quando se trata do composto obtido com cinco vezes a concentração inicial (figura 1B).

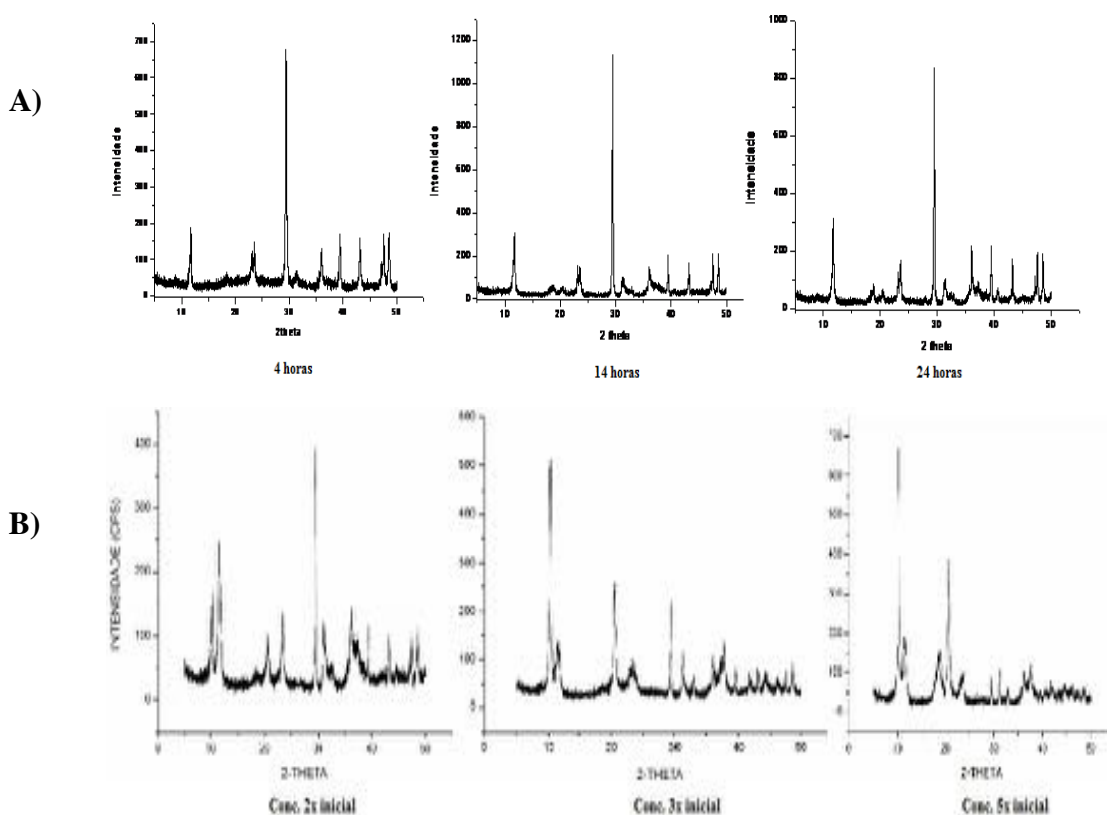


Figura 1. **A)** Difratogramas do Ca-Al-HDL obtido em 4, 14 e 24 horas de reação. **B)** Difratogramas do Ca-Al-HDL obtidos com 2, 3 e 5 vezes as concentrações iniciais dos reagentes de partida.

Os eventos termogravimétricos de perda de massa dos compostos obtidos após variação da concentração inicial de síntese (figura 2) foram compatíveis com as perdas de massa obtidas no artigo referência; mas, vale salientar que houve antecipações dos eventos.

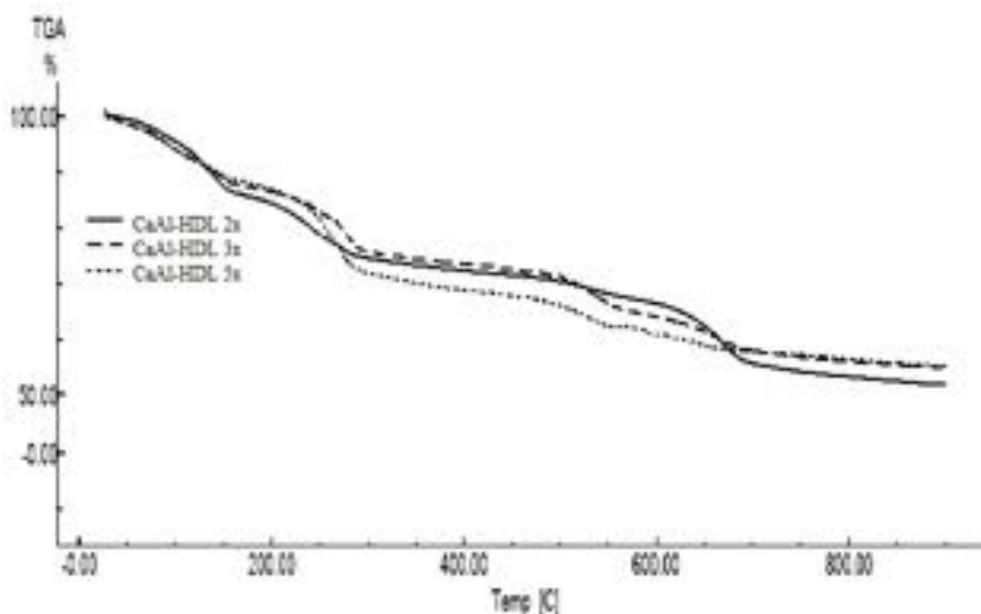


Figura 2. Perfis termogravimétricos dos Ca-Al-LDH obtidos em concentrações variadas

No experimento executado por Shaifel e colaboradores (2013), foram evidenciados os seguintes eventos termogravimétricos: até 150°C perda de 9,9% de massa, até 330°C perda de 24% e a partir de 330°C início da decomposição. No trabalho em questão, quando se elevou em duas vezes a concentração inicial dos reagentes, obteve-se os seguintes eventos termogravimétrico: até 151°C perda de 12,5% de massa, até 272°C perda de 24,1% e a partir de 272°C início de decomposição; quando aumentou-se em três vezes a concentração inicial dos reagentes, obteve-se os seguintes eventos termogravimétrico: até 154°C perda de 9% de massa, até 288°C perda de 20,6% e a partir de 288°C início de decomposição; e quando se elevou em cinco vezes a concentração inicial dos reagentes, obteve-se os seguintes eventos termogravimétrico: até 128°C perda de 9,6% de massa, até 280°C perda de 25,9% e a partir de 280°C início de decomposição.

CONCLUSÕES

Pôde-se observar que o composto obtido com cinco vezes a concentração inicial de síntese, foi o que melhor apresentou características inerentes do Ca-Al-HDL sintetizado por Shafiei e colaboradores (2013). Posteriormente, será aplicado um tratamento hidrotermal no composto obtido, com o intuito de refinar as propriedades cristalinas e de pureza do mesmo, para futuros testes de área superficial, tamanho de lamelas e capacidade de adsorção; testes de toxicidade e adsorção de fármacos.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos aos Laboratórios: NCQMC (Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos), ao LTM (Laboratório de Tecnologia de Medicamentos), Ao Laboratório de Terras Raras no Departamento de Química

fundamental pela realização da pesquisa. Aos órgãos de fomento Capes/Cnpq e FACEPE pelo incentivo financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOTAN, R., NOGUEIRA, T.R., LONA, L.M.F. E WYPYCH, F. (2011) Síntese e Caracterização de Nanocompósitos Esfoliados de Poliestireno – Hidróxido Duplo Lamelar via Polimerização *in situ*, *Polímeros*, **21**[1]:34-38.

CARRETERO, M.I. Clay minerals and their beneficial effects upon human health. A review **Appl. Clay Sci.**, v. 21, p. 155, 2002.

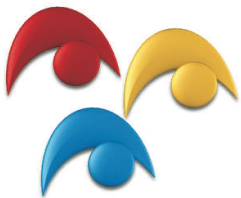
FEITKNECHT, W. Zur Kenntnis der Doppelhydroxyde und basischen Doppelsalze III. Über Magnesium-Aluminiumdoppelhydroxyd, **Helvetica Chimica Acta.** v. 25, p. 131, 1942.

HOYO, D.C. Layered double hydroxides and human health: An overview. **Appl. Clay Sci.**, v. 36, p. 103, 2007.

KIBBE, A. H. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 3rd Ed. Washington DC, American Pharmaceutical Association, 665 p., 2000.

MARTIN, K.J.; PINNAVAIA, T.J. Layered double hydroxides as supported anionic reagents. Halide-ion reactivity in zinc chromium hexahydroxide halide hydrates $[Zn_2Cr(OH)_6X.nH_2O]$ (X=Cl, I). **J. Am. Chem. Soc.**, v.108, p.541, 1986.

SHAFIEI, S.S.; SOLATI-HASHJIN, M.; RAHIM-ZADEH, H.; SAMADIKUCHAKSARAEI, A. Synthesis and characterisation of nanocrystalline Ca–Al layered double hydroxide $\{[Ca_2Al(OH)_6]NO_3.nH_2O\}$: in vitro study. **Advances in Applied Ceramics**, v.112, n.1, p.59-65, 2013.



TERRITORIALIDADES EM ASSOCIAÇÕES ECONÔMICAS NA CADEIA PRODUTIVA DE PLANTAS MEDICINAIS EM MUNICÍPIOS DA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE, PERNAMBUCO.

¹P. L. OLIVEIRA, ¹J.D SILVA, ²D.C.F VIANA, ²T.R. NUNES, ²B.C. ARAÚJO.

¹Bolsista de Iniciação à Extensão. Incubadora de Tecnologias Sociais, Universidade Federal de Pernambuco. priscilalisboageo@hotmail.com

²Doutorando de Programa de PósGraduação em Inovação Terapêutica, Incubadora de Tecnologias Sociais, Universidade Federal de Pernambuco

RESUMO

O trabalho investiga as territorialidades de associações ligadas à produção oficial de plantas medicinais nos municípios de Camaragibe, Jaboatão dos Guararapes e Paulista, situados na Região Metropolitana do Recife (RMR), em Pernambuco. Com base no conceito de Território foram realizadas entrevistas semi-estruturadas com o intuito de melhor conhecer a institucionalização das associações de manipuladores de plantas medicinais, buscando situar suas territorialidades em três contextos históricos.

Palavras-chave: *Territorialidades, Conhecimento Tradicional, Plantas Mediciniais*

INTRODUÇÃO

Souza (1995) compreende território como um espaço definido e delimitado por e a partir de relações de poder. Raffestin (1986) aborda o território com um olhar político e o compreende como algo além do espaço físico, como é comumente confundido o território. O autor compreende o espaço como algo anterior e que por sua vez seria moldado por relações de poder. A sociedade molda o espaço e desta forma produz o território. Atenta também que, para compreendermos as territorialidades, é preciso entender aquilo que as construiu e os lugares em que elas se desenvolvem, pois a Territorialidade se inscreve no quadro da produção, da troca e do consumo das coisas e não apenas a relação com o espaço é um sistema tridimensional sociedade – espaço - tempo, é a relação com o outro e esta, mediada pelo espaço através do tempo, é um sistema dinâmico. A utilização de plantas medicinais para fins profiláticos e/ou curativos é uma prática tradicional, amplamente difundida, sendo o Brasil o país com a maior biodiversidade do planeta. Segundo Prance (1977), mais de 55 mil plantas superiores já foram catalogadas, podendo parte delas ser utilizada para fins medicinais, com grande potencial econômico, que pode ser explorado por indústrias farmacêuticas, herbanários, agricultores e outros agentes da cadeia produtiva e de valor de plantas medicinais e fitoterápicos. Nesse contexto, inserem-se o Centro de Saúde Alternativa da Muribeca (CESAM), o Centro de Formação e Educação em Medicina Popular (CEFOMP) e o Centro de Práticas Naturais de Saúde de Camaragibe (CEPRANSC), Associações de Manipuladores de Plantas Medicinais e Remédio Fitoterápicos,

localizadas na Região Metropolitana do Recife-PE. As associações são formadas por um horto e uma oficina. No horto são cultivadas espécies vegetais simpáticas à região e na oficina são elaboradas as preparações medicinais sob a forma de pomadas, xaropes, tinturas etc. As unidades apresentam, ainda, um espaço para exposição e comercialização dos produtos.

OBJETIVO

O presente trabalho pretende investigar as territorialidades de associações produtoras de plantas medicinais e fitoterápicos tradicionais nos municípios de Camaragibe, Jaboatão dos Guararapes e Paulista, situados na Região Metropolitana do Recife (RMR), em Pernambuco.

MATERIAIS E MÉTODOS

Com base nos conceitos de Souza e Raffestin foram realizadas entrevistas semi-estruturadas com o intuito de melhor conhecer a institucionalização de associações de manipuladores de plantas medicinais, buscando situar suas territorialidades em contextos históricos. As entrevistas ocorreram durante os meses de setembro e outubro de 2012, nas próprias associações. Nessas ocasiões, buscou-se responder às seguintes perguntas: *Em que Território surgiu a associação? Como a associação está organizada atualmente? Como é realizada a organização do trabalho? Como são tomadas as decisões?* Com a permissão dos entrevistados, as entrevistas foram gravadas e, em seguida, transcritas. Posteriormente, as entrevistas foram comparadas, permitindo uma caracterização das territorialidades das associações em três momentos históricos específicos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro momento temos o contexto de formação dos grupos. Nele, destaca-se o conhecimento tradicional, pois as associadas já utilizavam em suas casas plantas com fins profiláticos e/ou curativos. Nesse contexto, houve o encontro com a Igreja Católica, que foi uma catalisadora desses grupos. O encontro ocorreu num período em que clérigos ligados a movimentos de esquerda defendiam uma maior atuação social da Igreja, como resposta à ineficiência do Estado em relação à promoção de saúde da população. Nesse sentido, os grupos atuavam junto à Igreja utilizando o espaço das paróquias. Os clérigos apoiavam o trabalho das mulheres sob a forma de pastorais. Nesse período a produção dos remédios fitoterápicos se confundiam com o movimento das pastorais e os grupos promoviam encontros nas paróquias locais para trocas de experiências com os usos das plantas. Os grupos também receberam capacitação oferecida pelo Centro Nordestino de Medicina Popular, financiado pela Igreja Católica. No segundo momento, temos uma modificação na conjuntura política da Igreja, o que levou à formação das associações. Uma mudança na gestão da Arquidiocese de Olinda e Recife fez com que o apoio da Igreja Católica aos movimentos sociais fosse diminuindo pouco a pouco, afetando o trabalho dos grupos de manipuladores de plantas medicinais. Em decorrência, vários grupos desapareceram, principalmente na cidade de Paulista. Os grupos que decidiram resistir a esta mudança passaram a se organizar em Associações e

buscar um espaço para continuar a realizar suas atividades de forma independente; a partir desse momento, surge o CEFOMP em Paulista, o CEPRANSC em Camaragibe e o CESAM em Muribeca, no município de Jaboatão. Sem apoio da Igreja, os grupos mudaram suas territorialidades, aprendendo a lidar com a perda do apoio dessa instituição. No momento atual, as associações têm de enfrentar o desafio da autonomia, ou seja, de se enxergarem como próprios gestores e compreenderem a atividade que realizam como fonte geradora de renda, e não mais como filantropia, como acontecia quando a atividade era dirigida pela Igreja. Para superarem este desafio, as associações criaram uma rede - a AMARFITSA, que permite que as decisões possam ser tomadas em conjunto. As associações também têm se identificado com o movimento da economia solidária. Todas se encontram cadastradas na Rede Cirandas e participam de encontros e seminários sobre esse modelo econômico alternativo ao capitalismo hegemônico. Contudo, os grupos ainda enfrentam questões ligadas ao desafio da autogestão. Em alguns grupos, não há uma divisão e organização do trabalho, e faltam pessoas para darem continuidade à atividade de manipulação das plantas e cuidados com os hortos. Por outro lado, um dos grupos tem obtido sucesso por adotar uma estratégia territorial, estreitando as ligações com a escola do bairro, posto de saúde e outras organizações sociais da localidade.

CONCLUSÃO

O entendimento da história e organização das associações de produção de plantas medicinais auxilia na implementação de políticas de desenvolvimento, que possam ajudar tais associações a fortalecer os laços com os seus territórios de atuação. A constituição desses territórios são essenciais para que ocorra a preservação do conhecimento tradicional sobre as plantas, principal aspecto que define as territorialidades das associações.

AGRADECIMENTO

Agradeço a Pró-Reitoria de Extensão da UFPE e ao Ministério da Educação que apoiaram o desenvolvimento desta pesquisa por meio do Projeto Mec/Sesu 2012 Territorialidades no plantio, produção, comercialização e uso racional na cadeia de plantas medicinais e fitoterápicos: uma proposta de incubação de iniciativas econômicas solidárias”.

REFERÊNCIAS

PRANCE, G.T. Floristic inventory of the tropics: where do we stand? *Ann. Missouri Bot. Gard.*, v. 64, p. 559-684, 1977.

RAFFESTIN, Claude. *Por uma Geografia do Poder*, 1993. Cap.3

SOUZA, José Marcelo Lopes de. O território: sobre espaço e poder, autonomia e desenvolvimento. In: Geografia - Conceitos e Temas. Rio de Janeiro: Bertrand do Brasil, 1995.



TRANSFORMAÇÕES DO SETOR FARMACÊUTICO E JANELAS DE OPORTUNIDADES: MUDANÇAS NO PARADIGMA TECNOLÓGICO E NA ESTRATÉGIA DE ATUAÇÃO DAS BIG PHARMAS

¹D. C. F. VIANA, ¹T. R. S. NUNES

¹Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco

RESUMO

Apesar de estar inserido no âmbito da economia da saúde, o setor farmacêutico se distingue de outros setores da economia pela sua natureza ambígua, estando seu desenvolvimento fortemente influenciado pelas mudanças tecnológicas. Assim, objetivou-se caracterizar e analisar seus ciclos de transformações, enfatizando-se aqueles decorrentes dos novos paradigmas tecnológicos, a partir de revisão de literatura. O setor, representado principalmente pelas *big pharmas*, encontra-se em meio à crise da mudança de paradigma. A perda de patentes, aliada ao aumento no controle de preços pelo governo e à pressão exercida pela crise econômica mundial vêm fazendo com que a indústria farmacêutica procure alternativas ao modelo. Nesta nova paisagem, o papel das universidades vem sendo redefinido, observando-se uma crescente interação entre estas, as *big pharmas* e o governo.

INTRODUÇÃO

O setor farmacêutico está inserido no âmbito da economia da saúde e, como tal, compartilha as especificidades comuns aos setores associados à assistência médica. Segundo Arrow (1963), algumas das especificidades que caracterizam a saúde enquanto bem econômico incluem: (i) a natureza da demanda, uma vez que o adoecer é imprevisível e leva a uma perda ou diminuição da capacidade de trabalho e da renda; (ii) a indivisibilidade do produto-fornecedor, já que na assistência médica, o produto e a atividade de produção são idênticos; (iii) a assimetria de informação, pois o conhecimento está centralizado no profissional de saúde, estabelecendo-se uma relação de dependência do paciente-consumidor; (iv) barreiras à entrada, porque há exigência de certificações para a prestação de serviços ou introdução de mercadorias; (v) a competição por preços é fortemente desaprovada e os custos do tratamento são individuais (ALBUQUERQUE; CASSIOLATO, 2000).

O setor saúde também se caracteriza pela forte interação com outros setores da economia e com o Estado, que tem interesse em promover o bem estar da população. Nesse contexto, o setor farmacêutico se distingue de outros setores da economia pela sua natureza ambígua, que envolve a saúde como direito e como objeto de acumulação de capital.

Ademais, o setor farmacêutico desenvolve-se acompanhado pelas transformações tecnológicas, que incidem diretamente sobre sua forma de organização e regulação. Nesse

sentido, é possível identificar ciclos de reestruturação desse setor, impulsionados por mudanças no paradigma tecnológico que determinam os conhecimentos, estratégias de aprendizado, lócus de inovação e as condições necessárias para sua difusão em âmbito local e global.

OBJETIVOS

Caracterizar e analisar os ciclos de transformações do setor farmacêutico, identificando as janelas de oportunidades decorrentes dos novos paradigmas tecnológicos e das mudanças na estratégia de atuação das *big pharmas*.

MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa se caracterizou como exploratória, descritiva e explicativa, baseada, sobretudo, em revisão sistemática de literatura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com Radaelli (2009), é possível identificar historicamente três ciclos de crescimento e mudanças que conformaram a pesquisa e a produção na indústria farmacêutica.

O primeiro ciclo (1850 a 1945). O advento da indústria farmacêutica nesse período esteve ligado a *serendipity*, isto é, descobertas intuitivas ou meros acasos. Segundo a autora, tais descobertas ocorriam aleatoriamente em laboratórios de universidades americanas e inglesas ou em indústrias químicas alemãs. Esse período marca o aparecimento das primeiras empresas preocupadas predominantemente com a produção e comercialização de produtos farmacêuticos. As estratégias de aprendizado dessas empresas incluíam a aquisição de invenções e o desenvolvimento de atividades de P&D com a colaboração de institutos de pesquisa acadêmica. As empresas eram voltadas para o mercado interno, e as mudanças institucionais desse primeiro ciclo incidiam pela associação da técnica com a ciência, segundo o paradigma técnico-científico.

O segundo ciclo (1945 e 1980). Caracteriza-se pela consolidação das *big pharmas*, isto é, empresas líderes do segmento farmacêutico no mundo. Ainda segundo Radaelli (op. cit.), estimuladas pela onda de crescimento econômico do pós-guerra, “a indústria farmacêutica não apresenta no período taxas de crescimento inferiores a dois dígitos”. Em relação ao conhecimento, a descoberta da penicilina em 1928 abriu uma nova agenda de pesquisa com foco no conhecimento sobre micro-organismos para o desenvolvimento de antibióticos, que tiveram sua comercialização em grande escala a partir de 1941. Estes, por sua vez, permitiram o tratamento e controle de doenças bacterianas como a tuberculose, úlceras etc. O lócus da inovação eram os laboratórios de P&D das grandes indústrias. Organizadas segundo disciplinas ou áreas terapêuticas, as pesquisas realizadas nas indústrias se concentravam na melhoria ou síntese de moléculas para alvos biológicos de interesse comercial. Essa fase da pesquisa se caracteriza pelo desenvolvimento de métodos racionais de obtenção e escalonamento de moléculas e é, por isso, conhecida como *rational drug design*. Ademais, verifica-se, nesse período, um forte incentivo dos Estados para a inovação no setor farmacêutico, despendido por meio de fundos para pesquisa acadêmica. Em países periféricos, como Índia e Brasil, reformas na legislação de propriedade

intelectual e criação de reservas de mercado permitiram uma expansão do setor farmacêutico com a produção de similares (GUENNIF; RAMANI, 2012).

O terceiro ciclo (1980 até os dias atuais). Esse período se encontra em meio às transformações resultantes da mudança do paradigma mecânico-químico para o eletrônico-biotecnológico e nanotecnológico. A descoberta da estrutura do DNA em 1953 e o advento do computador na década de 1970 inauguraram um novo campo para as indústrias farmacêuticas. Agora, com base na técnica do DNA recombinante, é possível induzir a produção de proteínas e outros compostos de origem biológica, como anticorpos monoclonais. Além disso, técnicas de *screening in silico* permitem uma economia de tempo e de recursos no processo de identificação de novas moléculas com ação terapêutica. O desenvolvimento da nanotecnologia tem permitido, ainda, uma diversidade de inovações incrementais em moléculas com atividades biológicas que apresentam problemas de biodisponibilidade e toxicidade.

Para as indústrias farmacêuticas, adequar-se aos novos paradigmas implica em elevados custos, que envolvem estruturar agendas de P&D, laboratórios e, em alguns casos, a companhia como um todo. Embora os avanços tecnológicos tenham permitido uma economia de tempo, o risco associado às possibilidades de erros ainda se faz presente e podem representar perdas de bilhões de dólares (RADEAELLI, 2009). A terceirização foi, portanto, uma das saídas para a crise. Com isso, vários serviços passaram a ser oferecidos por empresas especializadas. Foram terceirizadas atividades relacionadas ao marketing e vendas, testes para validação de produtos, testes clínicos e pré-clínicos, assim como parte do P&D – ampliando a cadeia produtiva farmacêutica.

Em relação ao lócus da inovação, assim como no primeiro ciclo, as universidades se destacam como a origem de muitas das inovações no campo da biotecnologia. Além disso, a cultura empreendedora de algumas universidades abriu espaço para que muitas descobertas pudessem ser comercializadas por empresas *start-ups*, que se beneficiam da multiplicação de infraestruturas para o empreendedorismo acadêmico, a exemplo de incubadoras e parques tecnológicos.

Estas pequenas empresas de base tecnológica se tornaram elementos fundamentais na nova dinâmica de inovação do setor farmacêutico, uma vez que passaram a atuar em nichos de mercado ainda inexplorados pelas *big pharmas*. Assim, uma das estratégias adotadas pela indústria farmacêutica é licenciar patentes de empresas *start-ups* e universidades, ou implementar contratos de cooperação para pesquisas, por meio do que tem sido descrito como “inovação aberta”.

Dessa forma, as grandes empresas, agora com escopo global, passaram a prospectar locais onde houvesse um ambiente inovativo que permita a captura de *spillover* de informação e conhecimento. A escala local, portanto, tomou um novo sentido, uma vez que os locais passam a se tornar significantes, não apenas em função das distâncias e infraestruturas de transporte mas, principalmente, por uma dinâmica própria em relação à produção e difusão de conhecimento.

As principais características de cada ciclo do setor farmacêutico podem ser observadas no quadro 1.

Quadro 1. Principais transformações do setor farmacêutico nas últimas décadas

	Ciclo I 1850-1945	Ciclo II 1945-1980	Ciclo III 1980 – dias atuais
Onda de mudança tecnológica	Produtos naturais e obtidos por síntese química	Antibióticos	Produtos obtidos por via biotecnológica
Lócus da Inovação	Laboratórios acadêmicos ingleses e americanos. Indústrias químicas alemãs	Laboratórios acadêmicos. Laboratórios de P&D das Indústrias farmacêuticas	Redes de conhecimento entre grandes empresas e centros acadêmicos. Empresas Start-ups
Estratégia de aprendizado	Serendipidade	Incorporação de expertises nos setores de P&D. Rational Drug Design	Integração do conhecimento externo e captura de economias de escopo internas (spillovers de conhecimento)
Mudança organizacional	Produção de fármacos e medicamentos em grande escala	Estabelecimento das “big pharmas”	Crescimento de empresas Start-ups
Mudança institucional	Aquisição de invenções e novas drogas descobertas externamente. Colaboração com os institutos de pesquisa acadêmica. Desenvolvimento de atividades de P&D internas às empresas	Crescimento de reservas públicas para apoio a pesquisa acadêmica. Ampliação do escopo de patentes. Crescimento da intensidade de pesquisas na empresa	Universidades empreendedora. Licenciamento e aquisição de patentes. Quebra de patentes. Crescimento das atividades de terceirização

Fonte: Adaptado de Radaelli, 2009

CONCLUSÕES

A indústria farmacêutica continua como um setor econômico estratégico, que agrupa atividades de pesquisa, fabricação e comercialização de medicamentos para a medicina humana e veterinária. A atividade é exercida por empresas farmacêuticas e de biotecnologia e continua sendo um importante fator de crescimento da economia global. No entanto, a perda de patentes de muitos medicamentos *blockbusters* que chegam progressivamente ao domínio público, aliada às medidas nacionais de regulação de preços e à pressão exercida pela crise econômica mundial sobre os rendimentos líquidos, faz com que a indústria farmacêutica, mais do que nunca, tenha procurado um novo modelo econômico. O paradigma da nanotecnologia e da biotecnologia, ainda muito ligado a descobertas acadêmicas, têm redefinido o papel das universidades e da escala locais. Nesse sentido, a estratégia de atuação do setor tem valorizado a interação com a academia e o Estado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, E. & CASSIOLATO, J. As Especificidades do Sistema de Inovação do Setor Saúde: Uma Resenha da Literatura como Introdução a uma Discussão sobre o Caso Brasileiro. Estudos FeSBE I. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2000.

ARROW, Kenneth J. “Uncertainty and the Welfare Economics of Medical Care”, *The American Economic Review*, Volume LIII, 1963.

GUENNIF, Samira; RAMANI, Shyama V. Explaining divergence in catchin-up in phama between India and Brazil usin the NSI framework. *Research Policy*, v. 41, p. 430-441, 2012.

RADAELLI, Vanderleia. A nova conformação setorial da indústria farmacêutica mundial: redesenho nas pesquisas e ingresso de novos atores. *Revista Brasileira de Inovação*, v. 07, p. 445-482, 2009.



3º Encontro Brasileiro
para Inovação Terapêutica

1º Workshop
Rede RISH
Rede de Inovação em Insumos
para Saúde Humana

II Workshop
Estabilidade de Fármacos
e Medicamentos

21 e 22/10/2013
Campus UFPE

23 a 25/10/2013
Dorisol Recife
Grand Hotel

Interligando competências científicas, tecnológicas e industriais em espaços de saúde

EDUCAÇÃO E ENSINO EM SAÚDE



A PRÁTICA DE FARMÁCIA CLÍNICA NO PROCESSO DE APRENDIZAGEM DO ESTUDANTE DE FARMÁCIA

¹R.C.L.A. Beltrão; ²F.P.M. Medeiros; ³I.M.F. Nóbrega

¹Estudante do Curso de Farmácia da Faculdade Pernambucana de Saúde (FPS), Recife, PE, Brasil.

E-mail: rubiabeltrao@hotmail.com

²Coordenadora do Curso de Farmácia da FPS. Farmacêutica Industrial da Coordenadoria de Pesquisa e Desenvolvimento do LAFEPE®.

³Tutora do Laboratório de Farmácia Clínica do Curso de Farmácia da FPS. Farmacêutica hospitalar do Instituto de Medicina Prof Fernando Figueira – IMIP e preceptora do estágio de farmácia hospitalar da FPS.

Introdução: O curso de graduação em Farmácia da FPS tem o laboratório de Farmácia Clínica, buscando a partir do conhecimento, desenvolver habilidades e atitudes.

Objetivos: Demonstrar a importância da prática de farmácia clínica para estudantes de farmácia e a relevância do Hospital Escola (IMIP). **Métodos:** Os estudantes foram direcionados a Enfermaria de Cuidados Paliativos do IMIP para conhecer as práticas clínicas, desenvolveram o acompanhamento clínico individual de pacientes. Realizaram avaliações quinzenais de pacientes, a partir do prontuário e das prescrições, registrando a complexidade das terapias medicamentosas, discutiram o tratamento, os mecanismos de ação, efeitos colaterais e interações medicamentosas para o paciente e as evidências dos resultados das intervenções farmacêuticas na melhoria dos regimes terapêuticos. Foi elaborado estudo de casos com a estratégia de grupo tutorial. **Resultados e discussão:** Os aspectos destacados quanto à aprendizagem construída e apreendida com as atividades práticas foram: a efetiva troca de conhecimentos, interdisciplinaridade de conteúdos, a comunicação na equipe multiprofissional e com pacientes e familiares e, o vínculo (profissional e afetivo) que se estabelece. **Conclusões:** Esta experiência permitiu aos estudantes de farmácia adquirir uma nova visão sobre a farmácia clínica e cuidados paliativos, essencial na construção de uma identidade profissional multidisciplinar, mais consciente e atuante frente aos problemas do paciente.

Apoio: Instituto de Medicina Integral Prof Fernando Figueira.

Palavras-chave: Educação em Farmácia, Aprendizagem ativa, Farmácia clínica



A VIROLOGIA EM LIVROS DIDÁTICOS: UMA ABORDAGEM ENTRE CONTEÚDO E EDUCAÇÃO EM SAÚDE

¹P.B. XIMENES, ²R.J.V. OLIVEIRA, ¹M.N. SILVA, ³B. SEVERO GOMES

¹Laboratório de Micologia Médica, Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco.
pamella_ximenes@hotmail.com

²Laboratório II da Pós-graduação, Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco.

³Micoteca URM, Departamento de Micologia, Laboratório Central do CCB. Universidade Federal de Pernambuco.

Introdução: A ensino de virologia proporciona conhecimentos básicos e aplicados para serem utilizados no dia a dia das pessoas visando melhorar sua qualidade de vida no tocante à saúde coletiva. O objetivo deste trabalho foi avaliar o conteúdo dos livros didáticos do ensino médio nos conceitos e nas informações que trazem sobre os vírus.

Métodos: Foram analisados: ano de edição, conceitos, figuras, esquemas explicativos, didática, atividades de fixação, provas de vestibulares, exame nacional do ensino médio e formação em educação em saúde. **Resultados e Discussão:** Foram analisados 12 livros de biologia destinados ao ensino médio, sendo oito livros de volume único apresentando todo programa das três séries do ensino médio, e quatro livros seriados correspondentes ao segundo ano. O ano de edição variou de 2002 a 2010. Os livros são bem ilustrados, mas não explicitam a importância de se estudar os vírus nem associam o conteúdo à realidade dos alunos, o que pode diminuir a motivação e conseqüentemente o aprendizado. Foi analisada a clareza, concisão e objetividade da linguagem utilizada, além da ausência de contradições conceituais. Apenas um autor apresentou conceitos fragmentados. Também foi considerada, a utilização de vocabulário atualizado, adequado e correto. Alguns apresentaram figuras sem correlação com o texto. **Conclusão:** Os livros analisados não estão completamente aptos para serem usados como material de apoio e com relação na educação em saúde.

Palavras-chave: Vírus, Ensino médio, Educação em Saúde.



AVANÇOS BIOTECNOLÓGICOS EM LIVROS DIDÁTICOS DE BIOLOGIA, FÍSICA E QUÍMICA DO ENSINO MÉDIO

¹P.B. XIMENES, ²R.J.V. OLIVEIRA, ¹M.N. SILVA, ³B. SEVERO GOMES

¹Laboratório de Micologia Médica, Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco.
pamella_ximenes@hotmail.com

²Laboratório II da Pós-graduação, Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco.

³Micoteca URM, Departamento de Micologia, Laboratório Central do CCB. Universidade Federal de Pernambuco

Introdução: O livro didático apresenta notável relevância na formação conceitual e social dos discentes, tendo papel importante também na veiculação de conhecimentos científicos. Este trabalho teve como objetivo analisar e avaliar o conteúdo dos livros didáticos do ensino médio nos conceitos e nas informações que trazem sobre a biotecnologia. **Métodos:** Foram analisados, ano de edição, conceitos, figuras, esquemas explicativos, didática, atividades de fixação, provas de vestibulares e exame nacional do ensino médio. **Resultados e Discussão:** Foram analisados 23 livros de biologia, física e química destinados ao ensino médio, sendo 18 livros de volume único apresentando todo programa das três séries do ensino médio, e cinco livros seriados correspondentes ao terceiro ano. O ano de edição variou de 1991 a 2010. Os livros são bem ilustrados. Em alguns existe, a preocupação com a diagramação, tornando o livro semelhante graficamente a uma revista, onde títulos, chamadas e boxes são usados. As ilustrações representam fotos e esquemas relacionados com as diferentes técnicas que utilizam seres vivos para a obtenção de processos e produtos que interessam à humanidade. Foi observado ao decorrer das edições inovações como animações disponíveis em cd, temas ao final de cada capítulo para discussão, roteiros de estudo e questões discursivas de vestibular. **Conclusão:** Observa-se uma crescente inserção dos assuntos relacionados à biotecnologia ao longo das edições.

Palavras-chave: Biotecnologia, Livros, Ensino médio.



EDUCAÇÃO EM SAÚDE PARA GESTANTES: RELATO DE EXPERIÊNCIA DE ACADÊMICOS DE ENFERMAGEM

¹V.B. SILVA,¹ D.M. SILVA, ¹D.C.C. SIQUEIRA,² M.C.C. LIRA.

¹ Acadêmica . Núcleo de Enfermagem , Centro Acadêmico de Vitória - Universidade Federal de Pernambuco - CAV. vanessabs1@hotmail.com

² Professora Assistente do Curso de Enfermagem do Centro Acadêmico de Vitória – Universidade Federal de Pernambuco

Introdução: A gravidez é uma condição que envolve muitos mitos, dúvidas, crenças e expectativas, que podem estar diretamente relacionados ao contexto familiar e social. Diante disso visualiza-se a constante necessidade de ações de saúde desenvolvidas por uma rede regionalizada e hierarquizada de atenção à saúde, com tecnologias adequadas a cada nível de atenção, visando ao atendimento integral da população. **Objetivo:** Refletir como acadêmicas de enfermagem acerca da educação em saúde para gestantes, visando preparar-se para este enfrentamento durante o exercício profissional. **Metodologia:** Trata-se de um relato de experiência oriundo da realização de Estágio Curricular em Unidade de Saúde da Família integrada a Estratégia de Saúde da Família (ESF), desenvolvido por acadêmicos de Enfermagem da Universidade Federal do Pernambuco, na cidade de Vitória de Santo Antão/PE, abordado através de um grupo de gestante com reuniões semanais. **Resultados:** Percebemos que através da educação em saúde é possível identificar situações de risco à saúde dos gestantes, bem como, esclarecer dúvidas relacionadas ao processo gravídico puerperal. O curso de gestante é um espaço atencioso, promotor de tranquilidade, conhecimento e esclarecimento de dúvidas relacionadas ao processo gravídico puerperal. Esta prática permite instrumentalizar as gestantes na busca de uma melhoria na sua qualidade vida e propiciar para nós, acadêmicos de Enfermagem, a qualificação das competências e habilidades no processo de trabalho de promoção da saúde com gestantes. **Conclusões:** As vivências dentro do grupo são fundamentais para o crescimento dos profissionais e informação das gestantes assistidas pelo grupo. Dessa forma, abordar as vantagens e as dificuldades que podem ocorrer durante a gestação, considerando os conhecimentos prévios e as expectativas das gestantes, os seus sentimentos, pode levá-las a se sentirem mais seguras para superar as possíveis adversidades do período gestacional e amamentação.

Palavras-chave: Gestação; Educação em Saúde; Acadêmicos



O SOFTWARE PHARMA-VP COMO UMA FERRAMENTA DE INOVAÇÃO PARA O ENSINO DA ATENÇÃO FARMACÊUTICA

¹A.R. MESQUITA, ¹W.M. SOUZA, ¹B.J. BALISA-ROCHA, ¹CASTRO, P.F.,
²M.B. DOSEA, ³L.M.A. SILVA, ¹W.B. SILVA, ¹D.P. LYRA JÚNIOR

¹Laboratório de Ensino e Pesquisa em Farmácia Social, Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Sergipe. lepfs.ufs@gmail.com

²Departamento de Sistema de Informação, Universidade Federal de Sergipe

³Departamento de Computação, Universidade Federal de Sergipe

Introdução: As inovações tecnológicas na área farmacêutica têm contribuído para melhora na terapêutica. Assim, o desenvolvimento de práticas inovadoras de ensino, como o paciente virtual, potencializa a formação profissional para a prática da Atenção Farmacêutica. Este estudo visa avaliar o uso do software PHARMA-VP como uma ferramenta de inovação para o ensino da atenção farmacêutica. **Métodos:** Foram realizados dois estudos de desenvolvimento metodológico do software *PharmaVP*, em 2010 e 2012. O software foi aplicado na população de estudantes da disciplina de Atenção Farmacêutica do Curso de Farmácia da UFS, durante os semestres 2012.1 e 2013.1. O software foi avaliado quantitativamente usando o instrumento adaptado da ISO/IEC 9126 (2001) - segundo as seguintes métricas: Funcionalidade; Usabilidade; Eficácia; Segurança e Satisfação. **Resultados e Discussão:** O *PharmaVP Software* foi utilizado por 31 estudantes no semestre 2012.1 e 39 no semestre 2013.1. Na avaliação do primeiro semestre os estudantes consideraram o software principalmente Seguro, Produtivo e Útil, enquanto no segundo semestre os alunos avaliaram como melhores a Atratividade, Usabilidade e Satisfação com o software. **Conclusão:** O software *PharmaVP* foi avaliado satisfatoriamente nas duas turmas da disciplina Atenção Farmacêutica e demonstrou que pode ser uma ferramenta inovadora para o ensino do acompanhamento farmacoterapêutico.

Apoio: CAPES

Palavras-chave: Ensino, Atenção Farmacêutica, Inovação, Paciente Virtual.



3º Encontro Brasileiro
para Inovação Terapêutica

1º Workshop
Rede RISH
Rede de Inovação em Insumos
para Saúde Humana

II Workshop
Estabilidade de Fármacos
e Medicamentos

21 e 22/10/2013
Campus UFPE

23 a 25/10/2013
Dorisol Recife
Grand Hotel

Interligando competências científicas, tecnológicas e industriais em espaços de saúde

OUTROS



A DINÂMICA RECENTE DO SETOR FARMACÊUTICO EM PERNAMBUCO E SUA IMPORTÂNCIA PARA A REGIÃO NORDESTE DO BRASIL

¹I.M. CAVALCANTI, ²D.C.F. VIANA, ²T.R.S. NUNES, ²B.C. ARAÚJO

¹Graduando em Economia na Universidade Federal de Pernambuco e bolsista do Projeto “Incubadora de Tecnologias Sociais da UFPE”.

²Doutorando em Inovação Terapêutica, PPGIT/UFPE.

RESUMO

O desenvolvimento do setor farmacêutico tem se mostrado um dos grandes desafios para as gestões brasileiras. Nesse sentido, diversas políticas têm sido criadas com o intuito de superar a dependência nacional em relação à produção de fármacos e medicamentos. Pernambuco figura como um dos estados que apresentam políticas para desenvolvimento desse setor. Para uma melhor condução das políticas de desenvolvimento produtivo do setor farmacêutico em seu território, faz-se necessário um conhecimento acerca da dinâmica desse setor em nível estadual, em particular, e regional, em geral.

INTRODUÇÃO

O setor farmacêutico corresponde a um ramo da indústria de transformação. No Brasil, esse setor está inserido no âmbito do Complexo Industrial da Saúde - CIS, o qual compreende o conjunto de segmentos produtivos responsáveis tanto pela geração de insumos estratégicos quanto pela gestão e operacionalização do sistema de saúde e que impactam nas condições de saúde e bem-estar da população (BRASIL, 2006). Segundo o IBGE (2006), o CIS é responsável por cerca de 8% da riqueza produzida no país e movimenta mais de R\$ 160 bilhões por ano. Nesse escopo, o mercado farmacêutico é responsável por um faturamento anual de R\$ 36,25 bilhões, o que coloca o mercado brasileiro na 8ª posição do ranking mundial (IMS, 2010).

O principal comprador dos produtos farmacêuticos é o estado brasileiro, que os oferece gratuitamente à população por meio do Sistema Único de Saúde. Entretanto, cerca de 80% da matéria-prima utilizada no segmento de medicamentos são importadas. De acordo com dados da balança comercial, o déficit do Brasil no setor saúde passou de R\$ 2,5 bilhões em 1996 para cerca de R\$ 10 bilhões em 2010, evidenciando a vulnerabilidade do CIS brasileiro (BRASIL, 2012).

Em nível regional, a decisão política que definiu fármacos e medicamentos como produção estratégica para o país tem levado estados e municípios a desenvolverem ações estruturantes para a dinamização do setor farmacêutico, aproveitando os incentivos advindos das políticas públicas de escala federal. Entre os estados que apresentam políticas para desenvolvimento desse setor, encontra-se Pernambuco. Para uma melhor condução das políticas de desenvolvimento produtivo do

setor farmacêutico em seu território, faz-se necessário um conhecimento acerca da dinâmica desse setor em nível estadual, em particular, e regional, em geral.

OBJETIVOS

O presente artigo analisa a dinâmica recente do setor farmacêutico em Pernambuco, comparando-a à do setor na Região Nordeste.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho utilizou como base de pesquisa três das principais fontes de dados disponibilizadas pelo governo federal. Para apurar as relações entre estados e áreas de investimentos socioeconômicos, foram utilizados dados da Relação Anual de Informações Sociais do Cadastro Geral de Empregados e Desempregados (RAIS-CAGED). No campo da saúde e, especificamente, na cadeia de produção da indústria farmacêutica, as informações foram retiradas do Banco de Dados do Sistema Único de Saúde brasileiro (dataSUS) e da Pesquisa Industrial Anual (PIA/IBGE). O período de análise compreendeu os anos 2000 a 2012, e abrangeu todos os estados da região Nordeste e os agregados regionais e nacionais.

A comparação intertemporal de PIB e renda foi realizada a partir do deflacionamento dos dados, com base no Índice de Preços ao Consumidor Amplo (IPCA/IBGE), tomando como base o ano de 2011.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pernambuco é o principal estado do Nordeste em número de estabelecimentos produtores de farmoquímicos e produtos farmacêuticos. Segundo o IBGE, em 2010, estavam instalados 34 estabelecimentos no estado, o que representa 48% dos estabelecimentos da Região Nordeste e 4,26% do Brasil.

Ainda segundo o IBGE, em relação ao valor da produção industrial desses estabelecimentos em 2010, a Região Nordeste teve uma produção de R\$ 586 milhões, cerca de 2% da produção nacional. Entre os estados da Região, Ceará foi o que teve maior participação na produção de valor industrial do setor (65% do total). O segundo estado foi Pernambuco, responsável pela produção de R\$ 124 milhões, ou 21% da produção da Região e 0,4% da produção nacional.

Segundo o Cadastro Geral de Empregados e Desempregados – CAGED, em 2010, havia na Região Nordeste cerca de cinco mil pessoas ocupadas na produção de farmoquímicos e produtos farmacêuticos, o que representa apenas 5% do contingente ocupado nesse setor no Brasil. Os estados do Nordeste com maior número de pessoas ocupadas nesse setor são Ceará e Pernambuco, que respondem, respectivamente, por 56% e 27% da força de trabalho ocupada na Região.

Ainda de acordo com dados do CAGED, em 2011, a média salarial dos trabalhadores do setor farmacêutico na Região Nordeste era de R\$ 1.718,87, acima da média geral de salários da Região (R\$ 1.379,00), porém, abaixo da média dos trabalhadores desse setor no Brasil (RAIS).

Entre os estados da Região Nordeste, a variação da média de salários foi de R\$ 1.958,19, sendo o Rio Grande do Norte o estado que apresentou maior média salarial (R\$ 2.803,53) e Sergipe, a menor média (R\$ 845,37). Pernambuco apresentou a segunda maior média salarial do setor farmacêutico (R\$ 2.570,89). Ceará, embora seja o estado com o

maior número de trabalhadores no setor farmacêutico, apresentou uma média salarial abaixo da média regional (R\$ 1.147,84).

CONCLUSÕES

Como conclusões preliminares, no tocante ao contingente de pessoas ocupadas no setor farmacêutico e à média salarial, pode-se perceber uma ligeira liderança de Pernambuco em relação aos outros estados do Nordeste, o que sinaliza condições competitivas para o estado se estruturar como forte produtor regional de fármacos e medicamentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

IMS, Health Market Prognosis. Prognosis International 2010-2014, 2010

BRASIL, Ministério da Ciência Tecnologia e Inovação. Estratégia Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação 2012-2015. Brasília, 2012.

BRASIL. Ministério do Trabalho. Relação Anual de Informações Sociais. Disponível em: <http://www.rais.gov.br>. Acesso em 20/09/2013

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Industrial Anual. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em 20/09/2013.



ANTIOXIDANTES EM PARALELO COM DESNUTRIÇÃO MATERNA, EM RATOS, PREVINEM O BAIXO PESO NO NASCIMENTO

¹L.P.N.C. BORGES, ¹N.E. RIBEIRO, ¹D.M.R GONÇALES, ¹R.S. AIRES, ¹E.V. CABRAL, ¹L.D. VIEIRA-FILHO, ¹A.D.O. PAIXÃO

Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Renal, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco. natalierrodrigues@gmail.com

Introdução: Nesse trabalho foi investigado se o status antioxidante materno, durante a gestação, influencia a expressão da gp91phox, como também outros marcadores de estresse oxidativo no rim, e os níveis de pressão sanguínea arterial da prole após o desmame. **Métodos:** Ratas Wistar grávidas foram tratadas durante a gestação com alfa-tocoferol, tempol, ou com uma restrição dietética diária na ordem de 50%. **Resultados e Discussão:** Nenhum dos tratamentos modificou a expressão da gp91phox, o alfa-tocoferol programou redução nos níveis de malondialdeído (MDA) no grupo controle, mas não na prole que sofreu restrição dietética. Além disso, ratos que sofreram restrição dietética exibiram níveis reduzidos de glutathiona reduzida (GSH). O alfa-tocoferol, juntamente com o tempol, reduziu o GSH na prole controle. Nenhum dos tratamentos mudou os níveis de pressão sanguínea na prole, nem mesmo o grupo submetido à restrição dietética, o qual apresentou número de néfrons reduzido e aumento de angiotensina II na área túbulo-intersticial. O alfa-tocoferol e o tempol recuperaram o peso ao nascer e a evolução do peso corporal da prole com restrição dietética. **Conclusão:** A administração de antioxidantes melhorou a circulação útero-placentária que levou a recuperação do peso ao nascer e a evolução do peso corporal na prole submetida à restrição dietética materna. O alfa-tocoferol, em particular, programou níveis reduzidos de estresse oxidativo no rim da prole, um efeito não mediado pela redução da expressão da gp91phox.

Apoio: CAPES, CNPq, FACEPE.

Palavras-chave: Desnutrição intrauterina, estresse oxidativo, antioxidantes



ASSOCIATION STUDY BETWEEN POLYMORPHISMS IN THE L1 GENE OF HUMAN PAPILLOMAVIRYS 16 AND RISK TO CERVICAL LESIONS

¹K.C.G. NASCIMENTO, ¹A.P.A.D. GURGEL, ¹B.S.CHAGAS, ¹R.C.O SILVA,
²J.C. SILVA NETO, ³M.T. CARTAXO, ¹A.C. FREITAS

¹ Department of Genetics- Federal University of Pernambuco

acf_ufpe@yahoo.com.br, apavla@yahoo.com.br

² Department of Histology and Embryology - Federal University of Pernambuco

³ Pediatric Oncohematology Center – University of Pernambuco

Introduction: Persistent infections caused by Human Papillomavirus (HPV) are recognized as a main cause of pre-cancerous lesions and cervical cancer. Several studies have been demonstrated that genetic variability of the HPV16 genome is associated with infectivity, persistence, host-immune response and progression to cervical cancer. However, there are no studies with regard to polymorphic regions of L1 gene from HPV16 as molecular markers of prediction to cervical lesions in women infected with HPV16 and without cervical lesions. **Aim:** The present study aims to report a haplotype association between L1 gene of G6723A and A6805T viral polymorphisms and high risk to develop cervical lesion in women from North-Eastern Brazil. **Methodology:** A total number of 51 women agreed to participate in the study. HPV16 DNA detection was performed by using polymerase chain reaction (PCR) with degenerate primers MY09/11. The genetic frequency and association analysis between the comparison groups were performed by using the UNPHASED v.3.121 software. All tests were two-tailed and the level of significance for all statistical results was set to $p < 0.05$. **Results:** Haplotype tests were carried out for genotyping data of G6723A and A6805T viral polymorphisms found within L1 gene of HPV16. The results showed an association between G6723A and A6805T viral polymorphisms (AA, $p=0.004$, OR 6.73). The odds ratio of the polymorphisms was 6.73, which indicates high risk to develop cervical lesions in women infected with HPV16 variants. **Conclusion:** This study reports the haplotype association between G6723A and A6805T viral polymorphisms and high risk to develop pre-cancerous lesions in women infected with HPV16 variants.

Agency Funding: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC/UFPE).

Keywords: Viral polymorphisms, Human Papillomavirus type 16 (HPV16), L1 gene.



ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE MICROEMULSÕES ÓLEO EM ÁGUA (O/A) CONTENDO UM NOVO DERIVADO TIOFENICO

^{1,2}Y.B.G PATRIOTA, ^{1,2}N.E.S SILVA, ²G.P. GUIMARÃES, ³R.M.R CATÃO,
³W.R.V ROCHA, ⁴F.J.B. MENDONÇA-JR, ^{1,2}J.A. SILVA, ^{1,2*}B.P.G.L
DAMASCENO

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), 58429-600, Campina Grande-PB.

²UEPB, CCBS, Departamento de Farmácia, Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDCPF), 58429-600, Campina Grande-PB.

³Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus V, João Pessoa/PB, Brasil.

⁴Laboratório de Microbiologia Clínica, CCBS, UEPB, 58429-600, Campina Grande-PB.

*bolivarpfld@pq.cnpq.br e yuribgp@hotmail.com

Introdução: Durante as últimas décadas, a incidência de infecções fúngicas tem aumentado significativamente devido ao número crescente de pacientes imunocomprometidos. Infecções causadas por *Candida* têm aumentado, criando um quadro preocupante para esta terapia. Deste modo, surge a necessidade pela pesquisa como o desenvolvimento de novos fármacos e novos sistemas de liberação, como microemulsões (ME). O objetivo deste trabalho foi desenvolver ME O/A contendo um novo derivado tiofenico (5CN06-LSVM) e avaliar sua atividade antimicrobiana. **Métodos:** Desenvolveu-se um diagrama de fases ternário (DFPT) contendo água, miristato de isopropila e Labrasol[®] (PEG-8 cáprico/caprílico glicerídeo) e escolheu-se as proporções da formulação. A incorporação do fármaco ocorreu de duas maneiras: a primeira foi através de uma agitação magnética (M1) e a segunda por sonicação (M2). A concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada utilizando o método da microdiluição para as cepas de *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilose* e *C. guilliermondii*. **Resultados e Discussão:** As MEs-5CN06-LSVM foram desenvolvidas com sucesso e bastante efetivas frente a cepas leveduriformes com CIM de 7,4; 3,7; 7,4; 3,7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para M1 e 4,2; 4,2; 4,2 e 8,3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para M2 para *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. parapsilose*, respectivamente. **Conclusão:** Estes sistemas apresentaram excelentes atividades frente às cepas testadas e, conseqüentemente, mostram-se como potenciais sistemas terapêuticos.

Apoio: CNPq, CAPES, PROPESQ - 2011,2012, CERTIBIO - UEPB/UFPG

Palavras-chave: 5CN06-LSVM, Atividade antifúngica, Derivados do tiofeno, Microemulsões.



AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DE INTERAÇÃO DO BIOSISTEMA BASEADO EM ÁCIDO p-AMINOBENZÓICO E NPsFe₃O₄ FRENTE AO M. TUBERCULOSIS

^{1*} M.P. COSTA, ²C.A.S. ANDRADE, ³MELO, F.L., ^{1,2}M.D.L. OLIVEIRA

¹ Programa de Pós-graduação em Bioquímica, UFPE. E-mail: mauriliapalmeira@gmail.com

² Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas-UFPE.

³ Centro de pesquisa Aggeu Magalhães-Universidade Federal de Pernambuco.

RESUMO

O presente trabalho tem como principal objetivo avaliar o sistema formado pelo ácido p-aminobenzóico (APB) e nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (NPsFe₃O₄) como suporte de imobilização de primer de tuberculose (TB1) para a detecção do genoma de *Micobacterium tuberculosis* (*MTB*) isolado de pacientes infectados. A caracterização do biosistema foi através das técnicas eletroquímicas voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica para avaliar as propriedades elétricas do sistema APB-NPsFe₃O₄-primerTB1. Os resultados demonstraram que o biosistema APB-NPsFe₃O₄-primerTB1 foi capaz de detectar o genoma do *MTB* pelo aumento da resistência de transferência de carga. Desta forma, verifica-se que o biosistema APB-NpsFe₃O₄-TB1 demonstra ser útil na detecção do *MTB*.

INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma infecção bacteriana causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*MTB*) e representa mundialmente um problema de saúde pública. Atualmente é de extrema importância o desenvolvimento de um teste rápido e eficiente para a identificação de *MTB* para o início do tratamento de pacientes infectados. Pelo sistema público de saúde os testes clínicos para *MTB* são dependentes de cultura necessitando de tempo para o crescimento do microrganismo.

Os biossensores demonstram ser excelentes candidatos para biodetecção de tuberculose, uma vez que, são dispositivos analíticos constituídos por duas unidades funcionais; um biorreceptor, que corresponde a um componente biológico que reconhece a substância alvo, o analito, e o transdutor, que converte a resposta biológica ou a reação bioquímica originária da interação bioespecífica em um sinal de domínio elétrico proporcional a concentração do composto detectado (Arya et al., 2012). Desta forma, o uso de biossensores de DNA para a detecção das sequências nucleicas proporciona uma enorme probabilidade de diagnóstico de doenças, análise de drogas e análises forenses (Liao et al., 2007). Além disso, para o desenvolvimento de biossensores, as nanopartículas de óxido de ferro (NPsFe₃O₄) têm sido utilizadas como alvo de estudo

para a imobilização de biomoléculas devido às suas propriedades que as tornam elementos essenciais para o desenvolvimento de sistemas biossensíveis para hibridização de DNA (Son et al., 2007).

A associação de NPsFe_3O_4 com o ácido p-aminobenzóico advém da possibilidade do uso deste sistema para imobilização covalente do biosistema na superfície do eletrodo. Portanto, é de grande importância o desenvolvimento de novas tecnologias de biodeteção rápida, seletiva e sensível para a tuberculose (Garg et al., 2003).

OBJETIVOS

O presente estudo possui como objetivos avaliar o processo adsorptivo do primer para tuberculose (TB) em eletrodo de ouro modificado e analisar a resposta de hibridização do biodispositivo após a interação do primer com o genoma de *M. tuberculosis*.

MATERIAIS E MÉTODOS

A análise eletroquímica foi realizada através de um Potenciostato/Galvanostato Autolab 128N. As medidas voltamétricas (VC) e de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foram realizadas numa célula eletroquímica convencional de três eletrodos imersos em 20 mL de solução de ferro-ferricianeto de potássio, $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] / \text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1:1), a 10 mM, atuando como sonda redox. O eletrodo de trabalho utilizado foi o eletrodo de ouro modificado, o eletrodo de referência foi o de Ag/AgCl saturado com KCl e o contra-eletrodo foi o de platina. As análises de VC foram realizadas em diferentes etapas de construção do biossensor, a um potencial de varredura fixo de -0,2 a 0,7 V, a temperatura ambiente.

Os espectros da EIE foram obtidos numa faixa de frequência entre 100 mHz a 100 KHz com um potencial de amplitude alternada de 10 mV (Oliveira et al., 2009, Andrade et al., 2009). De início a superfície de ouro foi polida em um disco de feltro com uma suspensão de alumina, em seguida, lavada com água deionizada e submetida à sonicação por 5 min para remoção de partículas residuais. Na montagem do biossensor, o eletrodo de trabalho foi submetido a 2 μL da solução de APB (5mM) por 2 min, em seguida ativado pela mistura de N-(3-Dimetilaminopropil)N-etilcarbodiimida (EDC):N-hidroxisuccinimida (NHS). Posteriormente as NpsFe_3O_4 foram modificadas com aminopropiltrimetoxisilano (APTES) em seguida depositadas sobre o ET modificado com APB, sendo obtido o sistema APB- NpFe_3O_4 . Após este processo o primer aminado foi imobilizado sobre a superfície do sistema APB- NpFe_3O_4 (30min). O biosistema APB- NpFe_3O_4 -primer foi submetido ao genoma de *MTB* (6ng/ul) para avaliação de sua capacidade de detecção por 30min e posteriormente, enxaguado suavemente para separação das moléculas não reconhecidas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Fig.1 demonstra as respostas de VC que refletem as alterações da transferência de elétrons entre o par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ e a superfície do eletrodo após cada processo de montagem do biossensor. Os VCs demonstraram que as respostas para o eletrodo de ouro limpo, eletrodo modificado com APB, APB-NpsFe₃O₄, APB-NpsFe₃O₄-primerTB1 e APB-NpsFe₃O₄-primerTB1-MTB apresentaram uma diminuição gradual das áreas voltamétricas e das correntes de pico catódicas (ipcat) e anódicas (ipan). As respostas impedimétricas na (Fig. 2) estão de acordo com as análises de VC, de modo que, a redução da ipcat e ipan após cada etapa de modificação do biodispositivo, refletiu um aumento da resistência de transferência de carga (Rct). Após a formação da camada APB-NpsFe₃O₄-primerTB1 sobre o eletrodo, houve uma variação da R_{CT} de 800 Ω para 50 kΩ, indicando a correta deposição do sistema sobre o eletrodo de ouro. Além disso, quando o biosistema foi exposto ao MTB ocorreu novo incremento na R_{CT} (72 kΩ), demonstrando a capacidade de reconhecimento biológico do sistema obtido via hibridização.

O biosistema APB- NpsFe₃O₄, quando exposto ao controle negativo não demonstrou modificação nas respostas para VC e EIE. Os resultados obtidos estão de acordo com os dados da literatura, demonstram a possibilidade de desenvolvimento de genossensor baseado em nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (Son et al., 2007). Recentemente, Oliveira et al. (2011) desenvolveu um biossensor baseado em nanopartículas de NpsFe₃O₄ e polivinilbutiral para detecção de glicoproteínas de pacientes contaminados com dengue. Estes estudos demonstram a viabilidade do uso de nanopartículas magnéticas e de ouro para o desenvolvimento de biossensores para DNA ou proteínas.

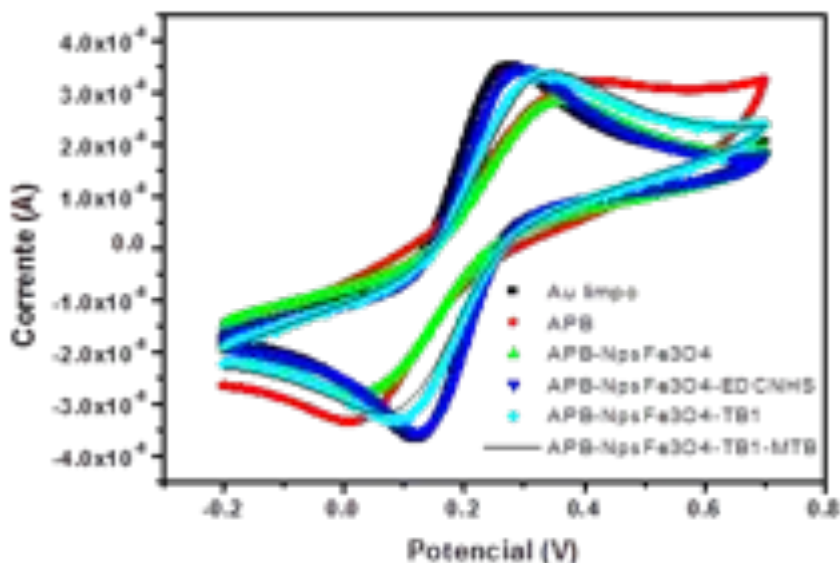


Figura 1- Voltamogramas cíclicos para as diferentes etapas de modificação do eletrodo de ouro e biodetecção de MTB pelo sistema APB-NpFe₃O₄-TB1.

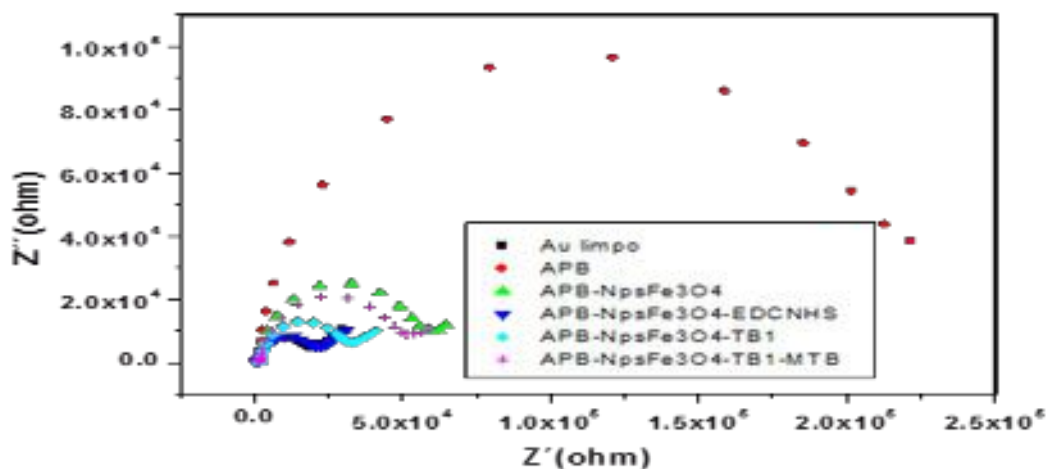


Figura 2- Análise impedimétrica para as diferentes etapas de modificação do eletrodo de ouro e biodetecção de MTB pelo sistema APB-NpFe₃O₄-TB1.

CONCLUSÕES

As análises de VC e EIE demonstraram o processo de adsorção/imobilização do sistema APB-NpsFe₃O₄-TB1 e de biointeração do sistema APB-NpsFe₃O₄-TB1 com o genoma de MTB. Pode-se concluir que o sistema APB-NpsFe₃O₄-TB1 apresentou uma boa resposta de RCT para o processo de hibridização TB1-MTB. Desta forma, o biosistema APB-NpsFe₃O₄-TB1 apresentou boa resposta para a detecção do MTB e poderá ser utilizado para a construção de um sistema de biodetecção rápido e sensível para a detecção da tuberculose.

AGRADECIMENTOS

FACEPE, CNPq e Rede Nanobiotecnologia-CAPES.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andrade, C.A.S., Oliveira, M.D.L., Magalhaes, N.S.S., Correia, M.T.S., de Melo, C.P. Coll. Surf. B., 68 (2009) 7.
2. Arya, S.K., Sahab, S., Ramirez-Vickc, J. E., Gupta, V., Bhansalid S., Singh, P. Anal. Chim. Acta 737 (2012) 1.
3. Garg, S.K., Tiwari, R.P., Tiwari, D., Singh, R., Malhotra, D., Ramnani, V.K., Prasad, G.B., Chandra, R., Fraziano, M., Colizzi, V., Bisen, P.S. J. Clin. Lab. Anal. 17 (2003) 155.

4.Liao, J.C., Mastali, M., Li, Y., Gau, V., Suchard, M.A., Babbitt, J., Gornbein, J., Landaw, E.M., McCabe, E.R., Churchill, B.M., Haake, D.A. *J. Mol. Diagn.* 9 (2007) 158.

5.Nascimento, H.P.O., Oliveira, M.D.L., de Melo, C.P., Silva, G.J.L., Cordeiro, M.T., Andrade, C.A.S. *Coll. Surf. B, Biointerfaces (Print)*, 86 (2011) 414.

6.Oliveira, M.D.L., Correia, M.T.S., Diniz, F.B. *Biosens. Bioelectron.* 25 (2009) 728.

7.Oliveira, M.D.L., Nogueira, M.L., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., Andrade, C.A.S. *Sens. Act. B, Chemical*, 155 (2011) 789.

8.Son, A., Dosev, D., Nichkova, M., Ma, Z., Kennedy, I.M., Scow, K.M., Hristova, K.R. *Anal. Biochem.* 370 (2007) 186.



AVALIAÇÃO VOLTAMÉTRICA DA BIOATIVIDADE DE *Concanavalina A* ADSORVIDA EM NACOCOMPÓSITO HÍBRIDO FRENTE A GLICOPROTEÍNA OVOALBUMINA

^{1*}K.Y.P.S AVELINO, ¹C.A.S. ANDRADE, ²C.P. DE MELO, ³M.T.S CORREIA, ³L.C.B.B COELHO, ⁴M.L. NOGUEIRA, ¹M.D.L. OLIVEIRA

¹Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco. kareniasmim@hotmail.com

²Laboratório de Polímeros Não-Convencionais, Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco.

³Laboratório de Glicoproteínas, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco.

⁴Laboratório de Pesquisa em Virologia, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP).

RESUMO

No presente trabalho, foi realizado um estudo eletroquímico para o desenvolvimento de um biodispositivo nanoestruturado baseado em lectina Concanavalina A (ConA) e nanopartículas de ouro e polianilina (AuNpPANI) para utilização em diagnósticos clínicos e laboratoriais. Análises voltamétricas possibilitaram a determinação de parâmetros ideais para a montagem do eletrodo biossensível e a avaliação da bioatividade do sistema frente à glicoproteína específica (ovoalbumina) e moléculas glicosiladas do soro de pacientes saudáveis. Logo, pode-se verificar o potencial de aplicabilidade das lectinas ConA em associação com o nanocompósito biocompatível AuNpPANI para a construção de novas metodologias de detecção biológica.

INTRODUÇÃO

Com o advento da bionanotecnologia, novos conhecimentos impulsionaram o desenvolvimento de biossensores capazes de fornecer informações específicas sobre substâncias de interesse através de um elemento de reconhecimento biológico associado a um transdutor [1,2]. Com os estudos de biofuncionalização, novos nanomateriais estão sendo desenvolvidos e utilizados na construção de biossistemas por serem capazes de aumentar o desempenho analítico. Neste cenário, destaca-se o compósito híbrido constituído de nanopartículas de ouro e polianilina (AuNpPANI) que apresenta excelente biocompatibilidade e características elétricas e ópticas diferenciadas, tornando-se elemento essencial para a montagem de biossensores [3, 4]. Além da determinação do filme nanoestruturado para modificação da superfície metálica do eletrodo, a escolha do biorreceptor é fundamental para a atividade do dispositivo analítico. Diferentes componentes biológicos podem ser utilizados para a construção de sistemas biossensíveis, em especial, as lectinas. Estas são proteínas de origem não imunológica que apresentam sítios específicos para carboidratos, consideradas ferramentas úteis para a investigação de hidratos de carbono na superfície de células, isolamento e caracterização de glicoproteínas [5, 6]. A lectina Concanavalina A (ConA) é isolada a

partir de extratos de *Canavalia ensiformis* (feijão de porco) capaz de se ligar de forma específica à moléculas de glicose e manose [7]. Desta forma, o estudo do sistema AuNpPANI-ConA possibilita o desenvolvimento de um dispositivo nanoestruturado que poderá ser utilizado em análises clínicas devido a sua capacidade de detectar glicoproteínas de forma específica moléculas biológicas e patogênicas.

OBJETIVOS

O principal objetivo do trabalho é estudar a capacidade de reconhecimento bioespecífico do sistema híbrido composto por lectina Concanavalina A (ConA) e nanocompósito de ouro e polianilina (AuNpPANI) frente a resíduos de açúcares presentes na ovoalbumina (glicoproteína teste). Desta forma, pretende-se avaliar o grau de interação lectina à glicoproteína para se determinar a viabilidade da utilização do eletrodo biossensível em testes de detecção clínica e laboratorial.

MATERIAIS E MÉTODOS

As medidas voltamétricas foram realizadas em um Potenciostato/Galvanostato Autolab 128N, em uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos imersos em solução de 10 mM de ferro-ferricianeto de potássio em uma proporção de 1:1 (v/v), atuando como sonda redox. O eletrodo de trabalho utilizado foi o eletrodo de ouro modificado, o eletrodo de referência foi o de Ag/AgCl saturado com KCl e o de contra-referência foi o de platina. As análises de voltametria cíclica (VC) foram realizadas em diferentes etapas de construção do biodispositivo, a uma faixa de potencial de -0,2 a 0,7 V e velocidade de varredura de 50 $\text{mv}\cdot\text{s}^{-1}$, a temperatura ambiente e no interior de uma gaiola de Faraday. Primeiramente, a superfície eletroativa de ouro foi polida em um disco de feltro com uma suspensão de alumina (Al_2O_3) com granulação de 0,05 μm e, em seguida, lavada abundantemente com água deionizada e submetida à sonicação por 5 minutos para remoção de partículas residuais. Para a montagem do biossensor, o disco de ouro do eletrodo de trabalho foi imerso por 2 minutos no sistema AuNpPANI-ConA, preparado a partir da mistura de lectina Concanavalina A (ConA) (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e nanocompósito de ouro e polianilina (AuNpPANI) em uma proporção de 1:2 (v/v). Após sua remoção, este foi enxaguado suavemente com água ultra-pura para remoção das partículas não adsorvidas. Posteriormente, o eletrodo biossensível foi incubado por 2 minutos no soro biológico de pacientes sadios (soro negativo - SN) e em soluções de ovoalbumina nas concentrações de 100, 150 e 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para avaliação dos perfis de reconhecimento lectina-glicoproteína. Ambas as amostras em análise foram diluídas em tampão fosfato de sódio a 10 mM e pH 7,4.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de VC permitiu avaliar a intensidade de modificação da superfície ativa do eletrodo de trabalho após a exposição às amostras de AuNpPANI (Fig. 1). Desta forma, após as análises dos voltamogramas cíclicos, pode-se determinar que a proporção 1:500 (AuNpPANI:etanol) (v/v) seria a ideal para a realização de estudos posteriores. Nesta

condição experimental, houve o menor bloqueio da transferência de elétrons na interface eletrodo-solução, cujo VC apresentou o maior pico anódico e catódico em relação aos voltamogramas referentes ao eletrodo modificado com as demais concentrações de AuNpPANI. A Fig. 2 corresponde à caracterização eletroquímica do processo de montagem do eletrodo biossensível AuNpPANI-ConA e sua bioatividade frente a moléculas específicas. Para melhor compreensão da interação lectina-carboidrato, o dispositivo nanoestruturado foi exposto a glicoproteína ovoalbumina em variáveis concentrações. Ao observar as curvas menos sigmóides e as menores áreas voltamétricas para o eletrodo modificado com AuNpPANI-ConA-ovoalbumina em relação ao sistema AuNpPANI-ConA, pode-se concluir que o biossensor é capaz de reconhecer frações da ovoalbumina que contém açúcares, especialmente, os resíduos de Man7 e Man8 nas cadeias de oligo-manose. Ao avaliar o perfil de reconhecimento glicídico do biodispositivo perante o soro de indivíduos não infectados, verifica-se a baixa interação da lectina ConA com as glicoproteínas fisiológicas, o que demonstra um padrão de reconhecimento distinto para diferentes glicoproteína e/ou açúcares. Portanto, o eletrodo biossensível baseado em AuNpPANI-ConA foi capaz de interagir com a ovoalbumina e poderá ser utilizado em estudos de detecção de moléculas antigênicas com a finalidade de diagnósticos clínicos.

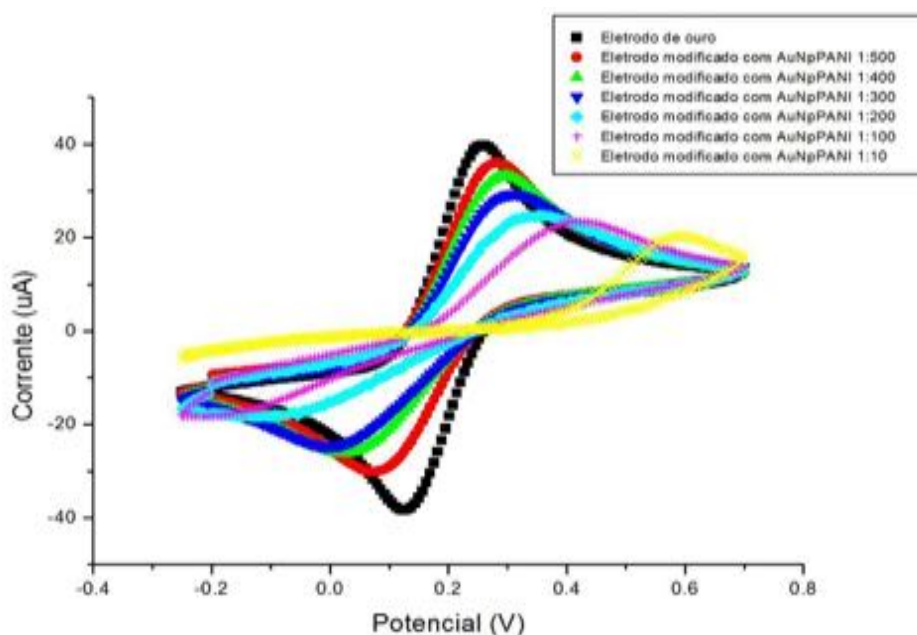


Figura 1. Voltamogramas cíclicos para o comportamento interfacial do AuNpPANI em função das diferentes diluições do nanocompósito em álcool etílico.

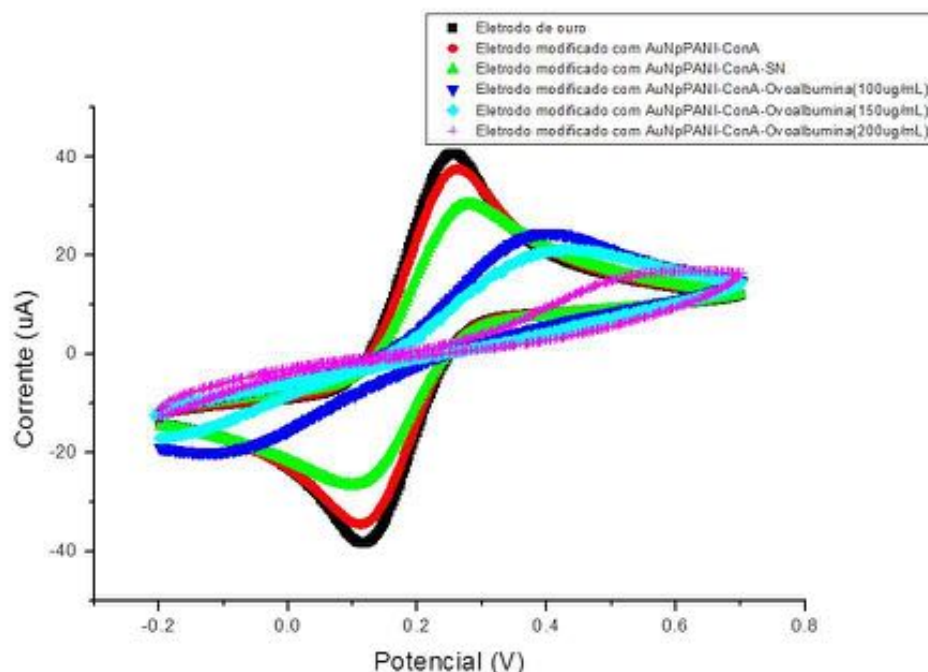


Figura 2. Estudo voltamétrico da bioatividade do sistema AuNpPANI-ConA frente ao soro biológico de pacientes sadios e a glicoproteína ovoalbumina em diferentes concentrações (100, 150 e 200 $\mu\text{g/mL}$).

CONCLUSÕES

A partir da caracterização voltamétrica pode-se concluir que a lectina ConA adsorvida em superfície modificada com o nanocompósito AuNpPANI retém sua capacidade de interação biospecífica frente à glicoproteína ovoalbumina. A sensibilidade do biossensor foi verificada ao obter perfis de reconhecimento para diferentes concentrações do analito em estudo. Por apresentar baixa resposta amperométrica após a exposição ao soro de indivíduos sadios, o sistema AuNpPANI-ConA poderá ser utilizado para detecção de moléculas patogênicas, processo essencial para diagnósticos clínicos.

AGRADECIMENTOS

CNPq, CAPES-Rede nanobio/ELINOR, FACEPE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] HULANICKI, A.; GEAB, S. & INGMAN, F. Chemical sensors: definitions and classification. **Pure & Appl. Chem.**, v. 63, p. 1247-1250, 1991.

[2] CAYGILL, R.L.; BLAIR, G.E. & MILLNER, P.A. A review on viral biosensors to detect human pathogens. **Analytica Chimica Acta**, v. 681, p. 8-15, 2010.

[3] LI, Y.; SCHLUESENER, H.J. & XU, S. Gold nanoparticle-based biosensors. **Gold Bulletin**, v. 43, p. 29-41, 2010.

[4] YÁÑEZ-SEDEÑO, P. & PINGARRÓN, J.M. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 382, p. 884-886, 2005.

[5] SHARON, N. & LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, p. 53-62, 2004.

[6] KENNEDY, J.F. et al. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p.219-230, 1995.

[7] SUMNER, J.S. & HOWELL, S.F. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with Concanavalin A. **Journal of bacteriology**, v. 32, n. 2, p. 227-237, 1936.



CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E REOLÓGICA DE UMA MICROEMULSÃO CONTENDO ANTIFÚNGICO DERIVADO DO TIOFENO

¹G.P. GUIMARÃES, ^{1,2}A.L.M. CAVALCANTI, ²M.Y.F.A. REIS, ^{1,2}Y.B.G. PATRIOTA, ^{1,2}N.E.S. SILVA, ³F.J.B. MENDONÇA-JR, ^{1,2}B.P.G.L. DAMASCENO, ^{1,2}J.A. SILVA.

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), 58429-600, Campina Grande-PB.

²UEPB, CCBS, Departamento de Farmácia, Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDCPF), 58429-600, Campina Grande-PB.

³Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas, UEPB, Campus V, João Pessoa/PB, Brasil

Introdução: Diversas substâncias ativas quando incorporadas em formas farmacêuticas convencionais não conseguem transpor adequadamente as barreiras biológicas do organismo. A 5CN05 é uma molécula com comprovada atividade antifúngica *in vitro*, mas que apresenta indicativos de baixa solubilidade e permeabilidade. Atualmente, tem-se dado ênfase a incorporação deste tipo de moléculas em sistemas coloidais como as microemulsões (ME). O presente trabalho teve por objetivo incorporar o 5CN05 em uma ME, bem como caracterizar físico-química e reologicamente as formulações. **Métodos:** Para caracterização da estrutura foram utilizados os métodos de microscopia de luz polarizada (MLP), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Os estudos reológicos avaliaram o comportamento de fluxo e o comportamento viscoelástico das ME. **Resultados e Discussão:** A formulação selecionada apresentava em sua composição LAS[®] (35,3%), Plurol Oleique[®] (17,5%), miristato de isopropila (5,9%) e água (41,2%). Através das análises de MLP, DSC e MET foi possível confirmar a estruturação do sistema como ME do tipo óleo em água (O/A). Reologicamente, a ME-5CN05 foi caracterizada como um fluido não-newtoniano, pseudoplástico, apresentando viscoelasticidade e comportamento de sólido elástico. **Conclusão:** As características físico-químicas e reológicas da ME-5CN05 a tornam um sistema promissor para aplicação tópica do antifúngico 5CN05.

Apoio: CNPq, CAPES, PROPESQ - 2011,2012, CERTIBIO - UEPB/UFCG.

Palavras-chave: Derivados do tiofeno; DSC; MET; Microemulsão; Reologia.



CORRELAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NO GENE DA IL22RA2 COM ATIVIDADE DA DOENÇA NA ESCLEROSE SISTÊMICA

²K.M. VILAR; ²M.C. PEREIRA; ²A.T. DANTAS; ¹I.R. PITTA; ³A. L. B. P. D. DUARTE; ²M. G. R. PITTA.

¹Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino, Universidade Federal de Pernambuco.

²Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas Suely Galdino, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco.

³Serviço de Reumatologia, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco.

RESUMO

Alterações genéticas nas citocinas ou em seus receptores podem contribuir para gravidade da doença Esclerose Sistêmica. O objetivo é identificar polimorfismos na IL22RA2 que aumentam o risco de desenvolver ES. Foram coletados 27 pacientes com ES e 54 controles, do Serviço de Reumatologia do HC-UFPE. Foram selecionados os seguintes SNPs (rs16829207, rs4292900, rs10794665). As análises de genotipagem foram de caso-controle utilizando foi o X^2 . Para SNP rs16829207 Odds_ratio (OR)=0.544, $p=0.17847$ para o alelo T. O rs4292900 OR = 1.618, $p=0.21942$ para o alelo T. No rs10794665 uma OR=0.725, $p=0.56408$, para o alelo G. Nossos resultados sugerem que o rs16829207 apresentou elevado nos pacientes com ES. Novos pacientes serão avaliados para aumentar o “n” dos casos e assim termos uma correlação com o risco de desenvolver a doença.

INTRODUÇÃO

A esclerose sistêmica (ES) é uma doença autoimune do tecido conectivo, rara e de causa desconhecida. É caracterizada por vasculopatia proliferativa e obliterativa de pequenos vasos, mecanismos autoimunes com produção de auto-anticorpos e lesão tecidual com ocorrência de fibrose (LeRoy EC *et. al.* 2001).

O dano cutâneo é caracterizado por espessamento, endurecimento e aderência aos planos profundos da pele. O acometimento visceral, que ocorre em graus variáveis, afeta predominantemente os pulmões, o trato gastrointestinal (TGI), o coração e, eventualmente, os rins. ES apresenta alta morbidade com um risco até 7 vezes maior de mortalidade em comparação com a da população geral (Ioannidis JP *et. al.* 2005).

A IL22 é uma citocina produzida pelas células Th17 e Th22, é membro da família IL10 e tem como função a defesa contra patógenos, cicatrização de feridas e remodelação tecidual. A IL22 vai exercer sua função a partir da sinalização que ocorre através da ligação da citocina com a um complexo heterodimérico constituído dos receptores IL10R2 e IL22R1(XIE MH *et.al.* 2000; KOTENKO SV *et. al.* 2001).

A subunidade IL22RA2 é um receptor solúvel de classe II. Esta proteína tem demonstrado possuir função de ligação específica a IL22, bloquear a interação de IL22 ao seu receptor de superfície celular e assim inibir a atividade da IL22. Assim, esta proteína funciona como um antagonista de IL22 e pode ter importância na regulação da resposta inflamatória (XU W. *et. al.* 2001).

Sendo assim as alterações genéticas em interleucinas ou seus receptores específicos podem alterar suas funções e, assim, contribuir para o agravamento da doença.

OBJETIVOS

Identificar polimorfismos no receptor da interleucina 22 (IL22RA2) que aumentam o risco de desenvolver ES e correlacionar o genótipo de IL-22 (IL22RA2) com os níveis séricos de IL-22 nos pacientes.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Recrutamento de pacientes e voluntários sadios

Foram coletados pelo Serviço de Reumatologia do HC da UFPE, 27 pacientes com diagnóstico de ES. O grupo controle formado por 54 pacientes voluntários saudáveis.

2. Coleta e armazenamento do material

Foram coletados 4 ml do sangue periférico, no Serviço de Reumatologia do HC da UFPE. O material coletado foi encaminhado ao Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas do Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica-Suely Galdino da UFPE. O DNA da amostra foi extraído e armazenado durante 5 anos.

3. Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada a partir da coleta de sangue periférico, colhidos em tubos com anticoagulante EDTA.

4. Critérios de seleção dos polimorfismos

Os polimorfismos foram selecionados levando em consideração a frequência do Alelo Menor (MAF) maior que 0,1 na população europeia CEU. Os SNPs presentes na

região promotora e nos exons forma selecionados através do site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Levando em consideração os SNPs genotipados e validados. Foram selecionados Selecionamos três SNPs para analisarmos sua influencia na susceptibilidade na ES: **rs10794665, rs16829207, rs4292900**.

5. RT-PCR

As amostras de DNA foram diluídas em DNA/RNase Free e foram utilizadas 165 µl do sistema de detecção TaqMan e 16,5 µl da sonda específica. As sondas utilizadas foram **rs10794665, rs16829207, rs4292900**.

6. Análise dos resultados

A análise da genotipagem foi do tipo caso-controle, o teste utilizado foi o qui-quadrado (X^2). Uma vez estabelecida à associação, o seu poder foi medido pela estatística do odds ratio. Foi utilizado o teste t não paramétrico de Mann-Whitney, e os valores de $p > 0,05$ serão considerados significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados que obtivemos das análises foi do tipo caso-controle, avaliando se os portadores de ES os controles estavam no equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os SNPs rs168 e rs107, apresentaram um $p < 0,05$, ou seja estão no equilíbrio de HW, o SNP rs42 apresentou um $p > 0,05$, indicando que a população não está em equilíbrio.

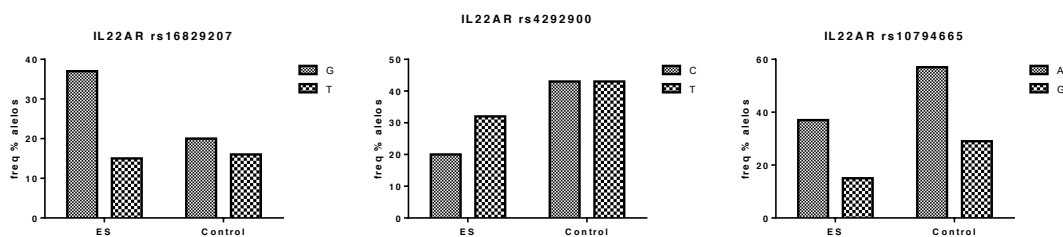
O teste Chi-square (X^2) foi realizado para avaliar as correlações caso-controle com os polimorfismos e encontramos para o SNP o Odds_ratio (OR) = 0.544, $\chi^2 = 1.81$, $p = 0.17847$ para o alelo T. Em relação ao SNP rs4292900 OR = 1.618, $\chi^2 = 1.51$, $p = 0.21942$ para o alelo T. Por sua vez, o SNP rs10794665 conferiu uma estimativa de OR = 0.725, $\chi^2 = 0.33$, $p = 0.56408$, para o alelo G.

Nas distribuições dos genótipos encontramos os seguintes resultados. Para os casos o n total de pacientes analisados foram 27, e nos controles tivemos 54 pacientes como na tabela a seguir.

Casos n=27	Genótipos	Genótipos	Genótipos	Controles n=54	Genótipos	Genótipos	Genótipos
	GG (12/44,44%)	GT (13/48,14%)	TT (1/3,70%)	rs168	GG (9/16,67%)	GT (2/3,70%)	TT (7/12,96%)
	CC (3/11,11%)	CT (14/51,85%)	TT (9/33,33%)	rs42	CC (14/25,92%)	CT (15/27,77%)	TT (14/25,92%)
	AA (12/44,44%)	AG (13/48,18)	GG (1/3,70%)	rs107	AA (21/38,88%)	AG (15/27,77%)	GG (7/12,96%)

1. Tabela dos genótipos dos SNPs : rs16829207, rs4292900, rs10794665.

Na frequência alélica encontramos os seguintes resultados: No rs16829207 alelo G está mais freqüente nos indivíduos portadores de ES do que nos controles. Quanto ao rs4292900 encontramos tanto o alelo C como o T maiores nos controles. No rs10794665 o alelo A está mais freqüente nos controles. Como demonstrado nos gráficos a seguir.



2. Frequência alélica dos SNPs: rs16829207, rs4292900, rs10794665.

CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem que o alelo G no SNP rs16829207 apresentou-se em maior proporção nos pacientes com ES. Esse resultado sugere que esse SNP pode estar associado ao risco de desenvolver esclerose sistêmica. Novos pacientes estão sendo avaliados para aumentar o “n” dos casos e assim termos uma melhor inferência das correlações com o risco de desenvolver a doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LeRoy EC, Medsger TA, Jr. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 2001.
2. Ioannidis JP, Vlachoyiannopoulos PG, Haidich AB, Medsger TA, Jr., Lucas M, Michet CJ, et al. Mortality in systemic sclerosis: an international meta-analysis of individual patient data. *Am J Med.* 2005.
3. Xie MH. *et al.* Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R. 2000.

4. Kotenko SV. *et al.* Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: The IL-10R2 chain (IL-10R-beta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complex. 2001.

5. Xu, W. *et al.* A soluble class II cytokine receptor, IL-22RA2, is a naturally occurring IL-22 antagonist. 2001.



DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR VOLTAMÉTRICO PARA *LEISHMANIA CHAGASI* BASEADO EM NANOCOMPÓSITOS

^{1*}M.F.K.S. GARCIA, ¹C.A.S. ANDRADE, ²V.Q. BALBINO, ¹J.F. DOS SANTOS,
¹D.S. GOMES, ³C.P. DE MELO, ^{1,4}M.D.L. OLIVEIRA

¹Laboratório de Biodispositivos nanoestruturados, Departamento de Bioquímica, UFPE. Email:
flaviaksg@hotmail.com

²Grupo de Bioinformática Aplicada à Genética, Departamento de Genética, UFPE

³Departamento de Física-UFPE

⁴Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, Departamento de Bioquímica-UFPE

RESUMO

O presente trabalho tem como principal objetivo estudar o processo de adsorção de primer de *Leishmania chagasi* sobre a superfície do nanocompósito de ouro de polianilina (NcAuPANi) para a detecção do genoma de *L. chagasi* isolado de cães infectados. A avaliação do sistema foi realizada através da técnica eletroquímica de voltametria cíclica para caracterizar as propriedades elétricas do sistema NcAuPANi-primer_{L.chagasi}. Os resultados demonstraram que o sistema NcAuPANi-primer_{L.chagasi} interagiu com o genoma do *L. chagasi* em diferentes concentrações sendo observada uma diminuição da resposta amperométrica total do sistema. Portanto, o sistema NcAuPANi-primer_{L.chagasi} é uma alternativa para a biodetecção de leishmaniose.

INTRODUÇÃO

A *Leishmania* é um gênero de protozoários da família Trypanosomatidae, que inclui os parasitas causadores das leishmanioses. A leishmaniose é transmitida ao homem por insetos vetores ou transmissores, conhecidos como flebotomíneos. A transmissão acontece quando uma fêmea infectada passa o protozoário a uma vítima sem a infecção, enquanto se alimenta de seu sangue (IOC/FIOCRUZ, 2013). É causada por espécies do gênero *Leishmania*, pertencentes ao complexo *donovani*. São reconhecidas três espécies como agentes etiológicos da doença destacando-se a *Leishmania chagasi* (REIS et al.; 2006).

Atualmente o número de cães infectados constitui um problema na transmissão da infecção para humanos (ALVES e BELIVALCQUA, 2004). Aspectos clínicos para o diagnóstico são de extrema importância devido à presença de sinais e sintomas inespecíficos em oligosintomáticos (TEIXEIRA-NETO et al., 2012). Além disso, vários testes como o ELISA, a imunofluorescência e ensaios imunocromatográficos destinam-se para o diagnóstico da leishmaniose visceral. No entanto, os testes supracitados apresentam como principais limitações a reação cruzada com outras parasitoses, e baixa

sensibilidade na detecção de casos assintomáticos (TEIXEIRA-NETO et al., 2012). Desta forma, o desenvolvimento de ferramentas de detecção da *L. chagasi* de forma rápida e sensível é de extrema importância, destacando-se o uso de nanopartículas metálicas para o desenvolvimento de biossensores impedimétricos e voltamétricos.

Desta forma, a modificação da superfície de eletrodos com nanopartículas metálicas tem levado ao desenvolvimento de vários sensores eletroquímicos. Em particular, as nanopartículas de ouro, tem sido intensamente investigadas para o desenvolvimento de eletrodos biossensíveis. (YU et al., 1997). Atualmente, nanocompósitos de ouro e polianilina (NcAuPANi) demonstram propriedades elétricas e ópticas diferenciadas (ANDRADE et al., 2008) que os tornam elementos essenciais para o desenvolvimento de sistemas biossensíveis mais seletivos para desenvolvimento de genossensores (NASCIMENTO et al., 2011).

O uso de NcAuPANi advém da possibilidade do uso deste sistema para imobilização de ácidos nucleicos na superfície do eletrodo. Desta forma, o NcAuPANi demonstra ser um bom candidato como matriz para o desenvolvimento de um genossensor de *L. chagasi*.

OBJETIVOS

O presente estudo possui como objetivo realizar uma avaliação voltamétrica da adsorção do primer LITSR para o desenvolvimento de um biossensor para o genoma de pacientes contaminados com *Leishmania chagasi*.

MATERIAIS E MÉTODOS

O eletrodo de ouro foi polido com alumina 0,5 μ m e sonificado por 1 minuto em água deionizada, e posteriormente seco com nitrogênio (N₂). Em seguida, o eletrodo de ouro foi submetido a um potencial de -0,2 V para torná-lo catódico por 2 min. Posteriormente, o eletrodo foi imerso no sistema NcAuPANI-PRIMER_{Leishmania} por 10min, em seguida removido e seco. Após obtenção do eletrodo modificado com NcAuPANI-PRIMER_{Leishmania}, este sistema foi submetido a incubação com o genoma de pacientes contaminados com genoma de *L. chagasi* diluídos em tampão fosfato de sódio pH 7,4. Os experimentos de voltametria cíclica (VC) foram realizados em um Potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT128N numa célula convencional de três eletrodos. O eletrodo de trabalho (ET) utilizado foi o de ouro modificado com o primer, o eletrodo de platina como contra eletrodo e o de referência será o Ag/AgCl saturado com KCl. As medidas de VC foram realizadas na mesma solução de ferro-ferricianeto de potássio com potenciais de -0,2 a 0,7V e velocidade de varredura de 50 mV (OLIVEIRA et al., 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A voltametria cíclica constitui uma técnica eficaz e versátil no estudo de mecanismos reacionais e análise no desenvolvimento de biossensores permitindo o estudo comparativo de materiais adsorvidos sobre o eletrodo.

Na Figura 1 demonstra as análises de VC das etapas de montagem do biossensor. Pode-se observar que a análise do eletrodo de ouro limpo (Au) revela um voltamograma característico de um processo limitado por difusão (OLIVEIRA et al., 2008), com uma boa separação das correntes de pico anódica (ipa) e catódica (ipc) referente ao par redox ferro/ferricianeto de potássio (Fig.1). Após a adsorção do composto AuNpPANI sobre a superfície do eletrodo Au foi observada uma queda da resposta amperométrica do sistema, o que reflete uma diminuição das ipa e ipc do sistema. Em adição, a Fig. 1 demonstra que após a interação do PRIMER *Leishmania*(LITSR) com o sistema AuNpPANI houve uma nova diminuição da resposta amperométrica do eletrodo. Este processo, advém da interação eletrostática entre os grupos fosfatos carregados negativamente da sonda com os grupos carregados positivamente do nanocomposto (NASCIMENTO et al., 2011).

Na Figura 2 podemos avaliar o processo a viabilidade da sonda LITSR imobilizada sobre o composto AuNpPANI para detecção do genoma de *Leishmania*. Pode-se observar o processo de interação do PRIMER-genoma de *Leishmania*, sendo evidenciado uma diminuição das ipa e ipc devido ao fenômeno de hibridização das fitas complementares (NASCIMENTO et al., 2011). Além disso, verifica-se que quando o sistema AuNpPANI-PRIMER_{LITSR} interagiu com o genoma concentrado houve uma queda aís pronunciada da resposta eletroquímica em relação à análise do genoma diluído. Este processo está relacionado a quantidade de moléculas disponíveis para a biointeração, onde quanto maior a concentração maior a probabilidade de interação.

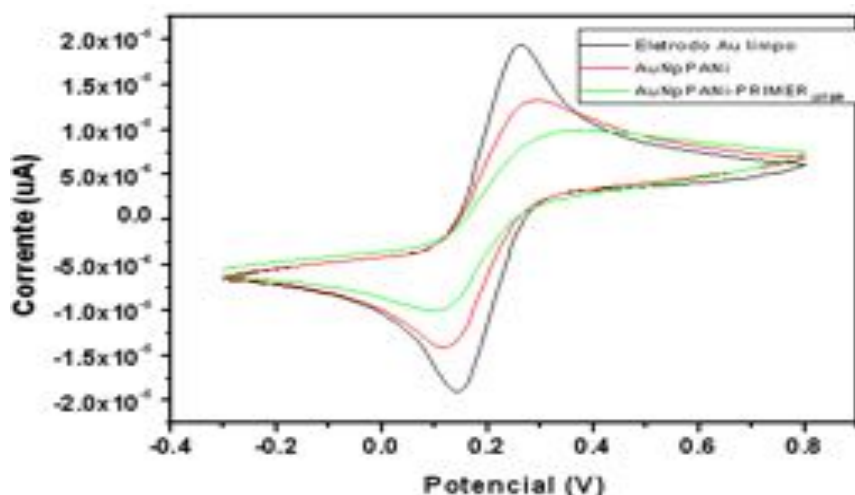


Figura 1- Voltamogramas cíclicos para as diferentes etapas de modificação do eletrodo de ouro.

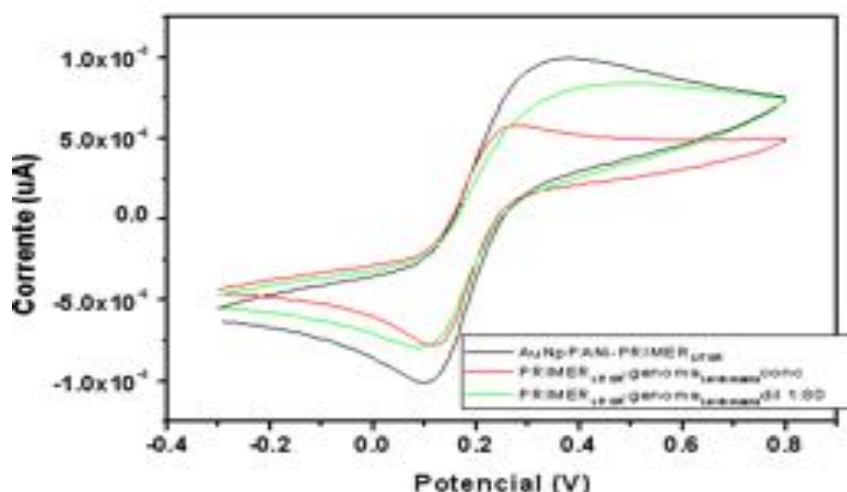


Figura 2- Voltamogramas cíclicos para avaliação da biodeteção do genoma de *Leishmania* pelo sistema AuNpPANi-PRIMER_{LITSR}.

CONCLUSÕES

Através dos resultados que foram obtidos pode-se concluir que o sistema NcAuPANi-primer_{L.chagasi} é uma alternativa viável para a biodeteção de leishmaniose.

AGRADECIMENTOS

FACEPE, CNPq e Rede Nanobiotecnologia-CAPES.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Vilela, M.; Mendonça, S.; **Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz)**, 2013.

Reis, A.B., Martins-Filho, O.A., Teixeira- Carvalho, Carvalho, M. G., Mayrink, W., França-Silva, J.C., Giunchetti, R.C., Genaro, O., Correa- Oliveira, R. **Res. Vet. Sci.** 81, 68,2006.

Alves, W. A., Bevilacqua, P. D. **Cadernos de Saúde Pública** 20, 259, 2004.

Teixeira-Neto, R.G., Giunchetti, R.C., Carneiro, C.M., Vitor, R.W., Coura-Vital, W., Quaresma, P.F., Ker, H.G., De Melo, L.A., Gontijo, C.M., Reis, A.B. **Vet. Paras.**, 11, 248, 2012.

Yu, YY., Chang, S.S., Lee, C.L., Wang, C.R.C. **J. Phys. Chem. B**, 101, 6661, 1997.

Andrade, C.A.S., Santos, C.G., de Melo, C.P. Compósitos de nanopartículas fluorescentes em si, processo para preparação dos mesmos e uso em sistemas de diagnóstico rápido com afinidade a moléculas biológicas. Nº 00184.2008.

Nascimento, H.P.O., Oliveira, M.D.L., De Melo, C.P., Silva, G.J.L., Cordeiro, M.T., Andrade, C.A.S. Coll. Surf. B, **Biointerfaces**, 86, 414, 2011.

Oliveira, M.D.L. Correia, M.T.S., Diniz, F.B. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2008, 66, 13.



DESENVOLVIMENTO DE UM SENSOR IMPEDIMÉTRICO UTILIZANDO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO PARA A DETECÇÃO DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS

¹C. V. J. OLIVEIRA; ¹J. M. NASCIMENTO; ¹M. D. L. OLIVEIRA; ²I. S. OLIVEIRA; ³C.P. DE MELO; ⁴O. L. FRANCO; ¹C. A. S. ANDRADE

¹Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco. E-mail: vinicius_jackes@live.com.

²Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco.

³Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco.

⁴Centro de Análise Proteômicas e Bioquímicas de Brasília, Universidade Católica de Brasília.

RESUMO

No presente trabalho, foi realizado um estudo eletroquímico para o desenvolvimento de um biosistema baseado em nanotubos de carbono (NTC) e clavanina A (clava) para utilização em diagnóstico de bactérias gram-negativas. As análises impedimétricas revelaram os parâmetros ideais para a montagem do eletrodo biossensível e a avaliação da bioatividade de *clavA* frente às bactérias *K. pneumoniae* e *S. typhimurium*. Desta forma, pode-se observar o potencial de aplicabilidade do sistema NTC-*clavA* para a construção de um sistema biossensível para o diagnóstico clínico de infecções bacterianas.

INTRODUÇÃO

Os biossensores são dispositivos que utilizam reações biológicas para detecção de analitos-alvo (PATHAK et al., 2007, WANG, 2000). Tais dispositivos combinam um componente biológico, que interage com um substrato alvo, a um transdutor físico, que converte os processos de biorreconhecimento em sinais mensuráveis. Diversos elementos podem ser utilizados na construção do sensor, sendo os mais utilizados, atualmente, os aptâmeros e nanomateriais (CALIL e SILVA, 2013). Dentre os nanomateriais, podemos destacar os nanotubos de carbono. Devido as suas características físico-químicas os NTC têm sido empregados na nanobiotecnologia para a construção de dispositivos sensores a partir da associação com moléculas biológicas de reconhecimento.

A clavanina A é uma isoforma do peptídeo antimicrobiano (PAM) da família das clavaninas, extraídas do tunicado marinho *Styela clava*, que tem como alvo as membranas

microbianas. Além disso, sua atividade antimicrobiana é devido a sua estrutura catiônica anfipática, a qual interage via atração eletrostática com lipídios aniônicos predominantes nas membranas dos microrganismos, seguida pela penetração na membrana, geralmente, resultando na formação poros o que acarreta em morte célula (MARTIN, GANZ e LEHRER, 1995, NIJNIK e HANCOCK, 2009).

As bactérias gram-negativas *Salmonella sp.* e *Klebsiella pneumoniae* são agentes infectantes importantes para o ser humano. A *Klebsiella pneumoniae* está relacionada a quadros de pneumonia lobar e tem sido causa importante de infecções hospitalares adquiridas, especialmente no período neonatal (GUPTA et al., 2003). Enquanto as bactérias do gênero *Salmonella sp.* são potentes agentes infectantes de alimentos.

OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo uma análise impedimétrica do eletrodo de ouro modificado com NTC e clava para biodeteção *K. pneumoniae* e *S. thyphimurium*.

MATERIAIS E MÉTODOS

As análises experimentais foram realizadas em um potenciostato/galvanostado μ AUTOLAB (Metrohm, Holanda) por meio de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), utilizando uma célula eletroquímica convencional contendo três eletrodos imersos em solução ferro-ferricianeto de potássio (DA SILVA et al. 2013). Os espectros de impedância foram registrados na faixa de frequências de 100 mHz a 100 kHz. A amplitude do potencial aplicado da onda sinusoidal foi de 10 mV. Antes das medidas, o eletrodo de trabalho com superfície ouro foi polido com alumina 0,5 μ M e sonificado em água deionizada por 2 minutos para limpeza. Inicialmente, o eletrodo foi imerso em tampão fosfato contendo cisteína (Cys) 10 mM por 10 minutos a temperatura ambiente para automontagem da Cys. Em seguida, o eletrodo modificado foi imerso em solução aquosa de 0.4 M de EDC (1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida) e 0.1 M de NHS (N-hidroxisuccinimida) numa proporção de 1:1 (v/v) durante 10 minutos. A adição dos NTCs funcionalizados ao sistema Cys-(EDC:NHS) foi realizada pelo método de *drop-coating*. Após 10 minutos da modificação com os NTCs, o eletrodo foi imerso em solução tampão contendo o PAM clavanina A (clavA) por mais 10 minutos. O sistema Cys-(EDC:NHS)-NTC-clavA foi exposto a amostra de *K. pneumoniae* e *S. thyphimurium* ambas a 10^6 cfu/ μ L através de *droap-coating*. Após 20 minutos, foi realizada a análise impedimétrica para avaliar sensibilidade do biossensor frente às amostras bacterianas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises impedimétricas das etapas de modificação do eletrodo podem ser observadas na Fig. 1a. Através dos Diagramas de Nyquist observamos um aumento do

diâmetro do semicírculo de Cole-Cole após a adição de todos os componentes do sistema, estando associado ao aumento da resistência de transferência de carga, devido à adsorção destes componentes. A adição de Cys permitiu a ligação dos resíduos sulfidríla (-SH) do aminoácido à superfície de ouro do eletrodo, facilitando as interligações entre os demais componentes das camadas adjacentes. O EDC:NHS foi utilizado como intermediário na montagem do biossistema, pois estes elementos permitem a estabilização e interação de biomoléculas e compostos não-orgânicos. Os NTC foram funcionalizados com resíduos carboxila (-COOH) para sua efetiva interação com a clavA.

Como pode ser observado na Figura 1b, após a exposição do sistema Cys-(EDC:NHS)-NTC-clavA às amostras bacterianas, foi observado um aumento no diâmetro do semicírculo de Cole-Cole, indicando que houve a ligação entre a clavA e as membranas bacterianas. Segundo a literatura, quando as bactérias são reconhecidas pelo PAM, a ligação irá ocorrer, levando a alterações nas propriedades dielétricas do sistema. Adicionalmente pode ser observada uma maior resposta frente a bactéria *K. pneumoniae*, este processo é devido às características dos lipídios de membrana dessas bactérias, considerando sua forma de disposição e eletronegatividade.

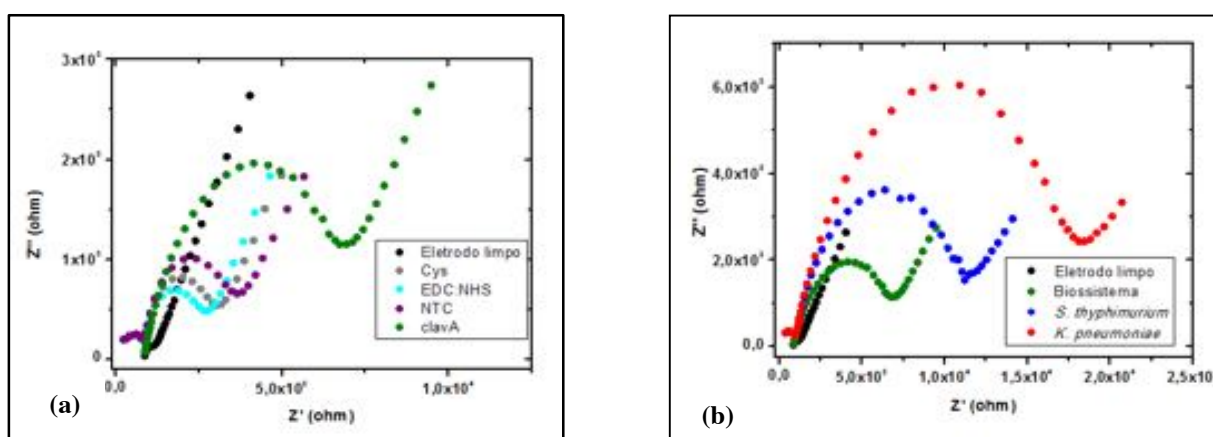


Figura 1. Etapas de modificação do biossensor (a) e resposta do biossensor frente às amostras bacterianas (b).

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, a montagem do biossistema ocorreu como esperado e foi capaz de detectar as bactérias gram-negativas, apresentando maior sensibilidade para a bactéria *K. pneumoniae*. Este comportamento advém das características da biomolécula utilizada e da célula bacteriana. Desta forma, o sistema NTC-clavA pode ser utilizado na construção de um biodispositivo rápido e eficiente para detecção de agentes infecciosos de interesse clínico.

AGRADECIMENTOS

FACEPE, CNPq, CAPES-Rede nanobio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CALIL, S. S., SILVA, P. R. Q. **Biossensores: estrutura, funcionamento e aplicabilidade**. Brasília. [entre 2010 e 2013]. Disponível em : <<http://www.cpgls.ucg.br/6mostra/artigos/SAUDE/SIMONE%20SAAD%20CALIL%20PAULO%20ROBERTO%20QUEIROZ.pdf>> acesso em 10 de out. de 2013.
2. DA SILVA, G. J. L., ANDRADE, C. A. S., OLIVEIRA, I. S., DE MELO, C. P., OLIVEIRA, M. D. L. **Impedimetric sensor for toxigenic penicillium sclerotigenum detection in yam based on Fe₃O₄-Poly(allylamine hydrochloride) composite**. Journal of Colloid and Interface Science (2013) 396, 258-263.
3. GUPTA, A., AMPOFO, K., RUBENSTEIN, D., SAIMAN, L. **Extended Spectrum β Lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* Infections: a Review of the Literature**. Journal of Perinatology (2003) 23, 439–443.
4. NAYAK, M. et al. **Detection of microorganisms using biosensors—A smarter way towards detection techniques**. Biosensors and Bioelectronics. 25 (2009) 661–667.
5. MARTIN, E., GANZ, T., LEHRER, R.I. **Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates**. J. Leukoc. Biol. 58(2), 128, 1995.
6. NIJNIK, A., HANCOCK, R.E.W. **Host defence peptides: antimicrobial and immunomodulatory activity and potential applications for tackling antibiotic-resistant infections**. Emerg. Health Threats J. 2(e1), 1, 2009.
7. PATHAK, P., KATIYAR, V. K., GIRI, S. **Cancer Research - Nanoparticles, Nanobiosensors and Their Use in Cancer Research**. Azojono Journal of Nanotechnology Online, v.3, set 2007.

8. WANG, J. **From DNA Biosensors to Gene Chips**. *Nucleic Acids Research*, v.28, n.16, p.3011-3016, 2000.



DESENVOLVIMENTO E IMPLEMENTAÇÃO DE SOFTWARE PARA MODELAGEM MOLECULAR EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA: O PROGRAMA GRIDOMOL

Luiz Felipe G. R. Ferreira, Klaus R. Cavalcante, Marcelo Z. Hernandes

Laboratório de Química Teórica Medicinal, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco.

RESUMO

Estima-se que o uso de métodos computacionais pode reduzir os custos e o tempo de desenvolvimento de um novo fármaco em até 50%^{1,2}. Isto acontece pois, muitas vezes, o número de moléculas que precisam ser sintetizadas e testadas experimentalmente passa a ser drasticamente reduzido por conta da alta preditividade e confiabilidade dos métodos *in silico*. Ocorre que estes métodos podem apresentar uma alta demanda computacional quando o número de moléculas a serem testadas é alto e quando se busca alta precisão nos resultados. Ao utilizar a plataforma GriDoMol, que faz uso de grid computacional, o tempo necessário para a realização de 500 cálculos de docking molecular foi reduzido em até 97% do tempo necessário, quando comparado a não utilizar nenhuma estratégia de computação distribuída.

INTRODUÇÃO

A modelagem molecular de fármacos está associada ao estudo de estruturas e propriedades químicas de moléculas de interesse farmacêutico, através de procedimentos computacionais. Estima-se que a utilização de métodos *in silico* no planejamento de fármacos pode reduzir os custos e o tempo de desenvolvimento de um novo fármaco em até 50%^{1,2}. Isto ocorre porque o número de moléculas que precisam ser sintetizadas e testadas experimentalmente, particularmente através de ensaios *in vitro* e *in vivo*, passa a ser reduzido por conta da alta preditividade e da confiabilidade dos métodos computacionais, em termos qualitativos e quantitativos.

O procedimento de *docking* molecular³ busca pela posição e orientação que maximiza as interações intermoleculares entre o ligante (candidato a fármaco) e o receptor (alvo biológico/farmacológico), com o intuito de formar um complexo por complementaridade estrutural e por estabilização energética. Geralmente, o estudo de *docking* ocorre na situação onde se conhece a estrutura tridimensional do alvo biológico/farmacológico. Desta forma, pode-se descobrir o ligante mais adequado, sendo necessária a realização de *docking* molecular em larga escala (*virtual screening*)⁴.

Ocorre que estes métodos podem apresentar uma alta demanda computacional, quando o número de moléculas a serem testadas é alto e quando se busca alta precisão numérica, ou resultados a nível de predição quantitativa. Desta forma, o uso de poderosas infraestruturas computacionais⁵⁻⁹ reduz significativamente o tempo total necessário para obtenção dos resultados.

A meta deste presente trabalho é desenvolver e disponibilizar uma plataforma unificada para execução de cálculos de *docking* (ou *virtual screening*).

OBJETIVOS

Geral

- Desenvolvimento e a implementação de um software (GriDoMol) para aplicação de *grids* computacionais em modelagem para inovação terapêutica.

Específicos

- Implementação do programa GriDoMol para gerenciar os cálculos de *docking* molecular utilizados em inovação terapêutica. Desenvolvimento de versões para outros sistemas operacionais, como o Linux.
- Desenvolvimento de uma interface gráfica de usuário (GUI) amigável e intuitiva, com o propósito de aumentar a interatividade com o usuário.
- Quantificação do ganho de desempenho obtido ao empregar a plataforma de *grid* computacional através da análise quantitativa (“*benchmark*”).
- Tornar o GriDoMol uma plataforma unificada para a execução de cálculos de *docking* molecular de forma distribuída em um ambiente de *grid* computacional, buscando responder aos desafios encontrados na inovação terapêutica através da utilização de estratégias de alto desempenho computacional.

MATERIAIS E MÉTODOS

O programa GriDoMol foi desenvolvido na linguagem de programação C++ utilizando a biblioteca de desenvolvimento QT¹⁰, amplamente utilizada no mundo acadêmico e comercial. A plataforma de *grid* computacional escolhida foi o OurGrid¹¹, por ser adequado para aplicações onde as tarefas têm independência temporal e lógica entre si. A escolha do programa AutoDock^{12,13} se deve ao fato dele ser amplamente empregado no meio acadêmico, uma vez que é *open source* (“código aberto”) e fornece bons resultados.

Os cálculos de *docking* foram executados em um *grid* computacional homogêneo (2x Intel Xeon quadcore, 16GB RAM, Ubuntu).

O conjunto de moléculas escolhido para os testes está bem estabelecido na literatura¹⁴. Um subconjunto de 50 receptores biológicos e seus respectivos ligantes foi selecionado para a realização dos cálculos de *docking* molecular. Para obter maior

demanda computacional e possibilitar melhores comparações de desempenho, cada cálculo individual de *docking* para um complexo foi repetido 10 vezes, totalizando um conjunto de 500 cálculos de *docking* molecular.

Embora o programa AutoDock não possua recursos internos de paralelização de cada cálculo a nível de núcleos de processamento, utilizou-se a estratégia de enviar mais de uma instância de execução do programa AutoDock para cada máquina, para se obter este efeito de processamento em paralelo no âmbito dos núcleos (*cores*) de cada computador. Para avaliar o ganho de desempenho, o número de máquinas utilizadas durante os testes variou sequencialmente entre 1 e 6 enquanto o número de instâncias de execução enviadas para cada máquina variou assumindo os valores 1, 2, 4 e 8.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As principais funcionalidades que podem ser observadas na plataforma GriDoMol são: i) configurar o grupo de máquinas que farão parte do ambiente *grid* computacional; ii) criar ou carregar os arquivos de *setup* do GriDoMol, com informações sobre as moléculas (Figura 1a); iii) criar o arquivo JDF utilizado para submeter os cálculos de forma distribuída (Figura 1a); iv) submeter o conjunto de cálculos para o grid computacional, que se encarrega de distribuir os cálculos de *docking* de forma otimizada entre as máquinas disponíveis; v) monitorar o andamento dos cálculos submetidos ao grid computacional (Figura 1b).

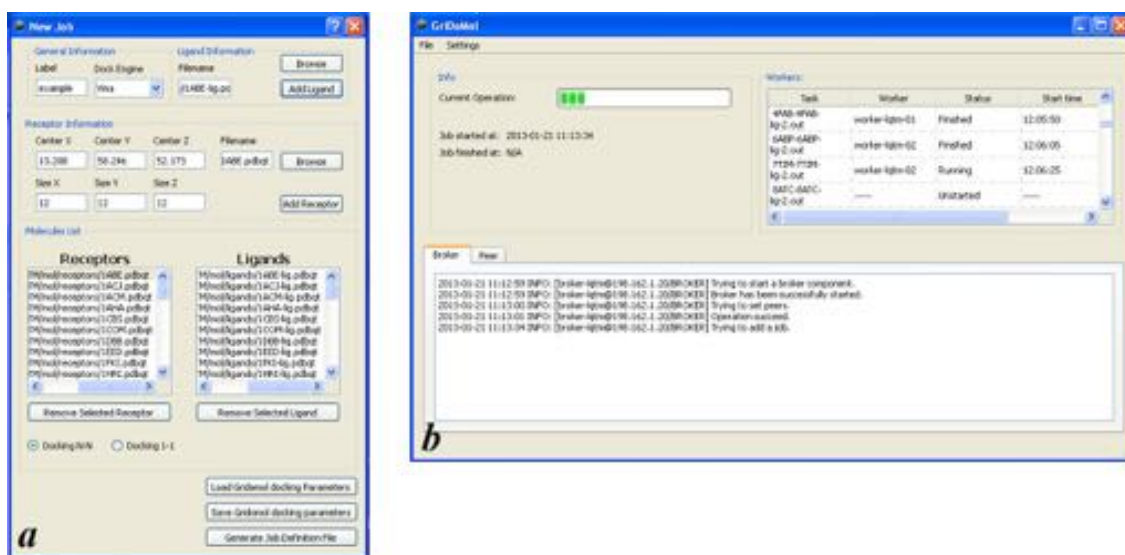


Figura 1 – Principais telas do GriDoMol. (a) Tela inicial, responsável pelo gerenciamento do conjunto de cálculos. (b) Tela para criação do conjunto de cálculos de *docking* molecular.

Pode-se observar na Figura 2, que ao serem utilizadas mais máquinas, ao invés de mais instâncias de execução, o processo mostrou-se mais eficiente, levando menor quantidade de tempo total. Por exemplo, a utilização de 4 máquinas ($x = 4$) e apenas 1 instância de execução (E1, 41.976 segundos) é mais eficiente do que 1 máquina ($x = 1$) e 4 instâncias de execução (E4, 67.056 segundos).

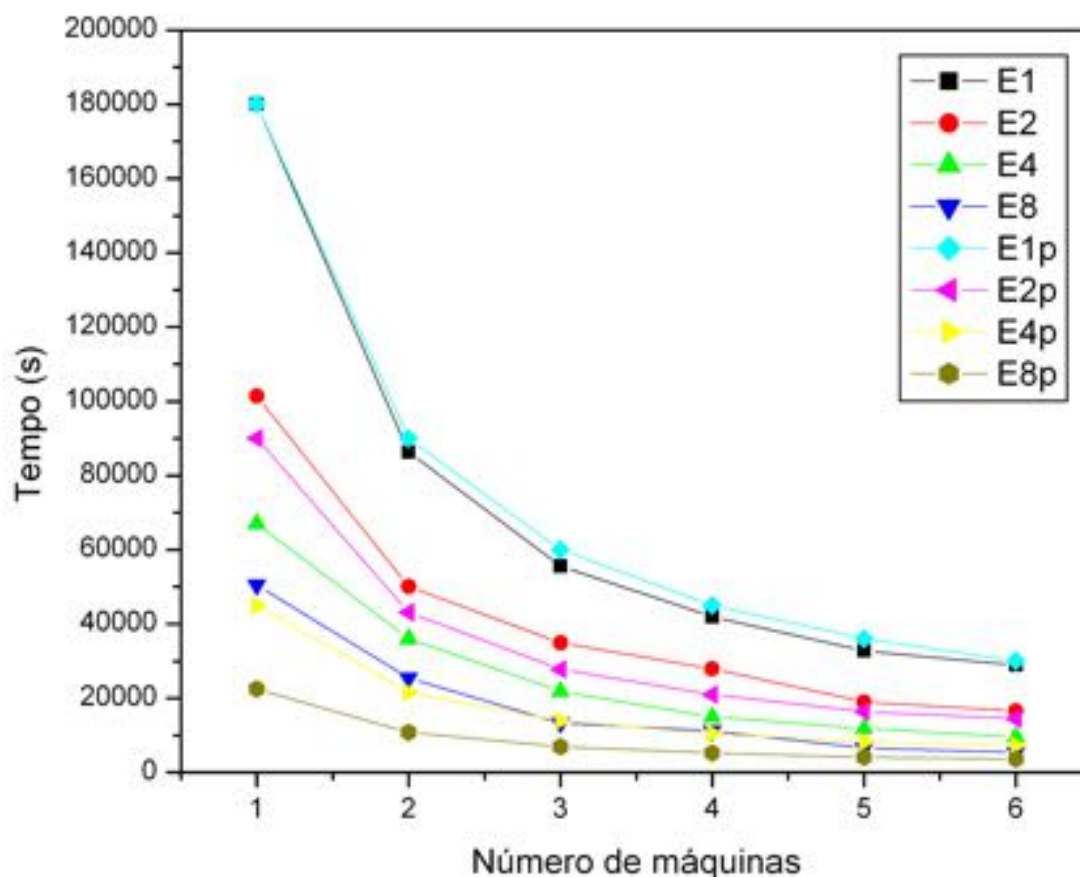


Figura 2 - Gráfico de desempenho do GriDoMol. As curvas com a legenda Ex (x = número de núcleos de processamento utilizados) se referem aos valores observados enquanto as curvas no formato Exp representam os valores preditos.

Em plena capacidade de paralelização ou distribuição de tarefas com o GriDoMol, a redução total no tempo de execução foi de cerca de 97% (5.338 segundos) em relação ao tempo necessário para o cálculo feito com apenas uma máquina e uma instância de execução do programa AutoDock (180.063 segundos). Desta forma, o ganho máximo de desempenho com o GriDoMol, neste caso, foi de até 33,73 vezes.

CONCLUSÕES

O aumento de desempenho obtido com as estratégias de paralelismo, no nível de máquinas do grid computacional e no nível de instâncias de execução, foi de quase 34 vezes. Desta forma, o tempo necessário para a realização de 500 tarefas de *docking* foi reduzido em cerca de 97%. Vale ressaltar que este ganho de desempenho foi observado como praticamente linear em termos de velocidade dos cálculos. Portanto, ao serem adicionadas mais máquinas ao *grid* computacional, acreditamos que seria possível obter desempenhos ainda melhores de redução de tempo total para a realização do conjunto de cálculos.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo auxílio financeiro a este trabalho através da concessão da bolsa de estudos (L.F.G.R.F.).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) 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.
- (2) MCGEE, P. (2005). **Modeling success with in silico tools**. Drug Discovery & Development. 8, 24.
- (3) LENGAUER, T.; RAREY, M. Computational methods for biomolecular docking. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 6, n. 3, p. 402-406, Jun 1996. ISSN 0959-440X.
- (4) BUYYA, 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.
- (5) 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.
- (6) ZHANG, S. X.; KUMAR, K.; JIANG, X. H.; WALLQVIST, A.; REIFMAN, J. DOVIS: an implementation for high-throughput virtual screening using AutoDock. **Bmc Bioinformatics**, v. 9, Feb 2008. ISSN 1471-2105.
- (7) 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.
- (8) DOMINGUEZ, C.; BOELEN, R.; BONVIN, A. HADDOCK: A protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 7, p. 1731-1737, Feb 2003. ISSN 0002-7863.
- (9) 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.

- (10) QT – A cross-platform application and UI framework (2012). Disponível em: <<http://qt.digia.com/>>. Acessado em Julho de 2012.
- (11) 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
- (12) 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.
- (13) 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.
- (14) KELLENBERGER, E.; RODRIGO, J.; MULLER, P.; ROGNAN, D. Comparative evaluation of eight docking tools for docking and virtual screening accuracy. **Proteins-Structure Function and Bioinformatics**, v. 57, n. 2, p. 225-242, Nov 2004. ISSN 0887-3585.



**DESNUTRIÇÃO MATERNA, EM RATOS, AUMENTA ESTRESSE
OXIDATIVO PLACENTÁRIO ATRAVÉS DE PROSTANOIDES PRODUZIDOS
PELA CICLOOXIGENASE-2**

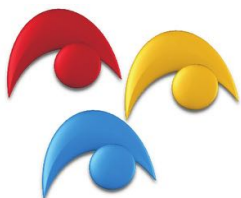
**R.S. AIRES, L.D. VIEIRA-FILHO, N.E. RIBEIRO, D.R.M. GONÇALVES,
A.D.O. PAIXÃO**

Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Renal, Departamento de Fisiologia e Farmacologia,
Universidade Federal de Pernambuco. reginasouzaaires@gmail.com

Introdução: A desnutrição materna eleva o estresse oxidativo placentário que pode comprometer o desenvolvimento fetal. De forma geral, o estresse oxidativo apresenta-se positivamente correlacionado com a produção de prostanoídes que tem origem a partir da ciclooxigenase-2 (COX-2), entre outras enzimas. Investigamos a hipótese de que a inibição seletiva da COX-2, através da nimesulida, previne a elevação do estresse oxidativo placentário e reduz sequelas no desenvolvimento fetal. **Métodos:** Ratas prenhes, mantidas com dieta padrão *ad libitum* ou com 50% de restrição dietética, foram tratadas com nimesulida, a partir do 7º dia de prenhez até o parto. A peroxidação lipídica foi mensurada através dos níveis de malondialdeído (MDA) e dos níveis de glutatona reduzida (GSH). **Resultados e Discussão:** A restrição dietética elevou os níveis de MDA, diminuiu os níveis de GSH e diminuiu a massa placentária, mas não alterou parâmetros de volemia maternos, os quais poderiam influenciar o desenvolvimento fetal. A restrição dietética também reduziu o peso fetal. O tratamento com nimesulida preveniu a elevação dos níveis de MDA e a diminuição dos níveis de GSH, bem como a redução da massa placentária. O tratamento com nimesulida também preveniu a diminuição de peso fetal. **Conclusão:** A nimesulida, como ferramenta farmacológica, permitiu elucidar que produtos da COX-2 estão envolvidos na peroxidação lipídica induzida pela desnutrição materna. No entanto, embora tenha prevenido a redução de peso fetal, produzida pela desnutrição materna, não pode representar uma ferramenta para prevenir distúrbios produzidos pelo ambiente materno, uma vez que a enzima COX-2 é constitutivamente expressa durante o desenvolvimento de alguns órgãos, como o rim.

Apoio: CAPES, CNPq, FACEPE.

Palavras-chave: Desnutrição intrauterina, estresse oxidativo, placenta, COX-2, nimesulida.



DETECÇÃO DE LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE (LDL) ATRAVÉS DE ANTICORPO MONOCLONAL EM BIOSISTEMA COMPOSTO POR POLIVINIL FORMAL E NANOPARTÍCULAS DE OURO

^{1,2}E.M.N. EGITO, ^{1,3}M.D.L. OLIVEIRA, ^{1,2}C.A.S. ANDRADE

¹Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados – Bionano, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco. eltonegito@yahoo.com.br

²Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco.

³Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco.

RESUMO

Foi investigada a bioatividade do anticorpo monoclonal (anti-LDL), imobilizado em matriz composta por polivinil formal (PVF) e nanopartículas de ouro (nanoAu), frente a amostras de soro humano. A caracterização eletroquímica do sistema foi obtida através da espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e voltametria cíclica (VC), para avaliação dos níveis de colesterol LDL. Os resultados demonstraram que o sistema PVF_nanoAu fornece uma excelente superfície para adsorção do anti-LDL que, por sua vez, exibiu diversos padrões de reconhecimento, apresentando um limite de detecção em 10mg/dL. Portanto, verifica-se o grande potencial de aplicabilidade do biosistema composto por PVF_nanoAu_Anti-LDL para o desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico para aplicação em análises clínicas.

INTRODUÇÃO

As lipoproteínas plasmáticas são partículas constituídas por uma parte central de lipídios hidrofóbicos, circundados por uma monocamada de lipídios polares e apoproteínas (Siqueira *et al*, 2006). São sintetizadas e secretadas pelo fígado (VLDL), intestino (quilomícrons), ou resultam de transformações sofridas por estas partículas, como é o caso da IDL (lipoproteína de densidade intermediária), LDL e HDL (Siqueira *et al*, 2006). A LDL, uma vez oxidada, tem aumento da carga negativa na sua superfície, sendo responsável pelo dano endotelial observado em pacientes acometidos pelo excesso de sua concentração plasmática (Siqueira *et al*, 2006). Sua patogenicidade se dá, portanto, após o processo oxidativo.

O aumento da concentração da LDL é um importante fator de risco para doença arterial coronariana (DAC) (Mykkanen *et al*, 1999). Além disso, a DAC é uma das principais causas de mortalidade não somente nos países desenvolvidos, mas também em alguns países em desenvolvimento (Cheng *et al*, 2005).

Atualmente, a quantificação sérica da LDL se dá, em sua maioria, por técnicas espectrofotométricas que utilizam o anticorpo monoclonal anti-LDL como biomolécula

de reconhecimento, através de um princípio denominado turbidimetria. A adsorção de anticorpos monoclonais anti-LDL em diferentes substratos, tem sido largamente estudada no intuito do desenvolvimento de imunossensores “*point of care*”, com aplicação em análises clínicas (Ahmadrajia e Killard, 2013).

Atualmente, a aterosclerose é considerada uma doença crônica degenerativa, que quando não diagnosticada pode acarretar em injúria miocárdica, podendo evoluir ao infarto agudo do miocárdio. Desta forma, se evidencia a procura por métodos capazes de detectar com rapidez e sensibilidade as moléculas de LDL, melhorando o prognóstico do paciente.

OBJETIVOS

O presente estudo possui como objetivo analisar a interação do anticorpo monoclonal anti-LDL imobilizado em filme de PVF_nanoAu e avaliar sua capacidade de reconhecimento frente a LDL de amostras sanguínea humana.

MATERIAIS E MÉTODOS

A análise eletroquímica foi realizada através de um Potenciostato/Galvanostato Autolab 128N. As medidas voltamétricas (VC) e de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foram realizadas numa célula eletroquímica convencional de três eletrodos imersos em 20 mL de solução 10mM de ferro-ferricianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]$ / $K_3[Fe(CN)_6]$ (1:1)) atuando como sonda redox. O eletrodo de trabalho utilizado foi o eletrodo de ouro modificado, o eletrodo de referência foi de Ag/AgCl saturado com KCl e o contra-eletrodo foi de platina. As análises de VC foram realizadas em diferentes etapas de construção do biosistema com potencial de varredura fixo de -0,2 a 0,7 V, em temperatura ambiente. Os espectros da EIE foram obtidos numa faixa de frequência entre 100 mHz a 100 KHz com um potencial de amplitude alternada de 10 mV. A superfície eletroativa de ouro foi polida em um disco de feltro com uma suspensão de alumina e, em seguida, lavada com água deionizada e submetida à sonicação por 5 minutos para remoção de partículas residuais. Foram realizadas análises eletroquímicas do polivinil formal (PVF) em função do tempo de adsorção (5, 10, 15, 20 e 25 minutos). Posteriormente, foi realizada uma mistura de 1mL de PVF (0,1%) com 150 μ L da nanoAu. O sistema PVF_nanoAu foi adsorvido sobre a superfície do eletrodo de ouro por incubação por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado 1 μ L do anticorpo anti-LDL sobre a superfície do eletrodo modificado com o sistema PVF_nanoAu por 10 minutos. Finalmente, o sistema PVF_nanoAu_Anti-LDL, foi exposto a amostras de sangue periférico humano com diferentes concentrações do colesterol LDL (10, 40, 70, 100 e 130 mg/mL). Após cada etapa de modificação do eletrodo, foram realizadas análises de VC e EIE, respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Fig. 1 demonstra o perfil de adsorção do sistema PVF_nanoAu em diferentes tempos de incubação. Os dados de voltametria cíclica (Fig. 1a) revelou que, com o aumento do tempo de incubação ocorreu um bloqueio na transferência de elétrons, sendo observada uma queda nas correntes de pico anódicas (ipa) e catódicas (ipc), assim como uma redução da área dos voltamogramas.

A Fig. 1b reflete que os dados de EIE estão de acordo com a análises de VC, sendo observado um aumento gradativo da resistência de transferência de carga (R_{TC}) com o passar do tempo.

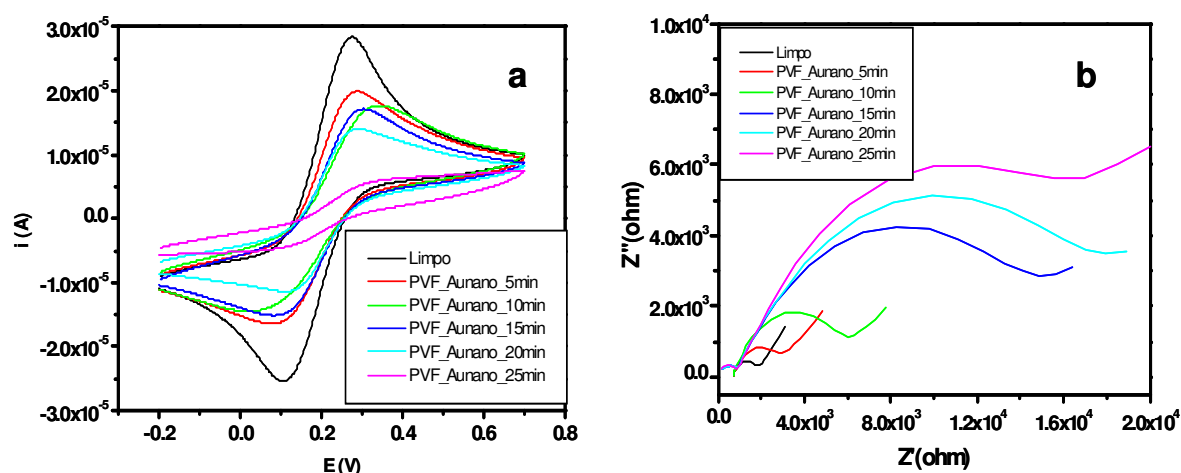


Figura 1. Análise eletroquímica em função do tempo do sistema contendo PVF e nanopartículas de ouro (nanoAu).

A Fig. 2 demonstra todo o processo de montagem do biossistema PVF_nanoAu_anti-LDL. As análises voltamétricas (Fig. 2a) mostram que após a interação do Biossistema PVF_nanoAu_antiLDL com os soros de LDL (10-130 mg/dL) foi observado um bloqueio quase que total da resposta amperométrica do sistema na concentração de 130 mg/dL.

Pode-se observar que o sistema proposto apresenta boa sensibilidade. O gráfico de Nyquist (Fig. 2b) mostra o aumento gradativo da resistência de transferência de carga após o processo de biointerção. A resposta impedimétrica do sistema PVF_nanoAu_antiLDL apresentou um de $R_{TC}=3,4$ k Ω e após a interação anticorpo-antígeno houve um incremento da resposta impedanciométrica, revelando um de $R_{TC}=9,8$ k Ω para a concentração de 130 mg/dL. O biossistema apresentou um valor relativo de R_{TC} em 188%, o que reflete uma boa eficiência do sistema proposto.

Os resultados obtidos neste trabalho reflete a possibilidade de detecção de colesterol LDL por meio das técnicas eletroquímica VC e EIE. Pode-se observar também que outros autores mostram a viabilidade do uso de técnicas espectroscópicas como a espectroscopia de ressonância de plásmons para análise de LDL (Snellings *et al.*, 2004).

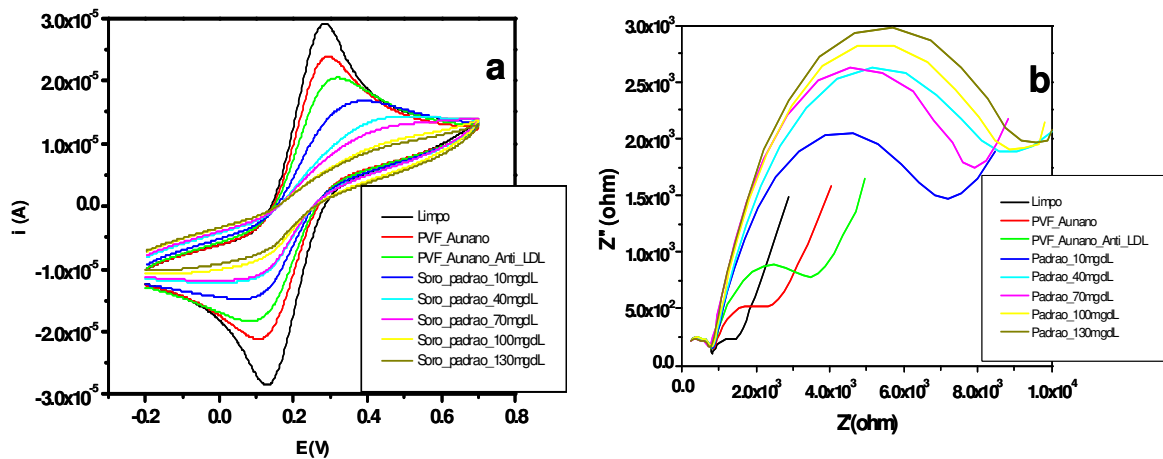


Figura 2. Análise eletroquímica do sistema PVF_nanoAu_anti-LDL frente às amostras sanguíneas contendo distintas concentrações do colesterol LDL (10, 40, 70, 100 e 130 mg/dL).

CONCLUSÕES

Um biosistema baseado na imobilização de anticorpo monoclonal anti-LDL em superfície de eletrodo de ouro contendo polivinil formal e nanopartículas de ouro foi obtido com êxito. As análises eletroquímicas revelam a influência do tempo sobre o período de incubação do eletrodo ao sistema PVF_nanoAu. O anticorpo anti-LDL demonstrou ser suficiente para o processo de biodetecção de lipoproteína de baixa densidade (LDL) contidas nas amostras de soro humano. O sistema PVF_nanoAu_Anti-LDL, conseguiu detectar níveis muito baixo de LDL (10mg/dL) apresentando e demonstrando uma boa sensibilidade.

AGRADECIMENTOS

FACEPE, Rede Nanobiotecnologia-CAPES, CNPq e Laboratórios Gilson Cidrim LTDA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMADRAJIA, T.; KILLARD, A. J. The evolution of selective analyses of HDL and LDL cholesterol in clinical and point of care testing. **Analytical Methods**, v.5, p.3612-3625, 2013.

CHENG, O. Genetic variation of low-density lipoprotein-cholesterol and its clinical implications. **Chinese Medical Journal**, v.118 p.355–359, 2005.

HORKKO, S. et al. Immunological responses to oxidized. **Free Radical Biology and medicine**, v.28, p.1771-1779, 2000.

MYKKANEN, J. K. et al. LDL size and risk of coronary heart disease in elderly men and women. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.19 p.2742-2748, 1999.

ROSS, R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. **New England Journal of Medicine**, v.340, p.115-26, 1999.

SIQUEIRA, A. F. A.; ABDALLA, D. S. P.; FERREIRA, S. R. G. LDL: da Síndrome Metabólica à Instabilização da Placa Aterosclerótica. **Arquivos Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v.50, p.334-343, 2006.

SNELLINGS, S. et al. An acoustic wave biosensor for human low-density lipoprotein particles: construction of selective coatings. **Biosensors and Bioelectronics**, v.19, p.353-363, 2004.

YAN, W. et al. Fabrication of a label-free electrochemical immunosensor of low-density lipoprotein. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.112, p.1275-1281, 2008.



DETECTION OF CAPSID PROTEIN OF PORCINE *Circovirus* TYPE 2 IN THE SUPERNATANT OF *Pichia pastoris* AND ITS USE AS RECOMBINANT ANTIGEN

¹ J.G. SILVA, ¹ E.C. COIMBRA, ¹ A.L.S. JESUS, ¹ F.C. MARIZ, ² A.C. CAMPOS, ² L.C.A. COUTINHO, ³ Z.I.P. LOBATO, ² R.S. CASTRO, ¹ A.C. FREITAS

¹ Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco. jackygs@gmail.com

² Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco

³ Laboratório em Pesquisa de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Minas Gerais

ABSTRACT

Porcine circovirus type 2 (PCV2) is associated with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). The capsid (Cap) protein of PCV2 is a leading antigen candidate for the development of vaccine and serological diagnostic test. In this study, the codon optimized PCV2 Cap gene was cloned into pPICZ α A vector for secretory expression in yeast *Pichia pastoris*. After the optimization, the difference between the codon usage of the Cap gene and *P. pastoris* was reduced to 10%. The recombinant Cap (rCap) protein was detected by western blot and was used as coating antigen in the ELISA test, using serum of swine which was naturally infected with PCV2. Thus, the *P. pastoris* expression system was feasible for the production of an immunoreactive PCV2 rCap protein.

INTRODUCTION

Porcine circovirus type 2 (PCV2) is one of the most important pathogens for swine in many countries (Gillespie et al. 2009). This virus is linked to a set of diseases known as "Porcine Circovirus Associated Diseases" (PCVAD) and include Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) (Rose et al. 2012). PMWS is one of the most important porcine diseases worldwide and responsible for serious economic effects on the swine industry (Darwich and Mateu, 2012).

The PCV2 genome consists of three open reading frames (ORF): ORF1 encodes the Rep proteins involved in viral replication, ORF2 encodes a major capsid protein (Cap) and ORF3 encodes a protein that induces apoptosis (Liu et al., 2006). This protein (Cap) contains a high level of conserved epitopes and induces a strong immune reaction against sera from PCV2-positive animals (Blanchard et al. 2003).

The *Pichia pastoris* expression system has been widely used for the production of recombinant proteins, either secreted or in an intracellular form (Cregg et al. 2000). This system was chosen since it offers several advantages, including the ability to be cultivated at high density and the possibility to introduce typical eukaryotic post-translational modifications and due secretes a few native proteins, facilitating the purification process of the recombinant products (Hu et al. 2011).

It is known that the use of recombinant antigens in serological diagnosis has significant benefits because they are cheap, easy to produce, and their antigenicity can be reliably established (Wu et al. 2008). Several ELISA have been carried out based on the recombinant protein as coating antigen for detecting PCV infection (Yin et al. 2010; Wu et al. 2008).

In this study, we report the production of the PCV2 recombinant capsid (rCap) protein in the supernatant of yeast *P. pastoris*, and test the bioactivity of the rCap in ELISA.

OBJECTIVES

- Codon-optimize the PCV2 Cap gene for expression in *Pichia pastoris*
- Produce and secrete the rCap protein from *P. pastoris* culture
- Analyse the immunoreactivity of rCap using sera from PCV2-positive animals

MATERIALS AND METHODS

Codon-optimization and Cloning of Cap gene: PCV2 Cap gene was synthesized with adjustment of GC content and codon-optimized for expression in *Pichia pastoris*. The codon-optimized gene with restriction sites *XhoI/NotI* was cloned into pPICZ α A expression vector. *Escherichia coli* DH5 α were transformed with the construction rCap/pPICZ α A. **Transformation of *P. pastoris* and expression of rCap protein:** The recombinant plasmid was linearized with the *SacI* enzyme and used to transform *P. pastoris* X-33 by electroporation. *P. pastoris* transformants were inoculated into 500 mL of BMGY medium, incubated at 28°C, 240 rpm, for 48h and to obtain biomass. The biomass was centrifuged and transferred to 100 mL of BMMY medium (the same components as those of BMGY with glycerol replaced by methanol 0.5%). Methanol was added to the culture every 24h, the culture was maintained at 28°C, 240 rpm, for 72h. After this time, the supernatants were recovered. **Western blot and ELISA:** The test IPMA was used as a reference test for determination of serum positive or negative for the virus (Pinto et al., 2011). For the western blot, the membrane was blocked with non-fat dry milk for 1h and incubated with swine sera at a dilution of 1:25 at 4°C for 1.5h. Then, the membrane was incubated with protein G-peroxidase conjugated (1:45.000) at 4°C for 1h. For ELISA, the plates were coated with rCap at 37°C/3h, blocked in a damp chamber. 100 μ L of diluted swine sera was added, and the plates were incubated. Then, 100 μ L of protein G-peroxidase conjugated was added and incubated.

The plates were read by ELISA reader (Multiskan Plus Thermo Fisher Scientific, USA) at a wavelength of 450nm.

RESULTS AND DISCUSSION

After the codon-optimization, the mean difference between the PCV2 Cap gene and the codon usage of *P. pastoris* was reduced to 10%. The release of a 780bp fragment after enzymatic digestion with *XhoI/NotI*, shows that the PCV2 Cap gene was successfully cloned into pPICZ α A (Fig.1a). The construction was designated rCap/PCV2pPICZ α A of 4400bp and was confirmed by enzymatic digestion and sequencing (Fig. 1b and 1c).

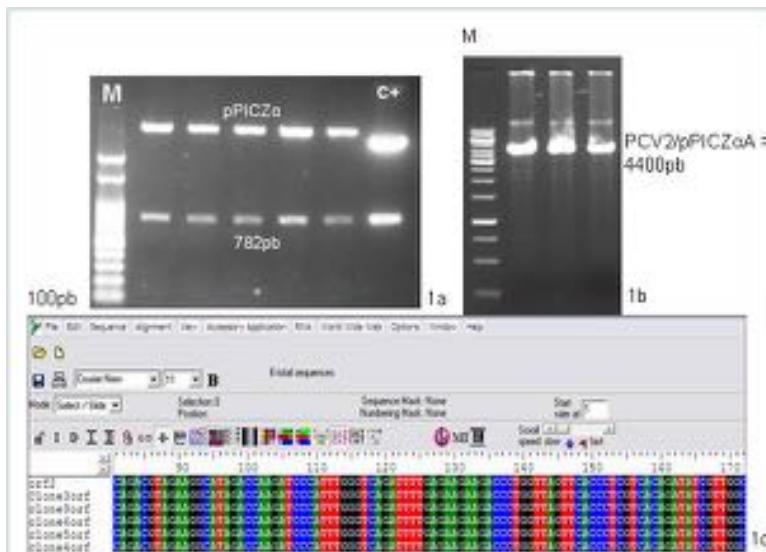


Figure 1. Enzymatic digestion and sequencing of the rCap/PCV2pPICZ α A construction.

a: Release of the cap gene with 782bp, visualized on 1% agarose gel. **b:** Digestion with *SacI* of the construction with 4400pb. **c:** Sequencing of the clones. **M:** 100-bp DNA ladder (Ludwig Biotec); **C+** vector pBlueScript SK containing the codon-optimized PCV2 capsid gene; **pPICZ α A:** expression vector.

The *P. pastoris* system have been widely used for various recombinant protein production (Coutinho et al., 2013). Until now, Tu et al., 2013 reported the only work that describes the expression of the PCV2 Cap gene in *P. pastoris*, but the authors have failed to detect the protein in the supernatant, in contrast of our work.

In this study, it was observed that rCap protein reacted strongly against sera from PCV2-infected swine in both assays, Western blot and ELISA, demonstrating the immunoreactivity of the recombinant protein. The detection of a band of approximately 39 kDa in the Western blot showed the positive production of the recombinant protein in the *P. pastoris* supernatant (Fig. 2). The ELISA was standardized to ensure that there was a high discrimination between the OD value of the positive and negative sera. Using the 1/100 dilution of the recombinant antigen, 1/20 of the swine serum and 1/90.000 of the protein G-peroxidase conjugate, it was obtained an optimal ratio between the OD values of positive and negative sera (Fig. 2).

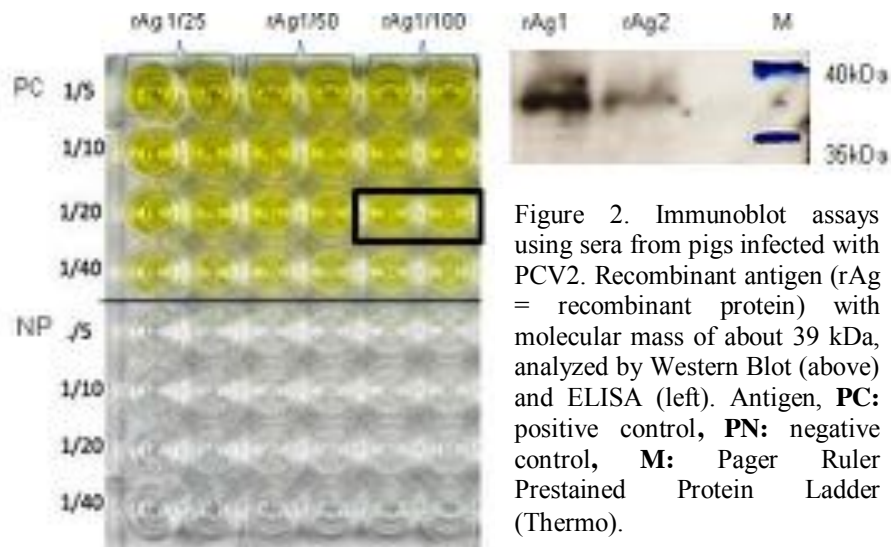


Figure 2. Immunoblot assays using sera from pigs infected with PCV2. Recombinant antigen (rAg = recombinant protein) with molecular mass of about 39 kDa, analyzed by Western Blot (above) and ELISA (left). Antigen, **PC**: positive control, **PN**: negative control, **M**: Pager Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo).

The total amount of protein produced in the supernatant (140 µg/mL), its use in the dilution of 1:100 and the rCap directly used in an indirect ELISA, strengthens the argument that the production of the protein by means of this expression system, may be an advantageous alternative, since it combines low costs with the stability of the recombinant antigen (Cereghinno and Cregg 2000).

CONCLUSIONS

P. pastoris expression system was shown to be capable of producing a functional rCap protein that can be used directly in the functionality tests without requiring laborious purification. Future tests to validate the rCap ELISA with a larger number of sera and allow a comparison to be made with other diagnostic tests currently in use, will be carried.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the collaboration of Professor Clara Nilce Barbosa from Department of Veterinary Medicine, Federal Rural University of Pernambuco, Brazil. This work received the financial support of Brazilian Agencies CAPES and CNPq.

REFERENCES

- Coutinho, L.C.A. et al., 2013. Production of Equine Infectious Anemia Virus (EIAV) antigen in *Pichia pastoris*. *J. Virol. Methods*. 191, 95-100.
- Cereghino, J.L. and Cregg, J.M. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 45-66.
- Hu, F., Li, X., Mao, P. H., Jin, X., Rao, B., Zheng, P. Zhou, Y.L., Sheng, Y.L., Ke, T., Ma, L. X. 2011. A visual method for direct selection of high-producing *Pichia pastoris* clones. *BMC Biotechnol.* 11, 23

Yin, S., Sun, S., Yang, S., Shang, Y. Cai, X., Liu, X. 2010. Self-assembly of virus-like particles of porcine circovirus type 2 capsid protein expressed from *Escherichia coli*. *Viol. J.* 7, 2-5.

Tu, Y., Wang, Y., Wang, G., Wu, J., Liu, Y., Wang, S., Jiang, C., Cai, X. 2013. High-level expression and immunogenicity of a porcine circovirus type 2 capsid protein through codon optimization in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 2867-2875.

Wu, P.-C., Chien, M-S., Tseng, Y-Y., Lin, J., Lin, W-L., Yang, C-W., Huang, C. 2008. Expression of the porcine circovirus type 2 capsid protein subunits and application to an indirect ELISA. *J. Biotechnol.* 133, 58-64.

Cregg, J.M., Cereghino, J.L., Shi, J., Higgins, D. R. 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol.* 16, 23-52.

Blanchard, P., Mahé, D., Cariolet, R., Truong, C., Dimna,, M.L., Arnauld, C., Rose, N., Eveno, E., Albina, E., Madec, F., Jestin, A. 2003b. An ORF2 protein-based ELISA for porcine circovirus type 2 antibodies in post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Vet. Microbiol.* 94, 183-194.

Liu, J. Chen, I., Du, Q., Chua, H., Kwang, J. 2006. The ORF3 Protein of Porcine Circovirus Type 2 Is Involved in Viral Pathogenesis In Vivo. *J. Virol.* 80, 5065-5073.

Darwich, L. and Mateu, E. 2012. Immunology of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res.* 164, 61-67.

Rose, N., Opriessnig, T., Grasland, B., Jestin, A., 2012. Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res.* 164, 78-89.

Gillespie, J., Opriessnig, T., Meng, X. J., Pelzer, K., Buechner-Maxwell, V. 2009. Porcine Circovirus Type 2 and Porcine Circovirus-Associated Disease. *J. Vet. Intern. Med.* 23, 1151-1163.



DETERMINAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS ATRAVÉS DE ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELÉTRICA

¹J.M. NASCIMENTO, ¹M.D.L. OLIVEIRA, ²O.L. FRANCO, ²L. MIGLIOLO,
³C.P. DE MELO, ¹C.A.S. ANDRADE

¹Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco. jessicamnascimento@gmail.com

²Centro de Análise Proteômicas e Bioquímicas de Brasília, Universidade Católica de Brasília.

³Laboratório de Polímeros Não Convencionais, Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco.

RESUMO

Nos últimos anos, um grande interesse tem sido direcionado às pesquisas que buscam decifrar peptídeos com atividades antimicrobianas, os quais têm como alvo as membranas dos microrganismos. Desta forma, este estudo tem como objetivo decifrar o possível mecanismo de ação de dois peptídeos antimicrobianos – um peptídeo anticongelante semelhante ao extraído do peixe antártico *Pleuronectes americano*, denominado *Pa*-MAP, e um peptídeo humano, denominado LL-37 – utilizando modelos de membranas lipídicas através de Espectroscopia de Impedância Elétrica. Os resultados obtidos demonstraram como estes peptídeos agem sobre as membranas, além do potencial antimicrobiano dos mesmos.

INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado de antimicrobianos tem sido um fator de risco importante para aparecimento da resistência de microrganismos, exigindo pesquisas intensas em busca de novas classes de agentes antimicrobianos (Mandal et al., 2009). Neste sentido, vários estudos têm sido destinados aos peptídeos antimicrobianos (do inglês *antimicrobial peptides* – AMPs), e com menor frequência, aos peptídeos anticongelantes (do inglês *antifreezing peptides* – AFPs) (Gong, et al., 1996; Hancock, 1997; Zhang et al., 2001; Mihajlovic e Lazaridis, 2010). Ambos os peptídeos têm como alvo as membranas microbianas, devido a sua estrutura, geralmente, catiônica anfipática, além de vários resíduos hidrofóbicos que possibilita a interação com as

membranas dos microorganismos, seguida pela penetração na membrana formando poros e levando a morte celular (Nguyen et al., 2011). Entender os mecanismos de ação destes peptídeos é crucial para o desenvolvimento de novas moléculas eficientes, mas na prática nem sempre isto é possível devido às limitações das técnicas utilizadas. Nos últimos anos, a espectroscopia de impedância tem sido usada para desvendar os modos de ação dos AMPs, uma vez que é uma técnica robusta, sensível, que permite o estudo de uma grande variedade de AMPs em tempo real (Chang et al., 2008).

OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo decifrar os possíveis mecanismos de ação do AFP análogo ao extraído do peixe antártico *Pleuronectes americanus*, chamado de *Pa*-MAP, e do AMP sintético humano LL-37 através do estudo com modelos de membranas fosfolipídicas por Espectroscopia de Impedância Elétrica (EIE).

MATERIAIS E MÉTODOS

As medidas de impedância elétricas foram realizadas em um analisador de impedância 1260 (Solartron,UK), variando-se a frequência de 1Hz-1MHz. Foram utilizados diferentes potenciais (0V, 0.5V e 1V) e uma amplitude de 100mV. Para a determinação das partes real e imaginária da impedância foi utilizado um sistema de placas paralelas, composto por duas placas de aço inoxidável, as quais serviram como eletrodos. A formação das membranas de fosfolipídios foi feita por auto-montagem pelo método de *dipping coating*. O eletrodo foi imerso em uma solução de fosfolipídio 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC) (1 mg.mL^{-1}), onde foram realizadas medidas em um intervalo de tempo de 5 minutos. Após chegar ao tempo máximo da deposição (30 minutos), o eletrodo com a membrana foi transferido para um béquer contendo 5 mL da solução dos peptídeos (0.1 mg.mL^{-1}), onde foram realizadas medidas elétricas também a cada intervalo de 5 minutos. Antes da deposição da membrana lipídica foi realizada uma medida do eletrodo sem modificações em água deionizada, a qual serviu como padrão para avaliar cada etapa de modificação. A avaliação morfológica das membranas antes e após a exposição dos peptídeos foi realizada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A adição da camada de DPPC resultou em um aumento da resistência da transferência de carga. Com a adição de *Pa*-MAP e LL-37 houve uma diminuição acentuada da resistência da membrana (R_m) de aproximadamente uma ordem de grandeza devido à desestabilização da camada lipídica provocada pelos peptídeos. No entanto, a resposta do LL-37 foi inferior quando comparada com *Pa*-MAP. A resposta

dielétrica de ambos os peptídeos foi influenciada pelo potencial aplicado, apesar de não ser muito significativo, com uma resposta superior para potenciais mais positivos. Adicionalmente, foi observado que a adição de *Pa*-MAP e LL-37 resultou numa diminuição drástica da R_m na no primeiro minuto de exposição, mantendo-se constante até o final do tempo de permanência (~50 minutos) (Figura 1). Segundo Chang et al. (2008), o rompimento da membrana por peptídeos que agem pelo modelo tapete resulta em uma elevada redução ou desaparecimento completo da R_m . No entanto, a membrana pode ainda proporcionar uma barreira eletroquímica mensurável, uma vez que as regiões afetadas são reparadas por redistribuição dos lipídios e/ou peptídeos ou por difusão lateral dos lipídios a partir das regiões intactas. Nossos resultados demonstraram que ambos os peptídeos analisadas atuam pelo modelo tapete. Adicionalmente, através das imagens de MEV podemos observar que camada de lipídios aparece como uma superfície homogênea e lisa e após a exposição ao *Pa*-MAP e ao LL-37, a membrana se tornou bastante heterogênea, formando um "tapete" com falhas (Figura 2), corroborando com os resultados obtidos por EIE.

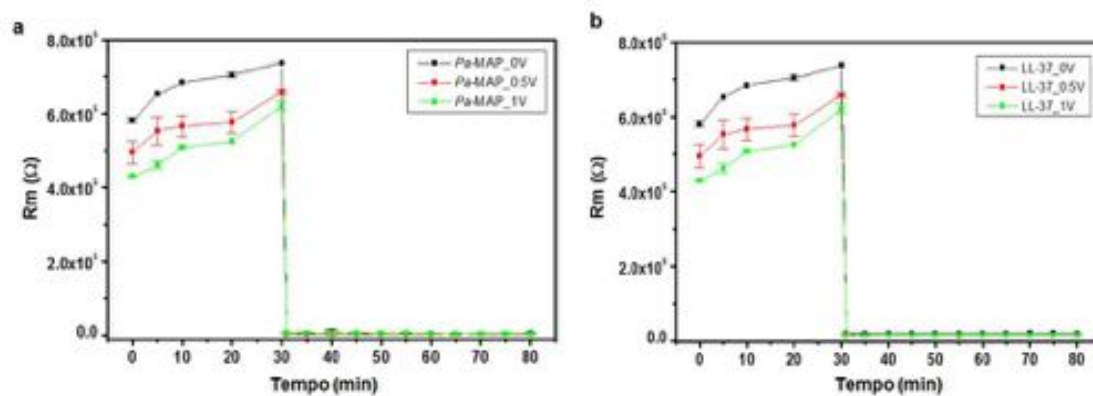


Figura 1. Resistência da membrana *versus* o tempo em diferentes potenciais. Em (a) *Pa*-MAP e em (b) LL-37. Os peptídeos foram adicionados no 30º minuto.

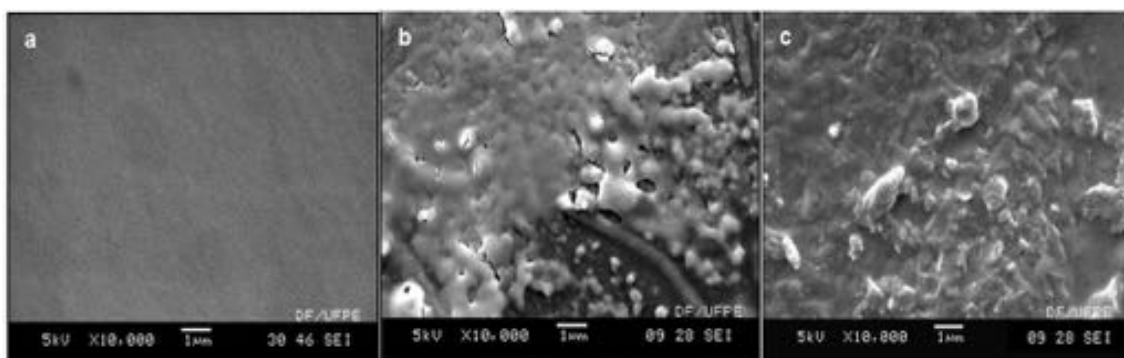


Figura 2. Imagens de MEV da camada de DPPC antes (a) e após a exposição de *Pa*-MAP (b) e LL-37 (c).

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostram que os peptídeos *Pa*-MAP e LL-37 apresentam um enorme potencial para desestabilizar membranas, o que pode explicar a sua atividade antimicrobiana observada *in vitro*. Desta forma, os peptídeos estudados podem ser boas alternativas para o controle de microrganismos patogênicos. Adicionalmente, as respostas obtidas através de EIE sugerem que estes peptídeos agem sobre as membranas através do modelo carpete. Estes resultados demonstram também que a EIE é uma técnica bastante sensível que pode ser utilizada para estudos de interação peptídeo/membranas.

AGRADECIMENTOS

À Rede Nanobiotecnologia - CAPES.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHANG W.K., WIMLEY W.C., SEARSON P.C., HRISTOVA K., MERZLYAKOV M. **Characterization of antimicrobial peptide activity by electrochemical impedance spectroscopy.** *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1778, n. 10, p. 2430-2436, 2008.

GONG Z., EWART K.V., HU Z., FLETCHER G. L., HEW C.L. **Skin antifreeze protein genes of the winter flounder, *Pleuronectes americanus*, encode distinct and active polypeptides without the secretory signal and prosequences.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, p.4106-4112, 1996.

HANCOCK, R.E.W. **Peptide antibiotics.** *Lancet*, v. 349, p.418-422, 1997.

MANDAL S.M., DEY S., MANDAL M., SARKAR S., MARIA-NETO S., FRANCO O.L. **Identification and structural insights of three novel antimicrobial peptides isolated from green coconut water.** *Peptides*, v. 30, n. 4, p. 633-637, 2009.

MIHAJLOVIC M., LAZARIDIS T. **Antimicrobial peptides bind more strongly to membrane pores.** *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1798, n. 8, p. 1494-502, 2010.

NGUYEN L.T., HANEY E.F., VOGEL H.J. **The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action.** *Trends in Biotechnology*, v. 29, p. 464-472, 2011.

ZHANG L.J., ROZEK A., HANCOCK R.E.W. **Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes.** Journal of Biological Chemistry, v. 276, n. 38, p. 35714-35722, 2001.



ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA DE UM GEL FITOTERÁPICO A BASE DE *ALOE VERA*.

¹T.R.R. TIMÓTEO, ¹T.S. SOUZA, ¹C.H.T.P. SILVA.

¹ Faculdade ASCES. taysatimoteo@hotmail.com

Introdução: O estudo de estabilidade acelerado, tem como finalidade acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento. É um método utilizado para demonstrar empiricamente, o que poderia ocorrer com o produto farmacêutico quando submetido a condições normais de armazenamento por um longo período ou durante seu transporte. **Métodos:** As formulações desenvolvidas foram denominadas G1, G2, G3, e G4, sendo realizadas análises nos tempos 0, 3 e 6 meses submetidas a temperatura de $40 \pm 2^\circ$ e umidade de $75 \pm 5\%$. **Resultados e Discussão:** A estabilidade do tempo zero as amostras apresentaram: (G1) pH 6,2, viscosidade 36.270 cp e densidade 1,011. (G2) pH 5,83, viscosidade 70.200 cp e densidade 1,007. (G3) pH 5,37, densidade 1,009 e viscosidade 135,720. (G4) pH 5,05, densidade 1,032 e viscosidade 145.080. Ao termino da estabilidade no tempo 6 as amostras apresentaram: (G1) pH 7,41, densidade 1,013 e viscosidade 30,420. (G2) pH 6,94, densidade 1,014 e viscosidade 63.180. (G3) pH 6,75, densidade 1,006 e viscosidade 124.800 e (G4) pH 5,86, densidade 1,013 e viscosidade 154.440 e apresentando-se intactas em suas características organolépticas. **Conclusão:** Na estabilidade acelerada foi possível observar mudanças significativas, principalmente no pH e viscosidade, sendo um motivo de preocupação, pois essas mudanças podem levar o produto a ter problemas de incompatibilidade com alguns excipientes da formulação.

Palavras-chave: Estabilidade, Fitoterápicos, *Aloe vera*.



ESTUDO IMPEDIMÉTRICO DA BIOATIVIDADE DO SISTEMA CONSTITUÍDO POR LECTINA CRAMOLL E NANOCOMPÓSITO DE OURO E POLIANILINA PARA DIAGNÓSTICO DA DENGUE

^{1*}K.Y.P.S AVELINO, ¹C.A.S. ANDRADE, ²C.P. DE MELO, ³M.T.S CORREIA,
³L.C.B.B COELHO, ⁴M.L. NOGUEIRA, ¹M.D.L. OLIVEIRA

¹Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco. kareniasmim@hotmail.com

²Laboratório de Polímeros Não-Convencionais, Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco.

³Laboratório de Glicoproteínas, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco.

⁴Laboratório de Pesquisa em Virologia, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP).

RESUMO

Neste estudo, realizamos uma análise impedimétrica da interação bioespecífica entre a lectina de *Cratylia mollis* (CramoLL), adsorvida em compósito híbrido de nanopartículas de ouro e polianilina (AuNpPANI), e glicoproteínas presentes nos sorotipos da dengue 1, 2 e 3, e no plasma de pacientes contaminados com dengue clássica (DC) e dengue hemorrágica (DH). A partir da avaliação dos resultados eletroquímicos, foi possível verificar que o dispositivo sensor baseado em AuNpPANI-CramoLL é capaz de diferenciar perfis de reconhecimento glicoproteico para as amostras em estudo. Desta forma, verifica-se a possibilidade de utilização do sistema biossensível para o desenvolvimento de um novo método diagnóstico para a dengue com maior especificidade, seletividade, análise rápida e baixo custo.

INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença febril aguda causada por um arbovírus de RNA fita simples positiva que possui quatro sorotipos geneticamente distintos (DS1, DS2, DS3 e DS4) responsáveis por causar três síndromes clínicas: dengue clássica, dengue hemorrágica e síndrome do choque da dengue [1, 2]. Em decorrência do amplo espectro clínico da dengue, a obtenção de um diagnóstico preciso é essencial para a implementação de medidas terapêuticas eficazes [3]. Nesta área, os biossensores destacam-se por serem dispositivos que fornecem informações analíticas específicas sobre substâncias de interesse através de um elemento de reconhecimento biológico associado a um transdutor [4, 5, 6]. Para a construção dos sistemas biossensíveis, inúmeras moléculas biológicas podem ser utilizadas como biorreceptores, como por exemplo, as lectinas. Estas são proteínas de origem não imunológica que se ligam de forma específica a carboidratos ou a substâncias que contêm açúcares, capazes de aglutinar células e precipitar glicoconjugados [7, 8, 9]. A CramoLL é uma lectina isolada a partir das sementes de *Cratylia mollis*, específica para resíduos de glicose/manose, sendo fortemente inibida por α -D-manosídeo [10, 11]. Entretanto, a adsorção direta de biomoléculas sobre superfícies metálicas pode resultar em sua desnaturação ou perda de

sua bioatividade. Desta forma, nanocompósitos híbridos biofuncionalizados, como as nanopartículas de ouro e polianilina (AuNpPANI), por apresentarem características únicas e sinérgicas que aumentam o desempenho analítico dos dispositivos, tornam-se elementos fundamentais para a montagem de sistemas de biodeteção [12, 13]. Por a dengue apresentar elevada morbidade e mortalidade, o desenvolvimento de novas tecnologias de detecção é de grande interesse para a saúde pública.

OBJETIVOS

O presente trabalho possui como objetivo principal estudar a bioatividade da lectina de *Cratylia mollis* (CramoLL) adsorvida em superfície modificada por nanopartículas de ouro e polianilina (AuNpPANI) para detecção de glicoproteínas presentes nos sorotipos DS1, DS2 e DS3, e nos soros de indivíduos com dengue clássica e dengue hemorrágica.

MATERIAIS E MÉTODOS

A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foi utilizada como ferramenta biotecnológica para avaliação dos processos analíticos da interface eletrodo-solução. Para realização das análises eletroquímicas, foi utilizado um Potenciostato/Galvanostato Autolab 128N associado a uma célula convencional de três eletrodos imersos em solução de 10 mM de ferro-ferricianeto de potássio em uma proporção de 1:1 (v/v). O eletrodo de trabalho (ET) utilizado foi o eletrodo de ouro modificado, o eletrodo de contra-referência foi o eletrodo de platina e o de referência o eletrodo de Ag/AgCl saturado com KCl. Os espectros da EIE foram obtidos numa faixa de frequência entre 100 mHz a 100 KHz com um potencial de amplitude alternada de 10 mV. Inicialmente, a superfície de ouro do ET foi polida em um disco de feltro com uma suspensão de alumina (Al_2O_3) com granulação de 0,05 μm e, em seguida, lavada abundantemente com água deionizada e submetida a um banho de ultrassom por 5 minutos. O sistema AuNpPANI-Cra foi preparado a partir de uma mistura de lectina CramoLL (200 $\mu g/mL$) e AuNpPANI em uma proporção de 1:2 (v/v). Para modificação da superfície eletroativa, o eletrodo foi imerso por 2 minutos no sistema híbrido AuNpPANI-Cra e, após sua remoção, enxaguado suavemente com água ultra-pura para remoção das partículas não adsorvidas. Após a obtenção do eletrodo de ouro biomodificado, este foi incubado por 2 minutos nos soros de pacientes infectados com o vírus tipo 1, 2, 3 e com dengue clássica e dengue hemorrágica. Estes soros biológicos foram previamente diluídos em solução tampão fosfato de sódio a 10 mM e pH 7,4.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Fig. 1 demonstra a caracterização eletroquímica das etapas de montagem e a interação do biodispositivo com os sorotipos DS1, DS2 e DS3 da dengue. Foi observado que a curva de impedância para o eletrodo limpo em solução eletrolítica possui um semicírculo bastante pequeno e um comportamento quase linear. O complexo AuNpPANI-Cra forma uma camada sobre a superfície do eletrodo bloqueando parcialmente a transferência de elétrons na interface eletrodo-solução. O maior diâmetro

do semicírculo obtido é resultado, principalmente, da adsorção de lectinas CramoLL sobre o nanocompósito imobilizado, ocasionando o aumento da resistividade do sistema. Como pode ser visto (Fig. 1), o sistema híbrido AuNpPANI-Cra é capaz de reconhecer glicoproteínas dos sorotipos da dengue, no entanto, os resultados demonstram que este apresentou uma melhor bioatividade para o sorotipo DS3, seguido dos sorotipos DS1 e DS2. Este grau de sensibilidade é devido aos diferentes padrões de expressão de glicoproteínas virais antigênicas e constituintes glicosilados do sistema imunológico. A Fig. 2 representa o comportamento bioativo do sistema frente aos soros de indivíduos com DC e DH. Foi observado que o biossensor demonstrou diferentes perfis de reconhecimento glicoproteico para as amostras analisadas, onde os valores de impedância real e imaginária dos diagramas de Nyquist foram maiores para os soros de DH em relação ao DC. Este fato pode ser explicado pelos níveis elevados de proteínas glicosiladas em pacientes com febre hemorrágica do dengue, como por exemplo, a glicoproteína ácida alfa-1, proteína C3c do complemento, interleucinas (IL-1, IL-2, IL-6 e IL-8), interferon (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF- α) e molécula de adesão vascular (VCAM-1) [14].

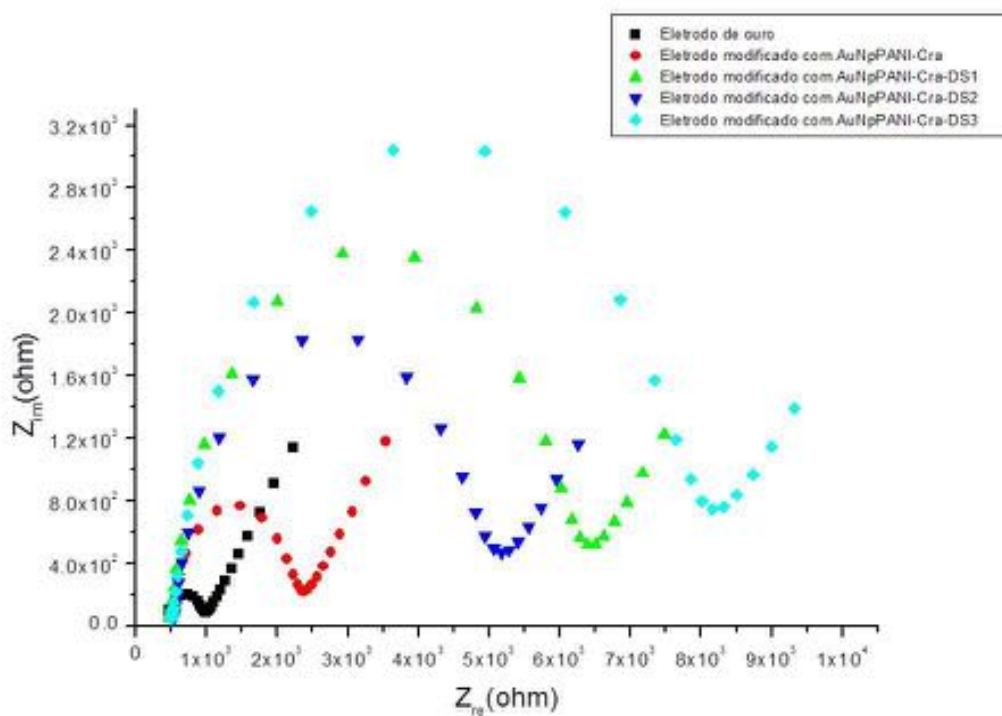


Figura 1. Diagramas de Nyquist da atividade biológica do sistema AuNpPANI-Cra frente a glicoproteínas presentes nos sorotipos de dengue 1, 2 e 3.

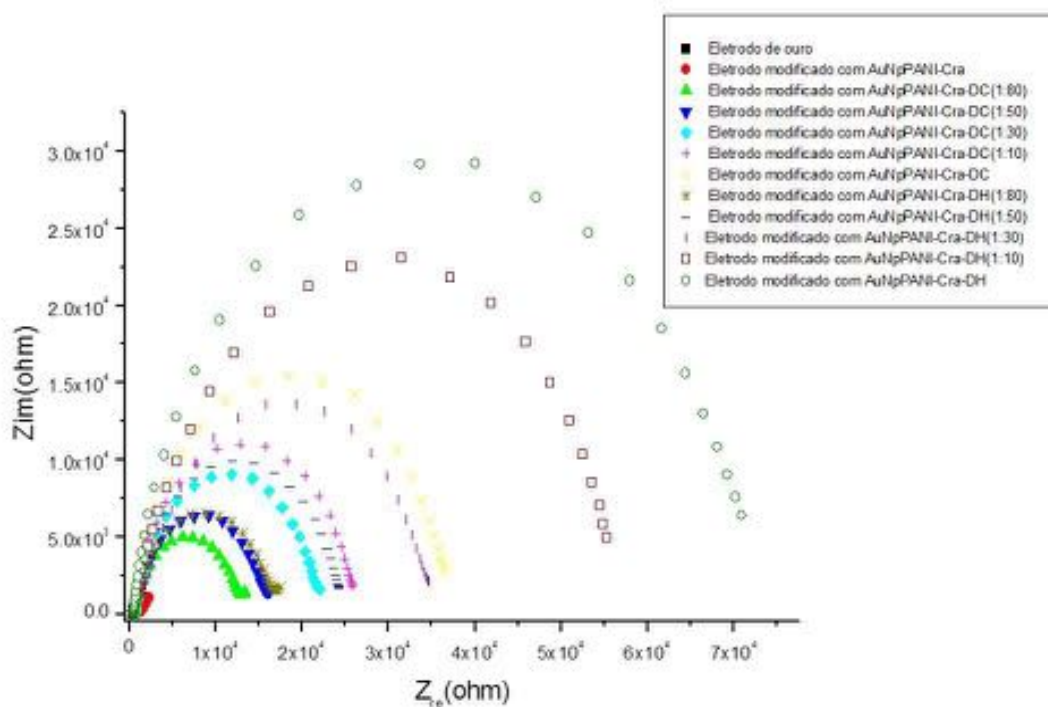


Figura 2. Espectros de impedância para a interação bioespecífica entre o dispositivo nanoestruturado a base de AuNpPANI-Cra e os soros de pacientes com dengue clássica (DC) e dengue hemorrágica (DH).

CONCLUSÕES

A partir das análises eletroquímicas, pode-se concluir que o biodispositivo nanoestruturado baseado em AuNpPANI-Cra é capaz de detectar glicoproteínas presentes nos soros de pacientes com dengue clássica e dengue hemorrágica, além dos sorotipos virais DS1, DS2 e DS3. Em adição, foram obtidos diferentes padrões de reconhecimento lectina-carboidrato para cada amostra estudada, indicando variações sorológicas no perfil glicídico. Portanto, o eletrodo biossensível poderá ser utilizado para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico para a dengue.

AGRADECIMENTOS

CNPq, CAPES-Rede nanobio/ELINOR, FACEPE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] HOBBER, D. et al. La dengue: une maladie virale en pleine expansion. **Méd. Mal. Infect.**, v. 25, p. 888-895, 1995.
- [2] SENEVIRATNE, S.L.; MALAVIGE, G.N. & DE SILVA, H.J. Pathogenesis of liver involvement during dengue viral infections. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p.608-614, 2006.

- [3] GUZMAN, M.G. & KOUR, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 8, p. 69-80, 2004.
- [4] HULANICKI, A.; GEAB, S. & INGMAN, F. Chemical sensors: definitions and classification. **Pure & Appl. Chem.**, v. 63, p. 1247-1250, 1991.
- [5] THÉVENOT, D.R. et al. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors & Bioelectronics**, v.16, p. 121-131, 2001.
- [6] CAYGILL, R.L.; BLAIR, G.E. & MILLNER, P.A. A review on viral biosensors to detect human pathogens. **Analytica Chimica Acta**, v. 681, p. 8-15, 2010.
- [7] SHARON, N. Lectins: From obscurity into the limelight. **Protein Science**, p. 72042-72048, 1998.
- [8] SHARON, N. & LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, p. 53-62, 2004.
- [9] KENNEDY, J.F. et al. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 219-230, 1995.
- [10] CORREIA, M.T.S. & COELHO, L.C.B.B. Purification of a glucose / mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 55, p. 261-273, 1995.
- [11] PAIVA, P.M.G. & COELHO, L.C.B.B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). **Applied Biochemistry and biotechnology**, v. 36, p.113-118, 1992.
- [12] LI, Y.; SCHLUESENER, H.J. & XU, S. Gold nanoparticle-based biosensors. **Gold Bulletin**, v. 43, p. 29-41, 2010.

[13] YÁÑEZ-SEDEÑO, P. & PINGARRÓN, J.M. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 382, p. 884-886, 2005.

[14] KURANE, I. & ENNIS, F.A. Cytokines in dengue virus infections: role of cytokines in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Virology**, v. 5, p. 443-448, 1994.



GENETIC VARIABILITY IN THE L1 GENE OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS 16 (HPV16) FROM NORTH-EAST BRAZIL

¹A.P.A.D. GURGEL, ¹B.S.CHAGAS, ¹K.C.G. NASCIMENTO, ¹O.L.S. AMORIM, ²J.C. SILVA NETO, ³M.T. CARTAXO, ¹A.C. FREITAS

¹ Department of Genetics- Federal University of Pernambuco

acf_ufpe@yahoo.com.br, apavla@yahoo.com.br

² Department of Histology and Embryology - Federal University of Pernambuco

³ Pediatric Oncohematology Center – University of Pernambuco

Introduction: Cervical cancer is the second major cause of female cancer worldwide. Particularly in Brazil, cervical cancer is ranked as the third most common female cancer. Several studies have shown the putative role of the genetic variability of Human Papillomavirus genome in the virus infectivity, pathogenicity, host-immune response and progression to cervical cancer. Despite of this fact, there are no studies that show the extent of the variability of HPV16 in infected women from North-Eastern Brazil. **Aim:** The aim of this study was to explore intratypic variation of HPV16 L1 gene in cervical samples of infected women from North-Eastern Brazil. **Methodology:** HPV16 L1 gene (N=15) was amplified through PCR and sequenced by using ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing v 3.1 (Applied Biosystems®). Afterwards, the HPV16 L1 gene was evaluated in order to verify nucleotide divergence relative to the L1 sequence prototype deposited in GeneBank. Sequence comparisons were performed by using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) and multiple alignments were carried out by using the CLUSTALW (Mby ega 5, Beta version) program. The putative impact of the variability in L1 gene of HPV16 was estimated in silico through B-cell and T-cell epitopes prediction by using BcePred, ProPred and ProPred I servers. **Results:** Twenty-seven single nucleotide changes were observed in HPV16 L1 gene, in which 13/27 (48.1%) are non-synonymous mutations and 14/27 (51.8%) are synonymous mutations. These non-synonymous mutations lead to amino acid changes embedded in B-cell (4/13) and T-cell epitope (13/13). **Conclusion:** In conclusion, this study showed several synonymous and non-synonymous mutations in HPV16 L1 gene, which can impact the pathogenicity and the immune response.

Agency Funding: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Keywords: Genetic variability, Human Papillomavirus type 16 (HPV16), L1 gene.



IMPLICAÇÕES METABÓLICAS DO CONSUMO MATERNO DE UMA DIETA HIPERLIPÍDICA SOBRE A PROLE DE RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR) COM SEIS MESES DE IDADE

¹M.A. ROCHA, ²T.R.A. SANTOS, ³G.I.B.P. DUARTE

¹Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Cardiovascular, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco. marcelorocha.federal@gmail.com

^{2,3}Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Cardiovascular, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco.

Introdução: Insultos sofridos pelo feto durante a fase de gestação é capaz de programar o desenvolvimento de doenças na fase adulta. Nosso objetivo foi avaliar os efeitos do consumo materno de uma dieta hiperlipídica (DH) sobre os parâmetros bioquímicos e a hipertrofia cardíaca na prole adulta SHR. **Métodos:** Fêmeas SHR com 3 meses de idade (300g) foram acasaladas e separadas em dois grupos: 1) Controle (C) que recebeu apenas dieta padrão e 2) DHGL que recebeu dieta hiperlipídica durante a fase de gestação e lactação. Nas proles adultas (6 meses) foram determinados os níveis plasmáticos de glicose (G), triglicérides (TG), colesterol HDL (HDL-c) e colesterol total (CT), bem como, o índice de hipertrofia cardíaca pela relação peso seco dos ventrículos pelo peso corporal. **Resultados e Discussão:** Os animais da prole DHGL apresentaram níveis plasmáticos significativamente elevados de G (C= 75.4 ± 1.5 e DHGL= 165.1 ± 24.8 mg/dL), TG (C= 32.2 ± 1.8 e DHGL= 47.55 ± 8.2 mg/dL), CT (C= 41.6 ± 1.4 e DHGL= 75.5 ± 6.6 mg/dL), HDL-C (C= 53.0 ± 8.6 e DHGL= 31.4 ± 0.75 mg/dL). A prole DHGL apresentou índice de hipertrofia cardíaca elevada ($p < 0,05$) em relação ao controle. Níveis plasmáticos elevados de G, TG, CT e HDL-c estão relacionados à disfunção endotelial, que contribui para a hipertrofia cardíaca. **Conclusão:** Esses dados sugerem que o consumo de uma DH durante o desenvolvimento fetal é capaz de promover alterações metabólicas e hipertrofia cardíaca na prole SHR adulta.

Apoio: CNPq, CAPES

Palavras-chave: Dieta Hiperlipídica, Ratos Espontaneamente Hipertensos, Hipertrofia Cardíaca.



MODELAGEM MOLECULAR DO COMPLEXO DE INCLUSÃO ENTRE SULFOBUTIL-ÉTER BETA-CICLODEXTRINA E BETA-LAPACHONA

M.M. RABELLO, M.Z. HERNANDES

Laboratório de Química Teórica Medicinal, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco.

RESUMO

Foi realizado um estudo de modelagem molecular com o objetivo de compreender a formação do complexo *host-guest* entre o sulfobutil-éter β -ciclodextrina (SBE β -CD) (*host*) e a β -lapachona (*guest*). Foram geradas e utilizadas um total de 200 estruturas de SBE β -CD para realizar o estudo de *docking* molecular utilizando o programa GOLD. Os resultados de *docking* mostraram uma única orientação para a formação do complexo entre o *host* e o *guest*, onde os dois átomos de oxigênio ligados ao anel central da β -lapachona ficam voltados para a borda maior da SBE β -CD. O complexo estável é formado por vários contatos hidrofóbicos, três ligações de hidrogênio e *docking score* de 56,84. A metodologia aplicada pode ser aplicada para outros estudos envolvendo ciclodextrinas e seus derivados.

INTRODUÇÃO

Ciclodextrinas (CDs) são sacarídeos cíclicos, compostos por unidades de glicose que formam um toróide¹, portanto apropriadas para a formação de complexos de inclusão, contribuindo para o aumento da solubilidade de uma grande variedade de moléculas hospedeiras (inclusive hidrofóbicas), em solução aquosa. Essa propriedade das CDs permite várias aplicações de complexos de inclusão em vários campos de atuação², e têm sido preparados para estender suas propriedades físico-químicas e sua capacidade como novos carreadores de fármacos³.

Um complexo de inclusão é formado por um *host* (hospedeiro), e por um *guest* (hóspede). Nesse caso, o *host* seria a CD (ou seu derivado) e o *guest* seria um fármaco (ou uma molécula bioativa), formando o complexo *host-guest*⁴. Os estudos de modelagem molecular estão presentes na maioria dos trabalhos envolvendo as CDs ou seus derivados, normalmente com o objetivo de elucidar as interações intermoleculares que estabilizam a formação do complexo *host-guest*.

A β -lapachona (β -lap) tem apresentado uma grande variedade de efeitos farmacológicos^{5,6}, mas o seu uso terapêutico está limitado principalmente devido a sua baixa solubilidade em água. Para superar isso, nosso grupo de pesquisa⁷ estudou um complexo de inclusão entre a β -lap e a hidroxipropil- β -CD (β -lap:HP β -CD). Os resultados indicaram que a complexação foi capaz de oferecer vantagens, aumentando a biodisponibilidade da β -lap.

Outro derivado de β -CD é a sulfobutiléter- β -CD (SBE β -CD), patenteada com o nome de Captisol[®]. Em uma tentativa de avaliar preditivamente a possibilidade de utilizar este novo derivado de CD, este presente trabalho procurou-se calcular, através

de abordagens *in silico*, a estabilidade do complexo de inclusão da β -lap com a SBE β -CD, ou seja, do complexo β -lap:SBE β -CD.

OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho foi determinar e aplicar o conjunto de metodologias *in silico* mais adequado para elucidar o mecanismo de interação intermolecular presente no complexo *host-guest* entre o *host* SBE β -CD e o *guest* β -lapachona.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os derivados de CD possuem substituições nas hidroxilas das unidades de glicose. Dependendo das posições e do grau de substituição do derivado, existem várias estruturas possíveis.

Para realizar esse estudo, foi utilizada uma abordagem de construir algumas estruturas do derivado SBE β -CD, partindo-se da estrutura tridimensional da β -CD. Considerando que o grau de substituição é de 0,9 unidades de SBE por unidade de glicose, considerou-se que a estrutura de SBE- β CD tem, em média, 7 unidades de SBE. Sendo assim, 20 estruturas de SBE-BCD foram construídas, incluindo 10 estruturas com 7 unidades de SBE, 5 estruturas com 6 unidades e 5 estruturas com 8 unidades. As posições de substituições para os grupos SBE foram escolhidas de forma a distribuir homogeneamente os substituintes na BCD. Em seguida as estruturas otimizadas foram calculadas utilizando-se o método semi-empírico RM1⁸, disponível no programa Spartan '08⁹. Em seguida, foi realizada uma busca conformacional, utilizando-se o pacote de ferramentas Tinker¹⁰, em cada uma das 20 estruturas de SBE- β CD anteriormente obtidas. Desta forma, aplicando-se o método MM3¹¹, foram geradas 10 estruturas para cada uma, totalizando 200 estruturas de SBE- β CD. Todas as estruturas foram alinhadas e submetidas ao cálculo de *docking* com o programa GOLD¹². A partir do melhor resultado de *docking*, foi feita uma análise das interações intermoleculares com o programa Binana¹³.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 200 estruturas de SBE β -CD, alinhadas, obtidas a partir da busca conformacional, como explicado na metodologia, podem ser observadas na **figura 1**.

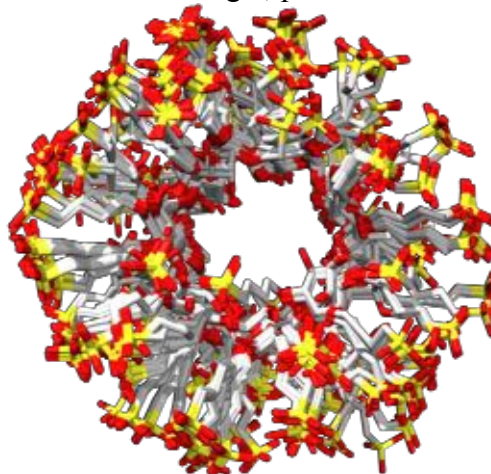


Figura 1: Superposição das 200 estruturas de utilizadas nos cálculos de *docking*.

Os resultados de *docking* mostraram uma única orientação para a formação do complexo de inclusão entre o *host* e o *guest*, onde os dois átomos de oxigênio ligados ao anel central da β -lapachona ficam voltados para a borda maior da SBE β -CD. A melhor solução de *docking* representa um *score* de 56,84 e pode ser observada na **figura 2**. O complexo é estabilizado por vários contatos hidrofóbicos e por três ligações de hidrogênio, com distância de 2,7, 3,0 e 3,1 Ångstrons, o que explica a significativa estabilidade do complexo de inclusão β -lap:SBE β -CD.

Os resultados desse estudo de modelagem molecular apontam que a solubilização da β -lapachona em sistemas aquosos poderia ser melhorada quando complexada com a SBE β -CD.

Acredita-se que a metodologia aplicada para o modelo do *host* (SBE β -CD), no cálculo de *docking* com 200 estruturas distintas, foi capaz de contemplar a variabilidade estrutural destes derivados de ciclodextrina. Dessa forma foi levado em consideração tanto a flexibilidade do *host* quanto do *guest* nesses cálculos de *docking*, o que aumenta bastante a confiabilidade da metodologia aplicada. Essa metodologia pode ser extrapolada para outros derivados de ciclodextrina.

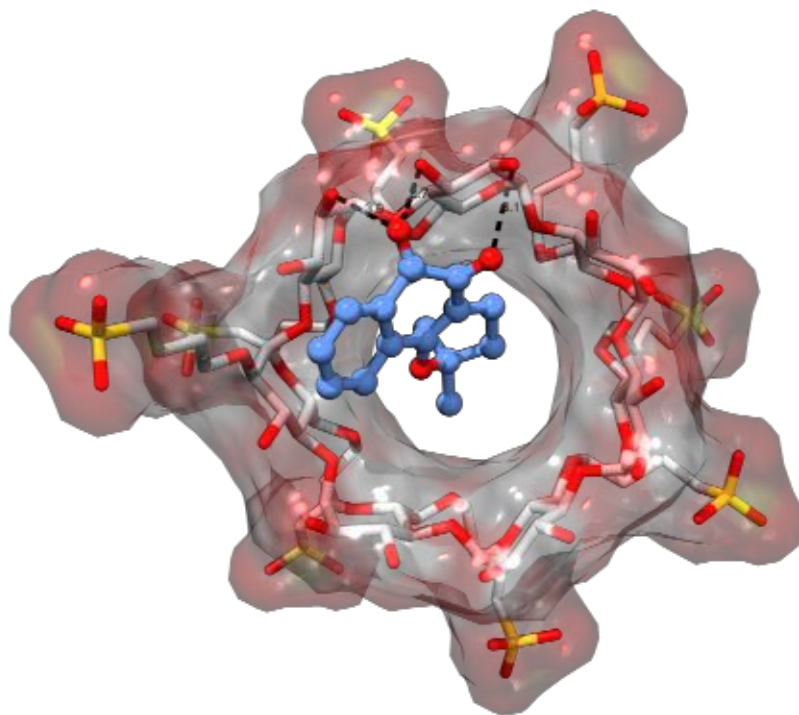


Figura 2: Melhor solução de *docking* para o complexo β -lap:SBE β -CD. As linhas pontilhadas representam ligações de hidrogênio intermoleculares entre o *host* (SBE β -CD) e o *guest* (β -lap).

CONCLUSÕES

A metodologia *in silico* empregada neste trabalho foi capaz de levar em consideração o grau de substituição do derivado de CD, assim como também a variabilidade das posições desses substituintes (SBE) no *host* SBE β -CD. Os resultados de modelagem molecular apontam para uma descrição do modo de interação entre o *host* e o *guest* (β -lap) como estável, justificado pelo *score* obtido e pelas interações intermoleculares mapeadas. Acredita-se que a aplicação desta metodologia para outros derivados de CD é viável.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo auxílio financeiro a este trabalho através da concessão da bolsa de estudos (M.M.R.).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) GÓRNAS, P. NEUNERT, G. BACZYŃSKI, K.; POLEWSKI, K. Beta-cyclodextrin complexes with chlorogenic and caffeic acids from coffee brew: Spectroscopic, thermodynamic and molecular modelling study. **Food Chemistry**, v. 114, n. 1, p. 190-196, 2009.
- (2) BOONYARATTANAKALIN, K. S. WOLSCHANN, P.; LAWTRAKUL, L. Molecular dynamics of β -CD in water/co-solvent mixtures. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 70, n. 3-4, p. 279-290, 2011.
- (3) DUCHÊNE, D; PONCHEL, G.; WOUESSIDJEWÉ, D. Cyclodextrins in targeting. Application to nanoparticles. **Advanced drug delivery reviews**, v. 36, n. 1, p. 29-40, 1999.
- (4) LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, DOMINIQUE. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International journal of pharmaceutics**, v. 329, n. 1-2, p. 1-11, 2007.
- (5) ANDRADE-NETO, V.F.; GOULART, M.O.F.; SILVA-FILHO, J.F; SILVA, M.J.; PINTO, M.C.F.R.; PINTO, A.V.; ZALIS, M.G.; CARVALHO, L.H.; KRETTLI, A.U. Antimalarial activity of phenazines from lapachol, β -lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium berghei* in vivo. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 14, p. 1145–1149, 2004.
- (6) COELHO, T.S.; SILVA, R.S.F.; PINTO, A.V.; PINTO, M.C.F.R.; SCAINI, C.J.; MOURA, K.C.G.; SILVA, P.A. Activity of β -lapachone derivatives against rifampicin-susceptible and -resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 90 p. 293–297, 2010.
- (7) CAVALCANTI, I.M.F.; MENDONÇA, E.A.M.; LIRA, M.C.B.; HONRATO, S.B.; CAMARA, C.A.; AMORIM, R.V.S.; MENDES-FILHO, J.; RABELLO, M.M.; HERNANDES, M.Z.; AYALA, A.P.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. The encapsulation of β -lapachone in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex into liposomes: A physicochemical evaluation and molecular modeling approach. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.44 n.9 p. 332-340, 2011.
- (8) ROCHA, G.B.; FREIRE, R.O.; SIMAS, A.M.; STEWART, J.J.P.; **J. Comput. Chem.**, v. 27 p. 1101–1111, 2006.

- (9) SPARTAN '08 Tutorial and User's Guide; Wavefunction: Irvine, CA, 2008.
<http://www.wavefun.com/products/spartan.html>.
- (10) PONDER, J.W. Tinker versão 6.2 software, Department of Biochemistry and Molecular Biophysics at Washington University, 2013.
<http://dasher.wustl.edu/ffe/>
- (11) ALLINGER N.L.; YUH, Y.H.; LII, J.H.; **J. Am. Chem. Soc.**, v. 111 p. 8551-8566, 1989.
- (12) GOLD versão 5.2 software, Cambridge Crystallographic Data Centre.
<http://www.ccdc.cam.ac.uk>.
- (13) DURRANT, J. D.; MCCAMMON, J. A. **Journal of molecular graphics & Modelling**, v. 29 p. 888-893, 2011.



MODIMOL VIRTUAL WORKBENCH: UMA PLATAFORMA INTEGRADA DE SERVIÇOS PARA ABORDAGENS "IN SILICO" UTILIZADAS NA INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

¹K.R. CAVALCANTE,¹M.Z. HERNANDES

¹Laboratório de Química Teórica Medicinal, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco. klauscavalcante@gmail.com

RESUMO

No contexto da inovação terapêutica, a modelagem molecular vem se tornando cada vez mais multidisciplinar. O crescente uso de técnicas e metodologias provenientes da computação tem trazido enormes benefícios, principalmente no que diz respeito a custos relacionados ao planejamento e desenvolvimento de novos fármacos. O surgimento de novos dispositivos eletrônicos móveis (*smartphones* e *tablets*) abre possibilidades de inovação quanto às ferramentas na área de modelagem molecular. Este trabalho tem como proposta o desenvolvimento de uma plataforma computacional denominada MODiMOL *Virtual Workbench* que disponibiliza serviços de modelagem molecular para estes novos dispositivos móveis.

INTRODUÇÃO

A crescente multidisciplinaridade entre os setores da ciência tem trazido diversos benefícios na atividade de pesquisa, especialmente quando nestes processos são envolvidas tecnologias de computação. No âmbito da inovação terapêutica não é diferente. A adoção de metodologias computacionais, por exemplo na modelagem de novas moléculas com potencial atividade biológica ou farmacológica^{1,2} tem acarretado uma disponibilidade cada vez maior de programas especializados (*softwares*) e equipamentos dedicados (*hardwares*). Quando tais tecnologias são aplicadas no planejamento de fármacos, os custos com pesquisa e desenvolvimento podem ser reduzidos em até 50%, durante o processo de inovação^{3,4}.

Frequentemente, os programas de modelagem molecular exigem conhecimento técnico do usuário, tanto na instalação quanto na utilização propriamente dita. Alguns programas, inclusive, necessitam de máquinas e sistemas operacionais específicos para serem instalados com sucesso. Além disto, estes programas normalmente possuem uma grande quantidade de configurações e opções de uso durante sua execução, o que pode requerer bastante tempo de aprendizado.

Com a inovação tecnológica, um número cada vez maior de equipamentos eletrônicos (celulares, *smartphones* e *tablets*) tem surgido para facilitar o nosso dia a

dia. O aumento da capacidade computacional e a mobilidade são importantes aspectos que impulsionaram o desenvolvimento de novos aplicativos tradicionalmente encontrados apenas em computadores pessoais (PCs). Iniciativas de desenvolvimento de aplicativos móveis na área científica já podem ser encontradas, inclusive na área de modelagem molecular⁵. Isto indica a necessidade que vem surgindo para novas abordagens "*in silico*", particularmente para a área de inovação terapêutica.

OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho é explorar outras plataformas computacionais além do tradicional computador pessoal, com o intuito de torná-las alternativas viáveis, funcionais e que agreguem valor dentro do processo de modelagem molecular com foco na inovação terapêutica.

Especificamente, o resultado deste trabalho consiste no desenvolvimento de um sistema computacional denominado de "*MODiMOL Virtual Workbench*", capaz de fornecer acesso a diferentes metodologias e técnicas de modelagem molecular por meio de aplicativos projetados especialmente para dispositivos móveis, em particular, para a plataforma Android⁶.

MATERIAIS E MÉTODOS

O sistema é desenvolvido em duas etapas: A primeira consiste no desenvolvimento da aplicação servidora (ou simplesmente "servidor") cujas responsabilidades incluem a execução e o monitoramento dos programas de modelagem molecular disponibilizados no sistema, armazenamento dos dados de entrada e saída de estruturas moleculares, controle de segurança (autenticação e autorização), além do acesso às funcionalidades por meio de uma interface Web onde o usuário, através de um navegador ("*browser*"), interage com o sistema solicitando a execução de serviços e visualizando os resultados obtidos.

A segunda etapa diz respeito ao desenvolvimento do aplicativo para dispositivos móveis sob a plataforma Android, cujo objetivo consiste no acesso às funcionalidades providas pelo servidor do sistema através da comunicação por meio de uma rede de acesso à Internet disponível (*Wifi* ou 3G, por exemplo).

O sistema também possibilita a inclusão de moléculas de interesse em seu banco de dados, para que estas possam ser utilizadas como dados de entrada na execução dos serviços de modelagem molecular solicitados pelos usuários. Neste sentido, a inclusão de novas moléculas é realizada através do "*download*" de estruturas diretamente disponíveis à partir de alguns bancos de dados públicos, tais como o PDB⁷, ChEMBL⁸, ChemSpider⁹ e PubChem¹⁰, onde cada estrutura é identificada através de um código único que é informado pelo usuário.

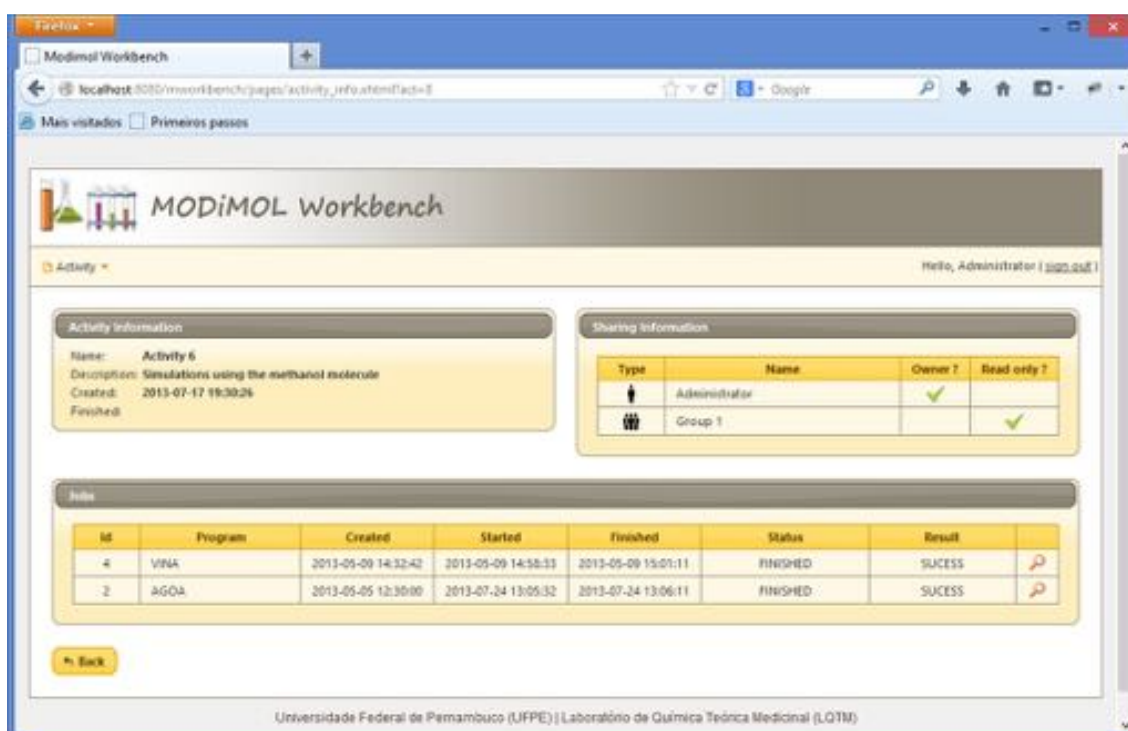
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estágio de desenvolvimento do sistema MODiMOL Virtual Workbench, os avanços já implementados na aplicação servidora podem ser destacados como

resultados deste processo: (i) a modelagem e a criação do banco de dados usado pelo sistema que tem como objetivo armazenar as informações a respeito de usuários, grupos de trabalho, programas de modelagem molecular disponíveis, execução dos programas (incluindo arquivos de entrada e saída de dados), estatísticas, entre outras informações; (ii) a elaboração do mecanismo de submissão/execução dos programas de modelagem molecular ("*jobs*"), que gerencia a execução dos programas solicitados pelos diversos usuários, atualizando o sistema com as informações geradas pela execução destes programas; e (iii) o desenvolvimento do serviço de cadastro de *jobs*, que através da interface *Web*, possibilita a submissão e visualização dos resultados gerados após a execução de um programa.

Vale ressaltar que a forma como está sendo desenvolvido o sistema existe suficiente flexibilidade para eventual inclusão de novos programas de modelagem molecular, pois uma das premissas do trabalho é tornar o sistema extensível a outros programas que não foram originalmente planejados para ele.

Na Figura 1 pode ser observada uma tela do sistema que apresenta as informações básicas dos programas de modelagem molecular (*jobs*) executados para um determinado usuário.



The screenshot shows the MODiMOL Workbench web interface. The browser address bar displays 'localhost:3030/vsworkbench/pages/activity_info.html?act=3'. The page title is 'MODiMOL Workbench' and the user is logged in as 'Hello, Administrator [1000,256]'. The interface is divided into several sections:

- Activity Information:** Name: Activity 6, Description: Simulations using the methanol molecule, Created: 2013-07-17 19:30:26, Finished: (empty).
- Sharing Information:** A table with columns: Type, Name, Owner?, Read only?. It lists 'Administrator' and 'Group 1' with checkmarks in the Owner? and Read only? columns.
- Jobs:** A table with columns: Id, Program, Created, Started, Finished, Status, Result. It shows two jobs, both with 'FINISHED' status and 'SUCESS' result.

Type	Name	Owner?	Read only?
	Administrator	✓	
	Group 1		✓

Id	Program	Created	Started	Finished	Status	Result	
4	VINA	2013-05-09 14:32:42	2013-05-09 14:58:33	2013-05-09 15:01:11	FINISHED	SUCCESS	
2	AGO4	2013-05-05 12:30:00	2013-07-24 13:05:32	2013-07-24 13:06:11	FINISHED	SUCCESS	

At the bottom of the page, it says 'Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) | Laboratório de Química Técnica Medicinal (LQTM)'.

FIGURA 1: Tela do sistema contendo informações de *jobs* submetidos por um usuário.

CONCLUSÕES

Este trabalho apresentou o desenvolvimento da plataforma computacional MODiMOL Virtual Workbench, cuja principal proposta consiste em disponibilizar uma infraestrutura integrada e intuitiva, composta por diversos serviços (programas) de modelagem molecular, para usuários interessados na aplicação de métodos *in silico* tipicamente utilizados em inovação terapêutica.

É importante ressaltar que a disponibilização dos serviços na forma de aplicativo para dispositivos móveis (particularmente, Android), agrega valor e conhecimento e desperta possibilidades de novos desenvolvimentos nesta direção.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica e à Universidade Federal de Pernambuco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 RICHON, A. B. An Introduction to Molecular Modeling. **Mathematech**, 1, 83, 1994.
- 2 HOPFINGER, A. J. Computer-assisted drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**, 28(9), 1133-1139, 1985.
- 3 GELDENHUYS, W. J. Optimizing the use of open-source software applications in drug discovery. **Drug Discovery Today**, 11(3-4), 127-132, 2006.
- 4 MCGEE, P. Modeling Success with In Silico Tools. **Drug Discovery and Development**, 8(4), 24-28.
- 5 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.
- 6 ANDROID. **Google Inc.**, 2013. Disponível em: <<http://www.android.com>>. Acesso em: 10 out. 2013.
- 7 PROTEIN DATA BANK. **Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB)**, 2013. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb>>. Acesso em: 10 out. 2013.
- 8 CHEMBL. **European Bioinformatics Institute (EBI)**, 2013. Disponível em: <<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>>. Acesso em: 10 out. 2013.
- 9 CHEMSPIDER. **Royal Society of Chemistry (RSC)**, 2013. Disponível em: <<http://www.chemspider.com>>. Acesso em: 10 out. 2013.
- 10 PUBCHEM. **National Center for Biotechnology Information (NCBI)**, 2013. Disponível em: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 10 out. 2013.



OS NÍVEIS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NA PLACENTA REPERCUTEM SOBRE OS NÍVEIS DE ÂNIONS PERÓXIDOS NO FÍGADO FETAL DE RATOS

D.R.M. GONÇALVES, R.S. AIRES, L.D. VIEIRA-FILHO, N.E. RIBEIRO,
L.P.N.C. BORGES, A.D.O. PAIXAO

Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Renal, Departamento de Fisiologia e Farmacologia,
Universidade Federal de Pernambuco. reginasouzaaires@gmail.com

Introdução: Os níveis elevados de estresse oxidativo têm sido apontados como causa, consequência ou exacerbação de doenças cardiovasculares. É possível que ocorra uma transferência de ânions peróxidos da mãe para o feto que seria responsável por programação de doenças cardiovasculares na idade adulta da prole. Investigamos se o estado antioxidante materno influencia os indicadores de estresse oxidativo na placenta e no fígado fetal. **Métodos:** Ratas Wistar grávidas foram tratadas com α -tocoferol, tempol ou com restrição dietética diária de 50% para esgotar as reservas antioxidantes. **Resultados e Discussão:** Os antioxidantes administrados recuperaram o peso corpóreo fetal nas mães submetidas à restrição dietética. Enquanto o α -tocoferol reduziu os níveis de malondialdeído (MDA) na placenta das ratas controle, este antioxidante ou o tempol aumentou os níveis de MDA na placenta de mães com restrição dietética. O tempol ou o tempol + α -tocoferol foram capazes de aumentar os níveis de glutathiona reduzida (GSH) na placenta de ratas controle, no entanto, o tempol + α -tocoferol diminuíram os níveis de GSH na placenta de mães restritas. Os níveis de MDA apresentaram-se aumentados no fígado fetal de mães restritas tratadas com tempol, assim como, o GSH apresentou-se diminuído no fígado fetal de mães restritas tratadas com tempol + α -tocoferol. **Conclusão:** Embora o α -tocoferol tenha diminuído a peroxidação lipídica da placenta, ele não alterou o padrão de estresse oxidativo no fígado fetal. O tempol reduziu os níveis de estresse oxidativo na placenta e no fígado fetal de mães controles, no entanto teve efeito simetricamente oposto nas mães submetidas à restrição dietética. Assim, um paralelo no padrão de estresse oxidativo entre placenta e fígado fetal foi observado apenas nas mães tratadas com tempol.

Apoio: CAPES, CNPq, FACEPE.

Palavras-chave: Desenvolvimento fetal, restrição dietética, estresse oxidativo, tempol, α -tocoferol.



PADRONIZAÇÃO FITOQUÍMICA E HISTOQUÍMICA DE *Operculina macrocarpa* (LINN) URB. (CONVOLVULACEAE)

¹B.M. NUNES,²A.L. VASCONCELOS,³A.S.C.O. SANTANA,⁴F.C.L SILVA,⁵L.A.L SOARES,⁶K.P. RANDAU,

¹Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil. barbaramnunes91@gmail.com

^{2,3,5,6}Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

⁴Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

RESUMO

A espécie *Operculina macrocarpa*, conhecida como jalapa, tem suas raízes procuradas pela população devido as suas propriedades farmacológicas, atuando como laxante e regularizadora da menstruação. Amostras das raízes adquiridas no comércio de Recife-PE, foram submetidas a testes fitoquímicos e histoquímicos e comparadas com uma amostra padrão. Através da análise fitoquímica de um extrato vegetal da raiz, foram confirmadas a presença de polifenóis, mono e sesquiterpenos. Testes histoquímicos foram realizados para identificação de alguns compostos onde foi confirmada a presença de amido, compostos fenólicos, lipídeos e oxalato de cálcio. De acordo com a literatura consultada os resultados obtidos estão de acordo com a espécie, o que confirma que as amostras analisadas são autênticas.

INTRODUÇÃO

A família Convolvulaceae possui aproximadamente 50 gêneros e 2000 espécies, dos quais 18 gêneros e aproximadamente 300 espécies são encontradas em nosso país (SOUZA & LORENZI, 2008). Na região nordeste do Brasil, destaca-se a espécie *Operculina macrocarpa* (Linn) Urb, conhecida pelos nomes populares batata-de-purga, jalapa ou jalapa-do-Brasil, apresentando frutos secos característicos, utilizados em alguns tipos de ornamentações (MATOS, 2000).

Suas raízes, tuberosas, são bastante procuradas pela população para fins medicinais devido às suas propriedades farmacológicas principalmente como laxante e regularizadora da menstruação (MICHELIN & SALGADO 2004).

Considerando as diversas semelhanças entre as diferentes espécies do gênero *Operculina*, fica evidente a importância de criar padrões fitoquímicos e histoquímicos, para que a mesma não seja confundida.

OBJETIVOS

Diante das semelhanças entre as diferentes espécies deste gênero este trabalho tem como objetivo realizar a caracterização fitoquímica e histoquímica da raiz de *Operculina macrocarpa*.

MATERIAIS E MÉTODOS

As raízes obtidas no mercado foram utilizadas para preparar um extrato metanólico 0,1%, atingindo por decocção. Para estudos fitoquímicos o extrato foi submetido a testes em cromatografia em camada delgada, sendo aplicado em placas de sílica gel para identificação dos principais grupos de metabólitos. Para encontrar triterpenos e esteroides foi utilizado o padrão β -sitosterol, a fase móvel foi o sistema tolueno: acetato de etila (90:10) e para revelar a placa utilizou-se o revelador Liebermann-Buchard. A identificação de polifenóis foi realizada com o padrão rutina, o sistema foi tolueno: acetato de etila: ácido fórmico (5:4:2) em seguida a placa foi revelada com NEU. No teste para alcaloides foi utilizado o padrão pilocarpina, o sistema foi tolueno: acetato de etila: ácido fórmico (5:4:2) sendo a placa revelada com Dragendorff. Mono e sesquiterpenos foram estudados, o padrão timol foi escolhido, o sistema foi tolueno: acetato de etila: ácido fórmico (6:4:1) e a placa foi revelada com vanilina sulfúrica, depois aquecida.

Na histoquímica as amostras (raiz) frescas foram cortadas transversalmente à mão livre, sendo montadas em lâminas semipermanentes com glicerina 50% e reagentes específicos para cada tipo de reação. As mesmas foram analisadas e fotografadas em microscópio óptico com câmera acoplada. Onde foram comparadas com um controle, feito sem os reagentes específicos. Para identificação de amido os cortes foram submetidos à reação com reagente lugol. Para visualização de compostos fenólicos foi adicionado reagente cloreto férrico sobre os cortes. Para identificação de lipídeos, cutina e suberina foi feito o teste com sudam III. A identificação de oxalato de cálcio foi obtida com os cortes e uma solução de ácido clorídrico 10%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A triagem fitoquímica preliminar de uma droga vegetal em análise pode confirmar alguns metabólitos (LÚCIO, 2000). Estudos histoquímicos permitem associar as características anatômicas com a ocorrência dos princípios ativos característicos de uma espécie, permitindo uma melhor investigação da matéria-prima-vegetal (SALVI JÚNIOR et al., 2009; SOUZA-MOREIRA et al., 2009).

Nos estudos realizados na fitoquímica o resultado para triterpenos e esteroides foi negativo diferente de outros estudos realizados com *Ipomoea subincana*, que faz parte da mesma família Convolvulaceae, apresentando esse grupo de compostos (MEIRA et al, 2008). Em relação ao grupo dos polifenóis foi identificada a presença do grupo. Assim como o gênero *Operculina hamiltonii*, que também apresenta essa classe de metabólitos (LOBO et al, 2010). No teste para alcaloides o resultado foi negativo. Confirmando outros estudos fitoquímicos realizados com a raiz de *Operculina*

macrocarpa (MICHELIN, 2004). O grupo de metabólitos mono e sesquiterpenos também foram visualizados.

Nos testes histoquímicos ficou evidente que os grãos localizados no parênquima são de amido como afirma estudos feitos com *Operculina tuberosa* Meisn (GOMES et al, 2009). O teste com cloreto férrico permitiu visualizar a produção de uma coloração verde escura em algumas células localizadas próximas as células do súber sendo a confirmação de compostos fenólicos presentes nas mesmas. O teste realizado com sudam III comprovou que as células de resina possuem lipídeos. Enquanto no teste para identificação de oxalato de cálcio foi observado que as drusas se dissolveram sem a presença de efervescência, o que confirma que essas drusas são compostas por oxalato de cálcio.

CONCLUSÕES

Os testes realizados para estudos fitoquímicos e histoquímicos da raiz de *Operculina macrocarpa*, mostraram que todas as amostras obtidas no mercado estiveram de acordo com a literatura consultada o que confirma a autenticidade das três amostras estudadas. É importante ressaltar que apesar das semelhanças entre o gênero *Operculina*, as características peculiares desta espécie dificulta o processo de falsificação nesta matéria-prima vegetal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GOMES, A.A.M; SILVA P.L.; SOARES, S.A.; SILVA C.E.M.; GALLÃO, M.I.; GERMANI, R.; RICARDO, N.M.M.P.S. Isolation and physico-chemical and rheological characterisation of the Brazilian jalap starch (*Operculina tuberosa* Meisn.). Carbohydrate Polymers, vol. 77, p 885-890, 2009.

LÔBO, K.M.S; ATHAYDE, A.C.R; SILVA, A.M.A; RODRIGUES, F.F.G; LÔBO, I.S; BEZERRA, D.A.C; COSTA, J.G.M. Avaliação da atividade antibacteriana e prospecção fitoquímica de *Solanum paniculatum* Lam. E *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples, do semi-árido paraibano. Revista brasileira de plantas medicinais, vol. 12, n. 2, p 227-235, 2010.

LÚCIO, E.M.R.A. Triagem farmacológica e triagem fitoquímica. In: SHARAPIN, N.; ROCHA, L.M.; CARVALHO, E.S.; LÚCIO, E.M.R.A.; SANTOS, E.V.M.; ALMEIDA, J.M.L. Fundamentos de tecnologia de produtos fitoterápicos. Santafê de Bogotá: Programa Iberoamericano de Ciências e Tecnologia para o Desenvolvimento, 2000. p. 197, 200.

MATOS, F.J.A. Plantas Medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. Fortaleza: EUFC, Ed.2, 2000, 346p.

MEIRA, M; DAVID, J.M; DAVID, J.P; ARAÚJO, S.V; REGIS, T.L; GIULIETTI, A.M; QUEIRÓZ, L.P. Constituintes químicos de *Ipomoea subincana* MEISN. (CONVOLVULACEAE). Química Nova, vol. 31, n. 2, p 751-754, 2008.

MICHELIN, D.C. Análise Fitoquímica e Ensaio Biológicos da Raiz de *Operculina macrocarpa* (L.) Urb. (CONVOLVULACEAE).2004. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

SALVI JÚNIOR, A.; GODINHO, C.C.; SILVA, A.M.L.; LEGRAMANDI, V.H.P.; SACRAMENTO, L.V.S. Análise histoquímica e triagem fitoquímica preliminar de *Schinus terebinthifolius* Raddi: um estudo comparativo. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FARMACOGNOSIA, 7., 2009, Maringá. Anais... Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, Maringá, CD-ROM, 2009.

SOUZA-MOREIRA, T.M.; MOREIRA, R.R.D.; SACRAMENTO, L.V.S.; PIETRO, R.C.L.R. Histochemical, phytochemical and biological screening of *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (Myrtaceae) leaves. Rev Bras Farmacog, 2009.

SOUZA, V. C., LORENZI, H. Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2008, 616p.



PROPRIEDADES TERAPÊUTICAS DA PLANTA CONFREI (*Symphytum officinale*): UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

¹C.F.C, RODRIGUES; ²ARAÚJO, B.C.; ¹LEÃO, W.F.; ²NUNES, T.R.F.; ²VIANA, D.C.F.

¹Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Pernambuco. carla192@hotmail.com.

²Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco

RESUMO

A utilização de plantas medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. Pesquisas realizadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que mais da metade da população mundial faz uso de ervas medicinais, em especial, nos países desfavorecidos, principalmente devido às preferências culturais e ao baixo custo. Comparada aos medicamentos sintéticos, a toxicidade das plantas medicinais pode parecer trivial, mas é um problema sério de saúde pública. *Symphytum officinale* L. é uma erva da família Boraginaceae, de clima temperado, originária da Europa e da Ásia. Foi naturalizada nos Estados Unidos e América do Sul. No Brasil, adaptou-se às regiões de clima tropical, ocorrendo entre os estados do Paraná, Amazonas e em São Paulo. É conhecida popularmente como confrei, consólida-maior, erva-do-cardeal e orelha-de-asno. Utilizada na medicina tropical, essa planta atua como cicatrizante, devido à presença da alantoína; porém, também possui alcalóides pirrolizidínicos, os quais são comprovadamente hepatotóxicos e carcinogênicos.

INTRODUÇÃO

As espécies vegetais têm grande importância para o desenvolvimento de novos fármacos, devido à grande diversidade estrutural dos metabólitos secundários, muitas vezes responsáveis pela atividade terapêutica da planta.

O uso milenar de plantas medicinais, entretanto, mostrou, ao longo dos anos, que determinadas plantas apresentam substâncias potencialmente perigosas. Um exemplo importante é o do confrei (*Symphytum officinale*).

No Brasil, na década de 80, o confrei (*Symphytum officinale* L. Boraginaceae) foi disseminado como planta para a cura de diversas doenças, inclusive o câncer. Estudos posteriores demonstraram o risco do uso interno desta planta, altamente

hepatotóxica devido a alcalóides pirrolizidínicos (BRASIL, 1992; BARRACA, 1999; SRICKEL; SEITZ, 2000). No entanto, a raiz foi recomendada pela RE nº 89 (ANVISA, 2004) na forma de extrato, atuando como cicatrizante de uso tópico devido à presença de alantoína, substância ativa anti-inflamatória (BLUMENTHAL, 1998; PDR, 2000) e regeneradora tissular (LOOTS; LOOTS; WS, 1979; PDR, 2000).

O intenso apelo comercial causado pelo forte movimento cultural dos naturalistas aqueceu, em todo o mundo, o consumo de plantas medicinais, sem respeito aos limites de uso de fitoterápicos e sem informações adequadas sobre efeitos colaterais, representando riscos para a saúde humana (MACIEL et al., 2002).

O trabalho está em andamento e prevê um estudo para a realização da monografia da planta, já que esta não se encontra depositada na ANVISA.

OBJETIVOS

O objetivo deste estudo consiste na avaliação das influências positivas e negativas causadas pelas propriedades terapêuticas da planta *Symphytum officinale*, popularmente conhecida como confrei. Este trabalho reuniu uma revisão de diversos artigos e dissertações, com o intuito de expressar a importância e alertar sobre o cuidado que se deve ter no emprego desta planta.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi obtido a partir de uma revisão de artigos e periódicos de revistas científicas, visando a busca de informações sobre as atividades terapêuticas do confrei. Foi realizada uma pesquisa bibliográfica para identificar os estudos existentes a partir de quatro buscas. A primeira consistiu na pesquisa do potencial terapêutico geral da planta. A segunda, na atuação da planta como cicatrizante e anti-inflamatório. A terceira resumiu-se na atividade tóxica da planta quando ingerida. A quarta e última avaliação consistiu na busca da ação carcinogênica do confrei.

Foram utilizados como palavras-chave: confrei, potencial terapêutico, anti-inflamatório, ação cicatrizante, toxicidade e carcinogênese. Para a busca foram utilizados os periódicos Revista Brasileira de Plantas Medicinais, Revista Brasileira de Farmacognosia e de artigos retirados da base de dados contidos na SCIELO, abrangendo os períodos de 2012, 1986 a 2006 e 2005 a 2011, respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maioria dos artigos analisados, 21 citaram os aspectos cicatrizantes do confrei, atribuída à substância alantoína, responsável pelo estímulo do crescimento de tecidos novos e saudáveis. Em relação à hepatotoxicidade, cerca de 12 artigos comentaram sobre a toxicidade do confrei devido à alcalóides pirrolizidínicos; e, em comparação às demais

pesquisas, 7 apresentaram uma discussão sobre a toxicidade substancial após a ingestão, que pode induzir à carcinogênese.

O confrei apresenta diversas propriedades terapêuticas, sendo atualmente empregado na fitoterapia como anti-inflamatório, devido à presença de taninos e mucilagens; também possui ação cicatrizante, devido à presença da substância alantoína. Estudos demonstram que a alantoína atua como substância regeneradora, estimulando o crescimento de tecidos novos e sadios (DUARTE, 1984; FALCÃO et al., 2005). Em virtude desse potencial, recomenda-se a incorporação de extrato fluido de *S. officinale* em cremes evanescentes, a fim de potencializar a ação umectante e emoliente de tais preparações (SOARES et al., 1986). Outras propriedades descritas são: anticoagulante (CHIRYATEY; RUSAKOVA, 1994), bactericida, antifúngica e hipertensiva (SENER; ATTA-UR, 1994).

Em contrapartida, a planta é desaconselhada para uso interno, devido à toxicidade atribuída aos alcalóides pirrolizidínicos (MENGUE et al., 2001). Apesar disso, o confrei é utilizado, entre outras espécies vegetais, de forma inconsequente. Plantas que contêm alcalóides pirrolizidínicos, como o confrei, têm sido associadas à toxicidade substancial após ingestão, resultando em sintomas como: anorexia, letargia, dor abdominal com posterior destruição dos hepatócitos, carcinogênese e trombose (COUET, et al., 1996; NAVARRO MOLL, 2000; STICKEL; SEITZ, 2000).

Os alcalóides pirrolizidínicos presentes na planta são as substâncias que mais preocupam os pesquisadores, pois têm provocado acidentes de intoxicação nos seres humanos. A importância de se verificar a presença desses alcalóides deve-se ao fato de que o confrei é uma erva largamente utilizada para fins terapêuticos, pois proporciona inúmeros benefícios, tais como propriedades cicatrizantes, anti-inflamatórias e hidratantes. Em contrapartida, o uso indiscriminado dessa planta, através de saladas ou chás, pode levar à sintomas desagradáveis.

Portanto, torna-se recomendável que ervas como o confrei, que apresentam benefícios e malefícios, deixem de ser comercializadas indiscriminadamente, passando a ser comercializadas em farmácias sob a responsabilidade de um profissional capaz de garantir a qualidade do produto.

CONCLUSÕES

Apesar do apelo naturalista, diversas plantas medicinais são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades terapêuticas. Comparada aos medicamentos sintéticos, a toxicidade das plantas medicinais pode parecer trivial, mas é um problema sério de saúde pública. O confrei é um dos exemplos mais característicos da controvérsia que envolve as plantas medicinais. Ele pode apresentar diferentes respostas fisiológicas, dependendo da quantidade e do meio com o qual é consumido. Outrossim, o uso de medicação natural não implica em ausência de efeitos colaterais ou tóxicos; desta forma, cabe ao poder público, através de seus órgãos competentes, realizar e/ou reforçar campanhas de conscientização para o uso racional de medicamentos, sejam eles naturais ou sintéticos.

Os resultados obtidos neste trabalho serão complementares ao posterior estudo fitoquímico da planta para a produção de sua monografia, onde eventualmente será depositada na ANVISA.

AGRADECIMENTOS

Incubadora de Tecnologias Sociais da UFPE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOCHNER, R.; FISZON, J.T.; ASSIS, M.A.; AVELAR, K.E.S.: Problemas associados ao uso de plantas medicinais comercializadas no Mercado de Madureira, município do Rio de Janeiro, Brasil. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.14, n.3, p.537-547, 2012.

JÚNIOR, J.O.C.S.; VIEIRA, J.L.F.; BARBOSA, W.L.R.; PEREIRA, N.L.: Caracterização físico-química do extrato fluido e seco por nebulização de *Symphytum officinale* L. Revista Brasileira de Farmacognosia 16(supl.): 617-677, Dez. 2006.

JUNIOR, V.F.V.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M.: Plantas medicinais: cura segura? Quím. Nova vol.28, nº 3. São Paulo. May/June, 2005.

LÓPEZ, C.A.A: Considerações gerais sobre plantas medicinais. Ambiente: Gestão e Desenvolvimento, 1(1): 19-27. 2006.

MENGUE, S.S.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.: Uso de plantas medicinais na gravidez. Revista Brasileira de Farmacognosia. 11(1), 21-35. 2001.

OLIVEIRA, F.Q.; GONÇALVES, L. A.: Conhecimento sobre plantas medicinais e fitoterápicos e potencial de toxicidade por usuários de Belo Horizonte, Minas Gerais. Revista Eletrônica de Farmácia Vol 3 (2), 36-41, 2006.

OLIVEIRA, L.A.; BARROS, P.P.: Avaliação da atividade regeneradora de implantes intraósseo e subcutâneo de Guta- Percha revestidos de extrato de *Symphytum officinale* L. (confrei). Anais do XVI Encontro de Iniciação Científica e I Encontro de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação da PUC-Campinas. 2011.

SAITO, M.; OLIVEIRA, F. Confrei – virtudes e problemas. Revista Brasileira de Farmacognosia. vol.1 no.1 São Paulo 1986.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. et al.: O azul de Renoir no céu de Galileu. Revista de Farmacognosia: da planta ao medicamento. 4a. ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora da Universidade UFRS / Editora da UFSC, 2002, 824 p.

TOLEDO, A.C.O; DUARTE, M.R.; NAKASHIMA, T.: Análise farmacognóstica da droga e do extrato fluido das folhas de *Symphytum officinale* L. (Boraginaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia, v.13 supl. 2, p. 01-02, 2003.

TOLEDO, A.C.O.; DUARTE, M.R.; NAKASHIMA, T.: Caracterização morfoanatômica de raiz e rizoma de *Symphytum officinale* L. (Boraginaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia 16(2): 185-191, Abr./Jun. 2006.



SOBRECARGA MATERNA DE SÓDIO, EM RATOS, REDUZ ANGIOGÊNESE PLACENTÁRIA

¹N.E. RIBEIRO, ¹D.M.R GONÇALES, ¹L.P.N.C. BORGES, ¹R.S. AIRES, ¹E.V. CABRAL, ¹L.D. VIEIRA-FILHO, ²A.F. SOARES, ¹A.D.O. PAIXÃO

¹Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Renal, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco. natalierrodrigues@gmail.com

²Laboratório de Fisiologia Animal, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco

Introdução: Doenças cardiovasculares programadas intrauterinamente podem ser devidas ao estresse oxidativo placentário. Investigamos se a sobrecarga de NaCl, durante a gravidez, afeta a angiogênese placentária e o estresse oxidativo na placenta e no fígado do feto. **Métodos:** Ratas Wistar, foram mantidas com salina 1,8% substituindo a água de beber a partir dos 70 de vida, durante o acasalamento aos 90 dias até o 20º dia de prenhez, quando placentas e fetos foram coletados. No primeiro dia de gestação foram tratadas com α -tocoferol, tempol ou α -tocoferol + tempol. **Resultados e Discussão:** A suplementação com NaCl diminuiu a expressão de VEGF e de seu receptor, o flt-1, bem como, reduziu os níveis de malonildialdeído (MDA) e aumentou os níveis de glutathiona reduzida (GSH) na placenta e no fígado fetal. O α -tocoferol levou a uma redução adicional nos níveis de MDA nesses órgãos, mas diminuiu os níveis de GSH. De maneira diferente, o tempol aumentou os níveis de MDA e diminuiu os níveis de GSH na placenta e no fígado fetal. O tratamento com os antioxidantes não alterou a expressão do flt-1, porém o tempol aumentou a expressão de VEGF. **Conclusão:** Os níveis reduzidos de MDA na placenta e no fígado do feto de mães submetidas a sobrecarga de NaCl podem ser devidos à angiogênese diminuída. A ação paradoxal, pro-oxidante, do tempol indica que a reserva antioxidante nas mães submetidas a sobrecarga de sódio é limitada. Além disso, o paralelo entre o padrão de estresse oxidativo placentário e do fígado fetal sugere que ânions superóxidos transferidos a partir das mães podem ser importantes na programação das doenças cardiovasculares.

Apoio: CAPES, CNPq, FACEPE.

Palavras-chave: estresse oxidativo, fatores angiogênicos, placenta, sobrecarga de sódio

RESUMOS PREMIADOS

A comissão científica do 3º Encontro Brasileiro para Inovação Terapêutica – EBIT parabeniza os autores pelos os excelentes resumos apresentados.



ESTUDO IMPEDIMÉTRICO DA BIOATIVIDADE DO SISTEMA CONSTITUÍDO POR LECTINA CRAMOLL E NANOCOMPÓSITO DE OURO E POLIANILINA PARA DIAGNÓSTICO DA DENGUE

Autores: K.Y.P.S AVELINO, C.A.S. ANDRADE, C.P. DE MELO, M.T.S CORREIA, L.C.B.B COELHO, M.L. NOGUEIRA e M.D.L. OLIVEIRA.

Área: Outros



AUMENTO NOS NÍVEIS SÉRICOS DE INTERLEUCINA-9 ASSOCIADO COM A GRAVIDADE DA PSORÍASE

Autores: P.R.G. CARDOSO, E.A. LIMA, M.A. LIMA, M.C. PEREIRA, M.J.B.M. REGO, C. MARQUES, I.R. PITTA, A.L.B.P. DUARTE e M.G.R. PITTA.

Área: Alvos terapêuticos e biomarcadores



DESENVOLVIMENTO DE DUAS PLATAFORMAS BIOTECNOLÓGICAS PARA PRODUÇÃO DE ESTRATÉGIAS VACINAIS CONTRA O PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

Autores: F.C. MARIZ, L. M. NASCIMENTO e A. C. FREITAS.

Área: Biotecnologia farmacêutica



EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS DAS RAÍZES DA *LANTANA RADULA* E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE SEUS FENILETANÓIDES GLICOSÍDICOS

Autores: M. REGO BARROS-JUNIOR, M. L. C. M. GONÇALVES, R. R. MARINHO, J. DE S. SANTOS, C. A. DOS SANTOS, J. G. DE SENA-FILHO, R. P. M. FERNANDES e S. M. THOMAZZI.

Área: Química medicinal e produtos naturais



ESTABILIZAÇÃO DE PONTOS QUÂNTICOS EM FORMAS FARMACÊUTICAS GELIFICANTES PARA APLICAÇÃO EM TERAPIA FOTODINÂMICA

Autores: V. A. ALMEIDA, O. S. VIANA, B. S. SANTOS e A. FONTES.

Área: Tecnologia farmacêutica e biofarmácia