

# Biomedicina e Farmácia: Aproximações 2

---

Letícia Bandeira Mascarenhas Lopes  
Tiago Sousa Melo  
(Organizadores)

---



**Atena**  
Editora

Ano 2019

Letícia Bandeira Mascarenhas Lopes  
Tiago Sousa Melo  
(Organizadores)

# Biomedicina e Farmácia: Aproximações 2

Atena Editora  
2019

2019 by Atena Editora

Copyright © da Atena Editora

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Diagramação e Edição de Arte: Natália Sandrini e Lorena Prestes

Revisão: Os autores

#### Conselho Editorial

Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas  
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília  
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa  
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná  
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista  
Profª Drª Deusilene Souza Vieira Dall’Acqua – Universidade Federal de Rondônia  
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria  
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice  
Profª Drª Juliane Sant’Ana Bento – Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense  
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão  
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará  
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista  
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas  
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande  
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

#### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)

B615 Biomedicina e farmácia [recurso eletrônico] : aproximações 2 /  
Organizadores Letícia Bandeira Mascarenhas Lopes, Tiago  
Sousa Melo. – Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2019. –  
(Biomedicina e Farmácia; v. 2)

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-85-7247-323-1

DOI 10.22533/at.ed.231191504

1. Biomedicina. 2. Ciências médicas. 3. Farmácia. I. Lopes,  
Letícia Bandeira Mascarenhas. II. Melo, Tiago Sousa. III. Série.

CDD 610

**Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422**

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de  
responsabilidade exclusiva dos autores.

2019

Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos  
autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)

## APRESENTAÇÃO

Farmácia e Biomedicina integram o time das ciências da saúde que constituem nas áreas que estudam sobre a vida, a saúde e a doença. No qual focam na manutenção e na melhoria da saúde para o indivíduo, grupos específicos e comunidades.

A obra “Biomedicina e Farmácia: Aproximações” consiste de uma série de livro (E-book) de publicação da Atena Editora, em seus 28 capítulos de artigos científicos do volume I, a qual abordam temáticas atualizadas de diferentes âmbitos que vão desde relatos de casos até a análise de medicamentos, plantas e microbiologia, entre outros.

Sendo assim, almejamos que este livro possa contribuir com informações pertinentes e atualizadas para os estudantes e profissionais da área de farmácia e biomedicina, oportunizando a ampliação dos conhecimentos sobre o tema.

Desejamos a todos uma boa leitura!

Letícia Bandeira Mascarenhas Lopes

Tiago Sousa Melo

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
A IMPORTÂNCIA DA ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA PRESTADA AOS PORTADORES DE DIABETES MELLITUS TIPO 1	
Gisele Lopes Cavalcante	
Maria Camila Leal de Moura	
José Virgulino de Oliveira Lima	
Yara Maria da Silva Pires	
Aline Suelen Silva Maria	
Ana Rita de Sousa França	
Izabela Borges de Carvalho	
Polyanna dos Santos Negreiros	
<b>DOI 10.22533/at.ed.2311915041</b>	
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>15</b>
ANÁLISE BACTERIOLÓGICA DE QUEIJOS ARTESANAIS COMERCIALIZADOS NAS FEIRAS LIVRES DO MUNICÍPIO DE CARUARU-PE	
Jucélia Ivonete dos Santos	
Valéria da Silva Tabosa	
Agenor Tavares Jácome Júnior	
<b>DOI 10.22533/at.ed.2311915042</b>	
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>26</b>
ANÁLISE DA EFICÁCIA DE PROGRAMAS DE CONTROLE DA DENGUE NO MUNICÍPIO DE BOA VISTA DO ESTADO DE RORAIMA	
Fabiana Nakashima	
Ítallo de Souza Almeida	
Tulio Marroquim Galvão	
Iran Barros de Castro	
Nathalia Bittencourt Graciano	
Isabella Maravalha Gomes	
Ana Iara Costa Ferreira	
Bianca Jorge Sequeira Costa	
Leila Braga Ribeiro	
Wagner do Carmo Costa	
Fabiana Zimmermann dos Santos	
Luis Enrique Galan Bermejo	
Rodrigo de Barros Feltran	
<b>DOI 10.22533/at.ed.2311915043</b>	
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>34</b>
ANÁLISE DO PERFIL DOS PACIENTES SUBMETIDOS AO EXAME DE MICROALBUMINÚRIA REALIZADO NO LABORATÓRIO CENTRAL DE BIOMEDICINA NO PRIMEIRO TRIMESTRE DE 2018	
Flávia Karen Carvalho Garcia	
Marcos Emanuel Vilanova da Costa	
Jessica Santana de Oliveira	
Layanne Barbosa dos Santos	
Larissa Lisboa Rêgo Brito	
Rachel Freire Boaventura	
<b>DOI 10.22533/at.ed.2311915044</b>	

**CAPÍTULO 5 ..... 40**

ANÁLISE HISTOQUÍMICA DA LÂMINA FOLIAR DE *Azadirachta indica* A.Juss

Rafaela Damasceno Sá  
Felipe Ribeiro da Silva  
Girllene da Silva Cavalcanti  
Karina Perrelli Randau

**DOI 10.22533/at.ed.2311915045**

**CAPÍTULO 6 ..... 46**

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA GOMA DE MANDIOCA COMERCIALIZADA NA FEIRA LIVRE DO BAIRRO ALVORADA II NA CIDADE DE MANAUS-AM

Uziel Ferreira Suwa  
Elias da Silva Lemos  
Andreia Ferreira Silva

**DOI 10.22533/at.ed.2311915046**

**CAPÍTULO 7 ..... 53**

APROVEITAMENTO DA SEMENTE DE ABÓBORA (*Cucurbita moschata*) NO DESENVOLVIMENTO DE CREME HIDRATANTE ESFOLIANTE

Mariana Gavioli dos Reis Pena  
Tatiane Amorim Lima  
Marcone Augusto Leal de Oliveira  
Guilherme Diniz Tavares  
Fabiano Freire Costa  
Paula Rocha Chellini

**DOI 10.22533/at.ed.2311915047**

**CAPÍTULO 8 ..... 68**

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PLANTAS DE USO POPULAR NO BRASIL: CAMOMILA (*MATRICARIA CHAMOMILLA*), ERVA DOCE (*PIMPINELLA ANISUM*) E JUCÁ (*CAESALPINIA FERREA*)

Caroline Mendes Santos  
Carina Assis Lima Da Silva  
Carolina Azevedo Amaral  
Joyce dos Santos Brasil  
Daniela Soares Leite

**DOI 10.22533/at.ed.2311915048**

**CAPÍTULO 9 ..... 82**

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PLANTAS DE USO POPULAR NO BRASIL: GOIABA (*PSIDIUM GUAJAVA* L.) E MELÃO DE SÃO CAETANO (*MOMORDICA CHARANTIA*)

Daniela Soares Leite  
Caroline Mendes Santos  
Carina Assis Lima Da Silva  
Carolina Azevedo Amaral

**DOI 10.22533/at.ed.2311915049**

**CAPÍTULO 10 ..... 93**

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DA FOLHA DE *Bauhinia forficata* Link (PATA DE VACA)

Clara Santos Shen  
Eduarda dos Santos Lima  
Mariana Oliveira Arruda

**DOI 10.22533/at.ed.23119150410**

**CAPÍTULO 11 ..... 104**

AVALIAÇÃO DA CITOXIDADE, MUTAGENICIDADE E TOXICIDADE DO EXTRATO ETANÓLICO DOS FRUTOS DO *Lycium barbarum* (GOJI BERRY) POR MÉTODOS *Allium cepa* EM CÉLULAS EUCARIONTES

Ogenya Rafaela Bispo de Souza  
Francisca dos Santos  
Manoel Pinheiro Lúcio Neto

**DOI 10.22533/at.ed.23119150411**

**CAPÍTULO 12 ..... 114**

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO RASTREIO DA TOXOPLASMOSE DURANTE A GESTAÇÃO EM RORAIMA

Jéssyca Magalhães de Matos  
Wagner do Carmo Costa  
Ana Iara Costa Ferreira  
Fabiana Nakashima  
Leila Braga Ribeiro  
José Geraldo Ticianeli  
Camila Sampaio Florença Santana  
Allaelson dos Santos de Moraes  
Gabriela Moraes Gomes  
Fernanda Zambonin  
Bianca Jorge Sequeira

**DOI 10.22533/at.ed.23119150412**

**CAPÍTULO 13 ..... 127**

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS HEMOCOMPONENTES NO HEMOCENTRO COORDENADOR DE SERGIPE

Flávia Karen Carvalho Garcia  
Fátima de Jesus Santos  
Jéssica Araújo Menezes  
Larissa Lisboa Rêgo Brito  
João Victor Ferreira Santana  
Raphael Davisson Lopes Santos  
Weber De Santana Teles

**DOI 10.22533/at.ed.23119150413**

**CAPÍTULO 14 ..... 139**

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ANEMIAS EM EXAMES HEMATOLÓGICOS DE UMA POPULAÇÃO ATENDIDA POR PROJETO SOCIAL E SUA CORRELAÇÃO COM VALORES DE REFERÊNCIA

Gleice dos Anjos Santos  
Athos de Barros Vieira  
Jonas Alves Paiva  
Maria Helena Rodrigues De Mendonça

**DOI 10.22533/at.ed.23119150414**

**CAPÍTULO 15 ..... 152**

AVALIAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ISOLADOS DO COMPLEXO *Candida parapsilosis* CAUSADORES DE CANDIDEMIA NO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO (HC-FMRP)

Márcia Eliana da Silva Ferreira  
Heliara Maria Spina Canela  
Bárbara Cardoso

**DOI 10.22533/at.ed.23119150415**

**CAPÍTULO 16 ..... 169**

BIORREMEDIAÇÃO DE MANGUEZAL CONTAMINADO COM PETRÓLEO COM OBTENÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM BIOPOLÍMEROS E PEPTÍDIOS CRISTALIZADOS

Odete Gonçalves  
Paulo Fernando de Almeida  
Cristina Maria A. L. T. M. H. Quintella  
Ana Maria Álvares Tavares da Mata

**DOI 10.22533/at.ed.23119150416**

**CAPÍTULO 17 ..... 186**

BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS OF THE YEAST CELL WALL WITH EMPHASIS ON THE DEVELOPMENT OF FEED ADDITIVES

Carina Maricel Pereyra  
Mariana Angélica Montenegro  
Lilia Reneé Cavaglieri

**DOI 10.22533/at.ed.23119150417**

**CAPÍTULO 18 ..... 204**

CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E HISTOQUÍMICA DA LÂMINA FOLIAR DE *Calotropis procera* (Aiton) W.T.Aiton

Rafaela Damasceno Sá  
Adolfo Santos da Silva  
Deysielle Maria dos Santos  
Karina Perrelli Randau

**DOI 10.22533/at.ed.23119150418**

**CAPÍTULO 19 ..... 211**

CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E HISTOQUÍMICA DE *Schinus molle* L.

Luciano de Medeiros Dantas  
Rafaela Damasceno Sá  
Larisse Bianca Soares Pereira  
Karina Perrelli Randau  
Flávia Carolina Lins da Silva

**DOI 10.22533/at.ed.23119150419**

**CAPÍTULO 20 ..... 223**

CARACTERIZAÇÃO FARMACOGNÓSTICA E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE-DAD PARA *FINGERPRINT* DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM *Alternanthera brasiliana*

José Marcos Teixeira de Alencar Filho  
Hyany Andreysa Pereira Teixeira  
Iure Silva de Carvalho  
Pedrita Alves Sampaio  
Emanuella Chiara Valença Pereira  
Isabela Araujo e Amariz  
Larissa Araújo Rolim  
Edigênia Cavalcante da Cruz Araújo

**DOI 10.22533/at.ed.23119150420**

**CAPÍTULO 21 ..... 235**

CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DE PLANTAS DO SEMIÁRIDO NORDESTINO COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Ítalo da Silva Batista  
Francinalva Dantas de Medeiros

**DOI 10.22533/at.ed.23119150421**

**CAPÍTULO 22 ..... 244**

COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETORA DOS EXTRATOS DE *Averrhoa carambola* L.

Tálison Taylon Diniz Ferreira  
Orlene Nascimento da Silva  
Jéssyca Wan Lume da Silva Godinho  
Kleyton Santos Veras  
Denise Fernandes Coutinho  
Flavia Maria Mendonça do Amaral

**DOI 10.22533/at.ed.23119150422**

**CAPÍTULO 23 ..... 256**

CONHECIMENTO DE MULHERES USUÁRIAS DE UMA UNIDADE DE ESTRATÉGIA DE SAÚDE DA FAMÍLIA SOBRE A TRICOMONÍASE

Jessé Alves de Souza  
Laís Marques da Silva Pedrosa  
Evilma Nunes de Araújo  
Alecio Marcelo Lima Dos Santos  
Paulyanne Karlla Araújo Magalhães  
Thiago José Matos Rocha

**DOI 10.22533/at.ed.23119150423**

**CAPÍTULO 24 ..... 266**

CONTROLE DE QUALIDADE DE MEDICAMENTOS A BASE DE ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIAS

Mariana Ribeiro Gonçalves Cordeiro Cruz  
Bianca da Silva Cardoso  
Luiza Helena Nascimento Lopes  
Nadjanayra Soares Rodrigues  
Nathália Gonçalves Silva  
Thaís Silva Pires  
Tálison Taylon Diniz Ferreira  
Maria dos Remédios Mendes de Brito  
Angélica Gomes Coelho

**DOI 10.22533/at.ed.23119150424**

**CAPÍTULO 25 ..... 275**

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DA SITAGLIPTINA POR CLAE

Bruna de Carvalho Mapa  
Jacqueline de Souza  
Iara Devula Tiso Tana  
Débora dos Santos da Silva  
Neila Márcia Silva-Barcellos

**DOI 10.22533/at.ed.23119150425**

**CAPÍTULO 26 ..... 287**

DETECÇÃO, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE DERMATÓFITOS EM UTENSÍLIOS DE CENTROS DE ESTÉTICA DA CIDADE DE MACEIÓ, ALAGOAS

Bárbara Letícia Figueiredo Fonseca  
Marcus Vinícius de Andrade Silveir  
Caroline Fernanda Andrade Gomes  
Camila Neves de Melo Cavalcanti  
Aryanna Kelly Pinheiro Souza  
Gabriela Souto Vieira de Mello  
Marina Valdez dos Santos  
Ana Paula de Almeida Portela da Silva

**DOI 10.22533/at.ed.23119150426**

**CAPÍTULO 27 ..... 293**

DIVERSIDADE GENÉTICA DOS PAPILOMAVÍRUS HUMANOS DE ALTO RISCO 16, 53 E 66 EM ALAGOAS, BRASIL

Karwhory Wallas Lins da Silva  
Márcia Adriana Pessoa de Oliveira Esteves  
Sâmea Keise de Oliveira Silva  
Velber Xavier Nascimento

**DOI 10.22533/at.ed.23119150427**

**SOBRE OS ORGANIZADORES..... 305**

## A IMPORTÂNCIA DA ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA PRESTADA AOS PORTADORES DE DIABETES MELLITUS TIPO 1

### **Gisele Lopes Cavalcante**

Universidade Federal do Piauí – UFPI  
Teresina – PI

### **Maria Camila Leal de Moura**

Centro Universitário Santo Agostinho - UNIFSA  
Teresina - PI

### **José Virgulino de Oliveira Lima**

Centro Universitário Santo Agostinho - UNIFSA  
Teresina - PI

### **Yara Maria da Silva Pires**

Universidade Federal do Piauí – UFPI  
Teresina – PI

### **Aline Suelen Silva Maria**

Universidade Federal do Piauí – UFPI  
Teresina – PI

### **Ana Rita de Sousa França**

Universidade Federal do Piauí – UFPI  
Teresina – PI

### **Izabela Borges de Carvalho**

Universidade Federal do Piauí – UFPI  
Teresina – PI

### **Polyanna dos Santos Negreiros**

Universidade Federal do Piauí – UFPI  
Teresina – PI

**RESUMO:** O Diabetes Mellitus é um distúrbio endócrino caracterizado por elevadas taxas de glicose no sangue, resultante de defeitos na secreção de insulina e/ou na ação desta. A DM

é classificada de acordo com sua etiologia em tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), DM gestacional e outros tipos específicos de DM. Há ainda duas categorias, referidas como pré-diabetes, que são a glicemia de jejum alterada e a tolerância diminuída à glicose. A suscetibilidade da DM1 pode ser herdada, entretanto, fatores ambientais como infecções virais, dieta precoce na infância e toxinas também podem desencadear a autoimunidade. Seu tratamento medicamentoso baseia-se na reposição da insulina, as quais são classificadas de acordo com seu tempo de ação. Dessa forma, o esquema terapêutico é escolhido de acordo com a necessidade do paciente. Pacientes assistidos pelo profissional farmacêutico conseguem um melhor controle da glicemia, impedindo ou retardando o surgimento ou progressão das complicações agudas e crônicas do DM1. Portanto, compreendeu-se que a Assistência Farmacêutica contribui diretamente para a adesão ao tratamento do paciente com DM1.

**PALAVRAS-CHAVE:** Diabetes Mellitus. Assistência Farmacêutica. Saúde pública.

**ABSTRACT:** Diabetes Mellitus is an endocrine disorder characterized by high blood glucose levels resulting from defects in insulin secretion and / or insulin action. DM is classified according to its etiology in type 1 (DM1), DM type 2 (DM2), gestational DM and other specific types of DM.

There are also two categories, referred to as pre-diabetes, which are altered fasting glycemia and impaired glucose tolerance. The susceptibility of DM1 can be inherited, however, environmental factors such as viral infections, early childhood diet and toxins can also trigger autoimmunity. Its drug treatment is based on the insulin replacement, which are classified according to their time of action. In this way, the therapeutic scheme is chosen according to the patient's need. Patients assisted by the pharmacist are able to control glycemia better, preventing or delaying the onset or progression of acute and chronic complications of DM1. Therefore, it was understood that the Pharmaceutical Assistance contributes directly to the adherence to the treatment of the patient with DM1.

**KEYWORDS:** Diabetes Mellitus. Pharmaceutical care. Public health.

## 1 | INTRODUÇÃO

### Fisiopatologia do Diabetes *Mellitus*

O Diabetes *Mellitus* é uma patologia bastante antiga, existem relatos da sua existência desde de meados de 1500 a.C. Foi batizada no século II d.C. na Grécia Antiga, o termo Diabetes significa “passar através de um sifão” e explica-se pelo fato de que a poliúria, característica da doença, assemelhava-se à drenagem de água através de um sifão (ELIASCHEWITZ, 2006).

Os estudos de Willis, no século XVII, e Dobson, no século XVIII, na Inglaterra, demonstram a presença da provável doçura da urina de pacientes com diabetes. Foi Cullen, também no séc. XVIII (1769), quem sugeriu o termo *mellitus* (mel, em latim), distinguindo os tipos de diabetes em diabetes mellitus, marcado pela urina abundante com odor e sabor de mel, e diabetes insipidus, com urina também abundante, clara, e não adocicada (ELIASCHEWITZ, 2006).

O Diabetes *Mellitus* caracteriza-se como um distúrbio endócrino caracterizado por elevadas taxas de glicose no sangue, podendo ocasionar problemas nos diversos sistemas do corpo, sendo definida como um grupo de patologias metabólicas, nas quais os níveis elevados de glicose sanguínea são resultantes de defeitos na secreção de insulina e/ou na ação desta (SMELTZER; BARE, 2002).

Altas concentrações plasmáticas de glicose levam ao desenvolvimento de degenerações crônicas associadas à falência de diversos órgãos, principalmente olhos, rins, coração, nervos e vasos sanguíneos (BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2009).

A classificação atual do DM baseia-se na etiologia, proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Associação Americana de Diabetes (ADA), e aqui recomendada, inclui quatro classes clínicas: tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), DM gestacional e outros tipos específicos de DM. Há ainda duas categorias, referidas como pré-diabetes, que são a glicemia de jejum alterada e a tolerância à glicose

diminuída. Essas categorias não são entidades clínicas, mas fatores de risco para o desenvolvimento de DM e doenças cardiovasculares (ADA, 2017).

A diabetes tipo 1 (DM1) é uma patologia de caráter autoimune desencadeada pela destruição progressiva e irreversível das células  $\beta$  pancreáticas, levando a deficiência absoluta de insulina (GROSSI; PASCALI, 2009) (Figura 1). Acomete na maioria das vezes, crianças ou jovens, contudo pode se desenvolver em adultos e idosos. Os portadores desse tipo de diabetes podem desenvolver cetoacidose diabética e apresentam graus variáveis de deficiência de insulina (SBD, 2016).

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é ocasionada por defeitos na secreção e ação da insulina e interfere na regulação da produção hepática de glicose. A resistência à insulina e o defeito na função das células beta estão expostas precocemente na fase pré-clínica da doença. É causada por uma relação de fatores genéticos e ambientais (SBD, 2016). É mais comum em adultos após 40 anos, pois possui forte fator hereditário e, geralmente, está associado à obesidade e ao sedentarismo (MALAMAN, 2006).

A diabetes mellitus gestacional é definida como qualquer grau de intolerância à glicose, com primeiro reconhecimento durante a gestação (METZGER et al., 2010). A fisiopatologia da doença é semelhante ao diabetes mellitus tipo II, associando-se tanto à resistência à insulina, quanto à diminuição da função das células beta do pâncreas (KAUTZKY-WILLER et al., 1997).

Outros tipos específicos da DM são desencadeados por defeitos genéticos na função das células beta, na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, diabetes quimicamente induzidos por drogas e outras síndromes genéticas (MILECH et al., 2014). As formas associadas a defeitos genéticos na função das células beta incluem MODY, diabetes neonatal, diabetes mitocondrial e outros. MODY (acrônimo de maturity-onset diabetes of the young) caracteriza-se por herança autossômica dominante, idade precoce de aparecimento e graus variáveis de disfunção da célula beta (BONNEFOND et al., 2012).

Uma síndrome poliúrica conhecida é o Diabetes Insipidus (DI), decorrente de dois principais mecanismos fisiopatológicos: deficiência total ou parcial na síntese da vasopressina ou diminuição da sensibilidade renal a esse hormônio. Com base nisto, o DI é classificado, respectivamente, como DI Central e DI Nefrogênico (NAVES et al, 2003).

### **Diagnostico da Diabetes Mellitus**

O diagnóstico do DM é de certa forma complexa em alguns casos, o mais utilizado atualmente foi modificado, pela ADA em 1997, e, posteriormente, aceita pela OMS e pela SBD. As modificações foram realizadas com a finalidade de prevenir de maneira eficaz as complicações micro e macrovasculares do DM (ADA, 1997, 2017).

O desenvolvimento para o DM2 ocorre em um período de tempo variável, passando por estágios intermediários que recebem a denominação de glicemia de

jejum alterada e tolerância à glicose diminuída. No diabetes DM1, o início geralmente é abrupto, com sintomas que indicam de maneira contundente a presença da enfermidade, essas particulares devem ser levadas em consideração na hora de terminar o tipo de DM que o paciente possui (ADA, 2017; SBD, 2016).

Atualmente, são três os critérios aceitos para o diagnóstico do DM com utilização da glicemia: Sintomas de poliúria, polidipsia e perda ponderal acompanhados de glicemia aleatória (aquela realizada a qualquer hora do dia)  $\geq 200$  mg/Dl; glicemia de jejum  $\geq 126$  mg/dL; glicemia de 2h pós-sobrecarga de 75 g de glicose  $\geq 200$ mg/d (Tabela 1) (ADA, 2017).

Geralmente para concluir o diagnóstico deve-se realizar a repetição do teste em outro dia, apenas em casos que haja hiperglicemia inequívoca com descompensação metabólica aguda ou sintomas óbvios de DM não é necessário novo teste (ADA, 2017; SBD, 2016).

Outro teste utilizado é o de Hemoglobina Glicada (HbA1c), existem algumas discussões sobre seus valores, porém, a OMS recomenda que a HbA1c de 6,5% seja compatível com o diagnóstico do DM, contudo considera indivíduos com níveis entre 5,7% e 6,4% com alto risco de evoluir para DM (WHO, 2011).

	Método/Diagnóstico		
	Glicemia de Jejum*	2 h após 75 g de glicose	Glicemia casual**
<b>Glicemia Normal</b>	<100 mg\DI	< 140 mg\dL	-
<b>Tolerância à glicose diminuída</b>	$\geq 100$ a < 126	$\geq 140$ a < 200	-
<b>Diabetes mellitus</b>	$\geq 126$ mg\DI	$\geq 200$ mg\dL	$\geq 200$ mg\dL (com sintomas clássicos)***

Quadro 1 - Valores de glicose plasmática (em mg\dl) para diagnóstico de Diabetes Mellitus e seus estágios pré-clínicos

\*O jejum é definido como a falta de ingestão calórica por no mínimo 8 h.

\*\*Glicemia plasmática casual é aquela realizada a qualquer hora do dia, sem se observar o intervalo desde a última refeição.

\*\*\*Os sintomas clássicos do DM incluem poliúria, polidipsia e perda não explicada de peso.

Fonte: SBD (2016)

Ocorrem casos onde não é possível determinar o tipo específico de DM apenas com os testes citados acima (Tabela 1), pois existem alguns casos que fogem da realidade convencional de cada tipo de DM, por exemplos existem alguns casos raros de DM2 que são detectados na infância, como também existem casos da literatura onde a DM1 é manifestada na fase adulta, quando existe confirmação de DM e sinais e sintomas atípicos para a faixa etária do paciente é necessário realizar um diagnóstico diferencial (SBD, 2016).

O diagnóstico diferencial é realizado através da dosagem do peptídeo C de jejum e a determinação de autoanticorpos contra as células beta, a partir da pesquisa de autoanticorpos antiilhota (anti-GAD, anti-IA2, ICA e antiinsulina). Nos jovens com DM2, geralmente os autoanticorpos não estão presentes, e os níveis de peptídeo C estão comumente normais ou elevados (KATZEFF et al, 1885; PRANITA et al. 2012).

Os autoanticorpos positivos contra insulina, descarboxilase do ácido glutâmico (GAD) ou tirosina-fosfatase (IA2) estão presentes em 85% a 98% portadores de DM1 de origem autoimune. Já em obesos com história indicativa de DM2 que desenvolveram cetoacidose ao diagnóstico, a prevalência de auto-anticorpos (antiilhotas-ICA, anti-IA2 e anti-GAD 65) é no máximo de 15%, enquanto que em crianças saudáveis a quantidade de autoanticorpos é de 1% a 4% (LIBMAN et al, 1998).

## **Diabetes Mellitus tipo 1**

O diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) inclui todas as formas de diabetes em que ocorre primariamente a destruição das células-beta pancreáticas produtoras de insulina, pancreáticas resultando em uma deficiência absoluta da mesma. Ocorre geralmente em crianças e adolescentes, entretanto, pode manifestar-se também em adultos, habitualmente de forma mais perigosa. Pacientes com esse tipo de diabetes necessariamente dependem da administração de insulina (OLIVEIRA; VENCIO, 2014).

### **Tipos de Diabetes Mellitus tipo 1**

Na maioria dos casos de DM1 caracteriza-se como uma doença autoimune e constitui um subgrupo de diabetes denominado de tipo 1A (DM1A). O DM1 do tipo autoimune (1A) está presente em 5 a 10% dos casos da diabetes, resulta da destruição das células beta pancreáticas, conseqüentemente, conduzindo a uma deficiência de insulina. Na ausência de evidências de processo autoimune, referida como idiopática (1B) (GROSS et al., 2002).

O subgrupo DM1A é composto de uma forma poligênica clássica, que pode mostrar-se isolado ou associado a outras endocrinopatias autoimunes – síndromes poliglandulares autoimunes, do diabetes autoimune latente do adulto (LADA) e dos dois presentes em síndromes relacionadas a alterações monogênicas: um que pertence a síndrome poliglandular autoimune do tipo 1 (SPAI-1) e o outra associada à poliendocrinopatia e à enteropatia ligada ao X (IPEX) (SBD, 2016; DIB, 2008).

O subgrupo designado tipo 1 idiopático é representado por níveis baixos plasmáticos de insulina e de peptídeo-C, semelhantes ao do DM1A, porém não apresenta evidência de autoimunidade anticélulas beta pancreáticas. A maioria dos pacientes, que apresenta este subgrupo é de origem africana ou asiática. Neste subgrupo encontra-se pelo menos três subtipos: o diabetes *mellitus* tipo 1B (DM1B), o diabetes do adulto com tendência à cetose e o diabetes fulminante (NIELSEN et al, 2016; SBD, 2016).

O termo diabetes autoimune latente do adulto (LADA) foi introduzido por Tuomi e Zimmet para determinar pacientes diabéticos adultos que não requeriam insulina inicialmente, mas que exibem autoanticorpos contra as células-beta e progressão mais rápida para insulino-dependência (TUOMI et al, 1993). O LADA, geralmente é desencadeado após os 35 anos de idade, apresenta características do DM1 e do DM2 clássicos, o que gera uma certa dúvida e um diagnóstico errôneo muitas vezes, sendo necessário análise dos marcadores imunológicos (ZINMAN et al, 2004; CALSOLARI et al, 2008).

Os principais marcadores imunológicos de comprometimento do pâncreas são os anti-ilhota (IAC), anti-insulina (IAA) e anticorpos descarboxilase do ácido anti-glutâmico (GAD), anticorpos estão presentes em 90% dos pacientes no momento do diagnóstico e podem aparecer na fase pré-clínica da doença. No caso da LADA o GAD consiste no anticorpo de escolha para ser, pois o GAD é utilizado como marcador em pacientes >10 de anos e o IAC utilizado nas crianças <10 anos (FRAGUAS; SOARES; BRONSTEIN, 2009).

Assim, na diferenciação da LADA com DM2, verifica-se altas taxas de anticorpos GAD, nos pacientes com fenótipo mais próximo do DM1, podendo iniciar precocemente o tratamento com insulina, evitando-se o uso de sulfoniluréias e assim serem beneficiados, adiando a falência das células-beta. Em oposição, pacientes com baixos títulos de GAD se assemelham mais aos DM2 (GAD negativos) e aparentemente não teriam prejuízos em serem conduzidos da mesma forma que estes (CALSOLARI et al, 2008; LOURAKIA, 2016).

Os indivíduos com esse tipo de DM podem desenvolver cetoacidose diabética (CAD), apresentam graus variáveis de deficiência de insulina, de patogênese desconhecida. Devido à avaliação dos autoanticorpos não se encontrar disponível em todos os centros, a classificação etiológica do DM1 nas subcategorias autoimune e idiopática pode não ser sempre possível (SBD, 2016)

### **Causas da Diabetes mellitus tipo 1**

A etiopatogênia do DM tipo 1A envolve fatores inflamatórios, genéticos e ambientais. Os principais genes envolvidos estão no sistema do antígeno leucocitário humano (HLA) classe II, esses alelos podem suscitar o desenvolvimento da doença ou proteger o organismo contra ela (ERLICH et al.,2008).

A suscetibilidade da DM1 pode ser herdada, verifica-se um risco aumentado em parentes de primeiro grau de uma pessoa afetada pela patologia, no entanto 85% de casos novos não veem tal linhagem familiar. O polimorfismo de cinco genes conhecidos, corroboram para ocorrência de DM1: HLA-DQ $\alpha$ , HLA-DQ $\beta$ , HLA-DR, pré e pró-insulina e o gene PTPN22. Entre os citados, os principais marcadores genéticos envolvidos na apresentação de antígenos das ilhotas e no controle da resposta imune ao DM1 são os loci HLA-DQ/DR (EISENBARTH; MCCULLOCH, 2006).

Os fatores ambientais mais reconhecidos capazes de desencadear autoimunidade são as infecções virais (citomegalovírus, rubéola, coxsackie  $\beta$ , caxumba, sarampo), dieta precoce na infância (introdução precoce de ingredientes do leite de vaca, cereais e glúten) e toxinas (por exemplo, derivados de N-nitroso) (REWERS; KLINGENSMITH, 1997; DEVENDRA; EISENBARTH, 2004). Outros fatores não-genéticos causadores da doença incluem administração de vacinas, estresse emocional, sazonalidade e acesso aos cuidados de saúde (DEVENDRA; EISENBARTH, 2004).

As citocinas são capazes de recrutar e ativar células apresentadoras de antígenos e linfócitos T autorreativos, dessa forma a liberação local de citocinas pró-inflamatórias oriunda de infecção viral constitui fator crucial na perda da tolerância aos autoantígenos e na ativação de linfócitos autorreativos, o que perpetua o processo de autoimunidade nas ilhotas (OBAYASHI, 2000; QIAO, 2016).

A secreção da citocina está associada à hiperexpressão das moléculas HLA de classe I e de classe II na superfície de células beta. A partir desses eventos, a apresentação de autoantígenos pelas células betapancreáticas aos linfócitos T autorreativos pode ocorrer, dando início à cascata de processos inflamatórios, culminando na insulite (OBAYASHI, 2000; QIAO, 2016).

O DM1 pode desencadear complicações crônicas, como as microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia diabética) e as macrovasculares (acidente vascular cerebral, doença arterial periférica e aterosclerose), o tratamento tem como objetivo, prevenir o aparecimento ou a progressão dos mesmos e simultaneamente minimizar os riscos das complicações agudas, tais como grave hipoglicemia (CANADIAN DIABETES ASSOCIATION, 2013).

## **Tratamento da diabetes *mellitus* tipo 1**

Antigamente achava-se que as complicações do diabetes mellitus (DM) fossem determinadas geneticamente, sem relação com o tipo e a qualidade do controle metabólico. Apenas há pouco mais de uma década, quando os resultados do Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) vieram a público, entendeu-se que a maior parte das complicações do paciente diabético devia-se a um mau controle metabólico. Com essa descoberta e com base em outros estudos foi estabelecida definitivamente a necessidade de se controlar da melhor forma possível, desde o diagnóstico, os parâmetros glicêmicos de todo paciente diabético (DCCT, 1993).

Como o DM1 caracteriza-se por insuficiência na produção de insulina, o tratamento medicamentoso depende da reposição desse hormônio, empregando-se esquemas e preparações variados, afim alcançar alvos glicêmicos pré e pós-prandiais (SBD, 2016).

O tratamento insulínico no DM1 divide-se em tratamento convencional ou intensivo. No esquema convencional, aplica-se uma a duas injeções de insulina NPH

(Neutral Protamine Hagedorn) associada ou não à insulina regular ou ultrarrápida. Devido ao perfil farmacocinético da insulina NPH, esse esquema não mimetiza o padrão de secreção normal de insulina basal, podendo ocasionar episódios de hipoglicemia (SBD, 2014). Além disso, após o estudo DCCT (1993), ficou claro que esse esquema, não consegue manter as glicemias pré e pós-prandiais e a HbA1c dentro de metas recomendadas.

O tratamento intensivo com esquema basal-bolus tem sido recomendado como o melhor para insulinização de indivíduos com DM1. O esquema basal-bolus, seja com múltiplas aplicações de insulina (MDI) ao dia (três ou mais administrações de insulina ao dia, de duas insulinas com diferentes tempos de ação), seja com sistema de infusão contínua de insulina (SICI) ou bomba de insulina, possibilita um melhor controle glicêmico (MINICUCCI, 2008).

Estudos têm demonstrado que o controle metabólico (HbA1c) alcançado com o uso do sistema de infusão contínua é modestamente superior ao obtido com as múltiplas doses, no entanto, ambos os métodos são apropriados e eficazes. Porém, a principal vantagem do SICI em relação ao esquema de múltiplas doses é a redução dos eventos hiperglicêmicos graves (CASAS-OÑATE; MONTOYA-MARTÍNEZ, 2010).

Ribeiro e colaboradores (2016) realizaram um estudo no Brasil, comparando as duas formas de terapia basal-bolus para o controle metabólico, com um design de paciente com um autocontrole rigoroso, mostrando melhora do controle metabólico com o uso de CIIT, com uma reduzida ocorrência de complicações agudas da diabetes nesta amostra.

No mercado existem diversos tipos de insulina e análogos, escolhidos de acordo com a necessidade do paciente, elas são classificadas de acordo com o tempo de ação em longa duração (glargina e detemir) intermediária (NPH), rápida (regular), ultrarrápida (asparte, lispro e glulisina) e ainda existem as pré-misturas (70% NPH/30% regular 50% NPH/50% regular 75% NPL/25% lispro 50% NPL/50% lispro 70% NPA/30% asparte) (HAHR; MOLITCH, 2010) (Quadro 2).

Insulina	Início de ação	Pico de ação	Duração do efeito terapêutico
<b>Longa duração</b>			
<b>Glargina (lantus)</b>	2-4hs	Não apresenta	20-24 hs
<b>Detemir (levemir)</b>	1-3hs	6-8hs	18--22 hs
<b>Ação intermediária</b>			
<b>NPH</b>	2-4hs	4-10hs	10-18 hs
<b>Ação Rápida</b>			
<b>Regular</b>	0,5-1h	2-3hs	5-8 hs
<b>Ação Ultrarrápida</b>			
<b>Asparte</b>	5-15 min	0,5-2hs	3-5hs
<b>Lispro</b>	5-15 min	0,5-2hs	3-5hs
<b>Glulisina</b>	5-15 min	0,5-2hs	3-5hs
<b>Pré-misturas</b>			

<b>70% NPH/30% regular</b>	0,5-1 h	3-12hs	10-16hs
<b>50% NPH/50% regular</b>	0,5-1 h	2-12hs	10-16hs
<b>75% NPL/25% lispro</b>	5-15 min	1-4hs	10-16hs

Quadro 2 – Propriedades farmacocinéticas das insulinas e análogos

Fonte: HAHR; MOLITCH (2010).

A insulina de longa duração ou basal tenta imitar a secreção basal de insulina, regular homeostase hepática da glicose no estado de jejum ou entre as refeições (SBD, 2011). Os análogos de insulina (glargina e detemir) demonstram-se superiores à NPH em seus efeitos noturnos, resultando em níveis mais baixos de glicemia de jejum e num número menor de episódios de hipoglicemia noturna (ANVISA, 2010).

Os análogos de ação ultrarrápida permitem uma boa semelhança aos perfis fisiológicos da secreção de insulina, são aplicadas imediatamente antes das refeições. Quando comparado com a insulina regular, a utilização adequada destes análogos (asparto, lispro e glulisina) permite uma maior flexibilidade e conveniência para crianças e adolescentes, apresenta um menor risco de hipoglicemias e uma discreta redução da hemoglobina glicada (BATISTA et al., 2010).

Os análogos de ação ultrarrápida (lispro, asparto e glulisina) podem ser utilizados em sistemas de infusão contínua de insulina (SICI) e, também, por via endovenosa, em situações especiais e dentro do ambiente hospitalar, os principais inconvenientes do uso desses análogos são o seu maior custo e a falta de cobertura nos estados pós-prandiais tardios (SBD, 2016).

As pré-misturas de insulinas e análogos são pouco utilizadas em pacientes com DM1, apresentam como vantagem a maior adesão ao tratamento uma vez que diminui o número de picadas e o menor risco de erro ao misturar insulinas e como desvantagem a dificuldade para titular a dose do bolus e um maior risco de hipoglicemia pelo pico da insulina intermediária (SBD, 2011).

A insulina inalável mostra-se uma alternativa eficaz, segura e mais cômoda para adultos DM1, constituída da própria insulina humana, disponível na forma de pó. Quando comparada com a insulina regular em regime subcutâneo, a insulina inalável tem absorção e pico de ação mais rápidos comparáveis aos análogos de ação rápida (PIRES; CHACRA, 2008).

Em outubro de 2007, a única preparação de insulina inalável (Exubera®) disponível no mercado nacional foi retirada pelo seu fornecedor, houve baixa adesão por parte dos diabéticos devido ao seu tamanho e isso gerou poucos lucros. Existem especulações que a insulina inalável Afrezza®, comercializada nos estados unidos, logo estará no mercado Brasileiro e que aguarda apenas a liberação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (PIRES; CHACRA, 2008; BIOMM, 2017).

O paciente com DM1 poderá ainda se beneficiar de três tipos de transplante de pâncreas, que dependerá de sua função renal, da possibilidade de obter um doador de rim vivo relacionado e de sua instabilidade glicêmica. Pacientes com DM1 ou

insulinodependentes com doença renal terminal, podem ser submetidos a transplante simultâneo de pâncreas/rim e transplante de pâncreas após rim (PEPPER GALA-LOPEZ, SHAPIRO, 2013).

O transplante isolado de pâncreas (TIP) é a modalidade menos efetivada e suas indicações estão entre as mais contestáveis entre os centros transplantadores. A ADA bem como a SBD, recomenda a TIP apenas para pacientes com história de labilidade glicêmica com complicações metabólicas agudas graves, como episódios de cetoacidose de repetição, hipoglicemias graves confirmadas, acontece ainda diversas tentativas de manejo por endocrinologista (SÁ et al, 2008).

Existe ainda o transplante de ilhotas, porém essa técnica apresenta alguns obstáculos como a necessidade de imunossupressão por toda a vida a dificuldades de acesso ao pâncreas de doadores falecidos, a complexidade das técnicas e o custo do isolamento das ilhotas, além da pouca durabilidade da insulinoindependência. Diante disto esse método é utilizado apenas em um pequeno grupo de pacientes DM1 marcado pela hiperlabilidade glicêmica (ELIASCHEWITZ et al 2009; PEPPER GALA-LOPEZ, SHAPIRO, 2013).

Pacientes que efetuaram transplante de ilhotas têm demonstrado melhora na qualidade de vida, sendo considerada uma intervenção benéfica, que apresenta morbidade 20 vezes menor que o transplante de pâncreas, levando em consideração ainda que é procedimento muito menos invasivo do ponto de vista cirúrgico (ELIASCHEWITZ et al, 2009).

### **Contribuição da atenção farmacêutica no tratamento da diabetes *mellitus* tipo 1**

A finalidade da atenção farmacêutica consiste em aumentar a efetividade do tratamento medicamentoso. Esta, segundo a OMS (2002), definiu-se como a prática profissional na qual o paciente é o grande beneficiário das ações do farmacêutico. Sua atuação profissional engloba uma somatória de atitudes, comportamentos, responsabilidades e habilidades na prestação da farmacoterapia, com o propósito de alcançar resultados terapêuticos eficientes e seguros para prevenir, informar e resolver um problema relacionado a medicamentos (PRM), privilegiando a saúde e a qualidade de vida do paciente (OLIVEIRA et al. 2005).

Os resultados de um estudo feito por BIRAL, CARDOSO & GRUNSPAN (2005) mostraram que os pacientes tratados com uma equipe interdisciplinar (com a presença de um farmacêutico), conseguem um melhor controle da glicemia impedindo ou retardando o surgimento ou progressão das complicações agudas e crônicas do DM1.

Em vista disso, a Atenção Farmacêutica é uma ferramenta que contribui diretamente para o acompanhamento farmacoterapêutico do paciente com DM1, visto que estes necessitam ser amparado, pois esta é uma doença complexa, que envolve cuidados com esquema posológico, administrações diárias de insulina,

controle glicêmico, mudanças de hábitos de vida, entre outros cuidados (PLÁCIDO; FERNANDES; GUARIDO, 2009).

É importante retratar que os custos que o farmacêutico representa, por exemplo, para a administração pública, são ínfimos quando comparados aos seus benefícios, uma vez que este profissional proporciona uma melhora na qualidade de vida dos pacientes e a redução de internações hospitalares ocasionadas por complicações de doenças crônicas, como diabetes (FLORES, 2005).

Vários estudos tem demonstrado a relevância da prática da Atenção Farmacêutica, tanto no Brasil, quanto em países europeus, principalmente na Espanha (onde a prática é mais desenvolvida), tais estudos trouxeram resultados satisfatórios em relação à redução de custos, melhorias na qualidade de vida do portador e maior adesão ao tratamento indicado (SILVIA; PRANDO, 2006).

## CONCLUSÃO

A Assistência Farmacêutica contribui diretamente para a adesão ao tratamento do paciente com DM1, visto que esta é uma doença complexa, que envolve diversos cuidados, como administrações diárias de insulina, controle glicêmico, mudanças de hábitos de vida, entre outros. O farmacêutico busca, portanto, alcançar resultados terapêuticos com eficácia e segurança, privilegiando a saúde e a qualidade de vida do paciente.

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Insulina Glargina e Insulina Detemir no Controle da Diabetes Mellitus Tipo 1. **Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde (BRATS)**, v. 22, n. 13, dez. 2010.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Guide to diagnosis and classification of diabetes mellitus and offer categories of glucose intolerance. **Diabetes Care**, v.20, p.215-25, 1997.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes. **Diabetes Care**, v.40, n.1 p. 14-80, 2017.

BARBOSA, J.H.P; OLIVEIRA, S.L; SEARA, L.T. Produtos da glicação avançada dietéticos e as complicações crônicas do diabetes. **Rev Nutr**. v.22, n.1, p.113-24, 2009.

BATISTA, M.C.P. et al. Avaliação dos Pacientes com Diabetes Mellitus em Uso de Insulina Glargina Disponibilizada pelo Serviço Público no Distrito Federal. **Brasília Méd.**, v.47, n.1, p 59-68, 2010.

BIOMM. **Biommm e Mannkind firmam acordo para distribuição do Afrezza no Brasil**. Disponível em: < <http://www.biomm.com/biotecnologia/Futuro/biomm-e-mannkind-firmam-acordo-para-distribuicao-do-afrezza-no-brasil> > Acesso em: 22 out. 2017.

BIRAL, A.M.; CARDOSO, P.M.; GRUNSPAN, S. A importância do educador em diabetes mellitus. **Diabetes Clinic.**, vol. 9, n. 3, p. 193-199, 2005

- BONNEFOND, A. et al. **Whole-exome sequencing and high throughput genotyping identified KCNJ11 as the thirteenth MODY gene.** v.7, n.6, jun. 2012.
- CALSOLARI, M. R. et al. Diabetes Auto-Imune Latente do Adulto ou Diabetes Melito Tipo 2 Magro? **Arq Bras Endocrinol Metab.** v.52, n.2, 2008.
- CANADIAN DIABETES ASSOCIATION. Canadian Diabetes Association 2013 Clinical Practice Guidelines for the Prevention and Management of Diabetes in Canada. **Can J Diabetes,** v. 37, n.1, 2013.
- CASAS-OÑATE, M.L; MONTOYA-MARTÍNEZ, D. Influence of the treatment with continuous subcutaneous insulin infusion (CSII) in the improvement of the quality of life of patients with type 1 diabetes mellitus. **Enferm. Clin.** v. 20, p. 216-221,2010.
- DEVENDRA, D; LIU, E; EISENBARTH G.S. Type 1 diabetes: recent developments. **BMJ.** p.328-750, 2004.
- DIABETES CONTROL AND COMPLICATION STRIALRESEARCH GROUP. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **N. Engl. J. Med.,** v.30, n.14 1993.
- DIB, S.A. Heterogeneidade do diabetes melito tipo 1. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.,** São Paulo, v. 52, n. 2, p. 205-218, Mar., 2008 .
- EISENBARTH, G.S; MCCULLOCH, D.K. Pathogenesis of type 1 diabetes mellitus, 2006. Disponível em: <<http://patients.uptodate.com/topic.asp?file=diabetes/5832#references>> Acesso em: 22/08/2017.
- ELIASCHEWITZ, F. G. et al. Transplante de ilhotas na prática clínica: estado atual e perspectivas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.** v.53, n.1, p.15-23, 2009.
- ERLICH H. et al. HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. **Diabetes,** v.57, n.4, 2008.
- FLORES, C.M. **Avaliação da Atenção Farmacêutica ao paciente diabético tipo 2 no Município de Ponta Grossa,** 2005
- FRAGUAS R; SOARES S.M.S; BRONSTEIN M.D. Depressão e diabetes mellitus. **Rev. Psiquiatr. Clin.** ; v.36, n. 3, p.93-99, 2009.
- GROSS J. et al Diabetes Melito: diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. **Arq Bras Endocrinol Metab,** v.46, p16-26, 2002.
- GROSSI, S. A.; PASCALI, P. M. **Cuidados de enfermagem em diabetes mellitus: departamento de enfermagem da sociedade brasileira de diabetes.** São Paulo, 2009.
- HAHR A.J; MOLITCH M.E. Optimizing Insulin Therapy in Patients With Type 1 and Type 2 Diabetes. Mellitus: Optimal Dosing and Timing in the Outpatient Setting, **Disease-a-Month,** v.56, p.148-162, 2010.
- LIBMAN, I. et al. Islet cell autoimmunity in white and black children and adolescents with IDDM. **Diabetes Care.** v.21, p. 1824-7,1998.
- LOURAKI, Maria .The prevalence of early subclinical somatic neuropathy in children and adolescents with Type 1 diabetes mellitus and its association with the persistence of autoantibodies to glutamic acid decarboxylase (GAD) and islet antigen-2 (IA-2). **Diabetes Research and Clinical Practice.** v.117, p. 82-90, jul. 2016.

KATZEFF, H. et al. C-peptide measurement in the differentiation of type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. **Diabetologia**. v.28, p.264-8, 1985.

KAUTZKY-WILLER, A. Pronounced insulin resistance and inadequate beta-cell secretion characterize lean gestational diabetes during and after pregnancy. **Diabetes Care**, v.20, n.11, p.1717-23, 1997.

MALERBI D.A; FRANCO L.J. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. **Diabetes Care**, v.15, n.11, Nov. 1992.

MILECH, A.; OLIVEIRA, J.E.P.; ZAJDENVERG, L.; RODACKI, M. **Rotinas de diagnóstico e tratamento do Diabetes Mellitus**. Rio de Janeiro, AC Farmacêutica, 2014.

Ministério da Saúde. **Percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde/Fiocruz, 2014.

NIELSEN, H.B.; OVESEN, L.L.; MORTENSEN, L.H.; LAU, C.J.; JOENSEN, L.E. Type 1 diabetes, quality of life, occupational status and education level – A comparative population-based study. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 121, p. 62-68, Nov. 2016

OBAYASHI, H. et al. Tumor necrosis factor microsatellite polymorphism influences the development of insulin dependency in adult-onset diabetes patients with the DRB1\*1502-DQB1\*0601 allele and anti-glutamic acid decarboxylase antibodies. **J Clin Endocrinol Metab**. v.85, p.3348-51, 2000.

OLIVEIRA, A.B. et al. Obstáculos da atenção farmacêutica no Brasil. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 41, n.4, p. 409-413, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **The cost of diabetes**. Geneva, 2002.

PEPPER, A.R. et al. Current status of clinical islet transplantation. **World J Transplant**. Dec 24;3(4):48-53. 2013

PIRES, A. C.; CHACRA, A. R. A Evolução da Insulinoterapia no Diabetes Mellito Tipo 1. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v.52, n.2 ,2008.

PLÁCIDO, V.B; FERNANDES, L.P.S; GUARI, C.F. Contribuição da Atenção Farmacêutica para pacientes portadores de diabetes atendidos no ambulatório de endocrinologia da UNIMAR. **Revista brasileira de farmácia**, Rio de Janeiro – RJ, v. 90, n. 3, p. 589-633, 2009.

PRANITA, A. et al. Screening of young adults for future risk of type 2 diabetes mellitus – a big concern for society & nation. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. v.6, n.9, p.1610-11, 2012.

RIBEIRO, M. E. B. et al. Continuous insulin therapy versus multiple insulin injections in the management of type 1 diabetes: a longitudinal study. São Paulo, **Rev. paul. Pediatr**. v.34 n.1, Jan./Mar. 2016.

SÁ, J. R. et al. Transplante de Pâncreas e Ilhotas em Portadores de Diabetes Mellito. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v.52, n. 2, p.355-366, 2008.

SCHMIDT M.I. et al. High prevalence of diabetes and intermediate hyperglycemia - The Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v.6, n.123, p.1-9, nov. 2014.

SMELTZER, S. C; BARE, B. G. Histórico e Tratamento de pacientes com Diabetes Mellitus. In: BRUNNER; SUDDARTH. **Tratado de Enfermagem Médico-Cirúrgica**, 9. ed. Rio de Janeiro,

Guanabara Koogan, v.2, cap.37, p. 933-983, 2002

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da sociedade Brasileira de Diabetes (2013-2014)**. São Paulo: A.C Farmacêutica, 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da sociedade Brasileira de Diabetes (2015-2016)**. São Paulo: A.C Farmacêutica, 2016.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Revisão sobre análogos de insulina: indicações e recomendações para a disponibilização pelos serviços públicos de saúde**. São Paulo, fev.2011.

MINICUCCI W.J. Insulin pump therapy in patients with type 1 diabetes. **Arq. Bras. Endocrinol Metabol**, v.52, n.2, 2008.

NAVES, L. A et al. Distúrbios na secreção e ação do hormônio antidiurético. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v.47, n.4, p.467-81, 2003.

OLIVEIRA, J.E.P.; VENCIO, S. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2013-2014)**, São Paulo, AC Farmacêutica, 2014.

QIAO, Y.C. et al. Changes of Regulatory T Cells and of Proinflammatory and Immunosuppressive Cytokines in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis. **J Diabetes Res.**, sep., 2016

REWERS, M.; KLINGENSMITH, G.J. Prevention of type 1 diabetes. **Diabetes Spectr**. v.10, p.282-92,1997.

SILVIA, D.D.; PRANDO, L.E. As dificuldades do profissional farmacêutico para implementação da atenção farmacêutica e da farmacovigilância nas farmácias hospitalares e comunitárias. **Infarma**, vol. 16, n. 11/12, pag. 85-88, 2004.

TUOMI, T. et al. Antibodies to glutamic acid decarboxylase reveal latent autoimmune diabetes mellitus in adults with a non-insulin-dependent onset of disease. **Diabetes Care**. v.42, p.359-62,1993.

WHO. **Use of Glycated Haemoglobin (HbA1c) in the Diagnosis of Diabetes Mellitus**: Abbreviated Report of a WHO Consultation. Geneva: World Health Organization, 2011.

ZINMAN B. et al. Phenotypic characteristics of GAD antibody-positive recently diagnosed patients with type 2 diabetes in North America and Europe. **Diabetes**.v.53, p. 3193-200, 2004.

## ANÁLISE BACTERIOLÓGICA DE QUEIJOS ARTESANAIS COMERCIALIZADOS NAS FEIRAS LIVRES DO MUNICÍPIO DE CARUARU-PE

### Jucélia Ivonete dos Santos

Bacharelado em Farmácia, Departamento de Farmácia, Universidade Tabosa de Almeida, Caruaru-PE. E-mail: juceliasantos1988@hotmail.com

### Valéria da Silva Tabosa

Bacharelado em Farmácia, Departamento de Farmácia, Universidade Tabosa de Almeida, Caruaru-PE. E-mail: valeria-tabosa@hotmail.com

### Agenor Tavares Jácome Júnior

Doutor em Química, Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE.

Mestre em Biotecnologia, Departamento de Biomedicina, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE.

Graduado em Bacharelado em Biomedicina, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE.

E-mail: agenorjacome@gmail.com

**RESUMO:** Os alimentos de origem animal ou vegetal, frescos ou processados, incluindo a água, podem veicular diversos microrganismos patogênicos, constituindo um perigo para a saúde pública, devido ao crescimento excessivo de populações bacterianas. Os queijos coalho por serem, na maioria das vezes, elaborados a partir de leite cru, sem processo de maturação e de forma artesanal, constituem um veículo frequente de patógenos de origem alimentar. Bactérias patogênicas e enterotoxigênicas como *Salmonella* e *Staphylococcus aureus*

são frequentemente encontrados em derivados lácteos. O objetivo deste estudo foi avaliar os aspectos higiênico-sanitários dos queijos coalho comercializados em feiras no município de Caruaru-PE. Observou-se a presença do grupo coliformes e da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* com (NMP > 1600) na quase totalidade das amostras, além da contagem de bactérias heterotróficas acima de  $10^5$  UFC/ml. Desse modo, as condições higiênico-sanitárias inadequadas na produção e comercialização de queijos artesanais, podem trazer graves consequências para a saúde dos consumidores. **PALAVRAS-CHAVES:** Queijo, Coliformes, bactérias heterotróficas, *Pseudomonas aeruginosa*

### BACTERIOLOGICAL ANALYSIS OF ARTISAN CHEESES SOLD IN THE STREET MARKETS OF CARUARU-PE MUNICIPALITY

**ABSTRACT:** Food of animal or vegetable origin, fresh or processed, including water, can carry several pathogenic microorganisms, constituting a danger to public health due to excessive growth of bacterial populations. The rennet cheeses because they are most often made from raw milk without maturation process and by hand is a frequent vehicle of food-borne pathogens, deserving outstanding attention

to consider that pathogenic and enterotoxigenic bacteria such as Salmonella and Staphylococcus aureus are often found in dairy products. The aim of this study was to evaluate the hygienic and sanitary aspects of rennet cheeses sold in fairs in the city of Caruaru. It was observed the presence of coliform and Pseudomonas aeruginosa with (NMP > 1600), and the heterotrophic bacteria counts above 105 cfu / ml. Thus, inadequate sanitary conditions in the production and marketing of artisanal cheeses, can bring serious consequences to the health of consumers.

**KEYWORDS:** Cheese, coliforms, heterotrophic bacteria, Pseudomonas aeruginos,

## INTRODUÇÃO

A feira livre é considerada um dos locais mais tradicionais de comercialização de alimentos e varejo (CARARO & HAUTRIVE, 2012). Atualmente, são identificadas como elementos importantes na estrutura social do meio urbano (LOPES, 2014). A economia de Caruaru-PE, baseia-se principalmente no comércio, tendo destaque a feira de Caruaru, localizada próximo ao Rio Ipojuca, que congrega bancas de ervas, legumes, verduras, laticínios além de outros produtos. A feira de Caruaru tem muitos aspectos que, embora sejam comuns para os que moram na cidade, apresentam um bonito exotismo para os visitantes, constituindo também, uma substancial fonte de renda para o município, (ESTEVES & FIGUERÔA, 2009; CARARO & HAUTRIVE, 2012).

Dentre os produtos comercializados em feiras livres está o leite, que é um dos alimentos mais utilizados na dieta de humanos de todas as faixas etárias e classes sociais devido ao seu grande valor nutricional (MUNIZ, *et. al.*; 2013). Entretanto, o leite pode constituir um excelente meio de cultura para microrganismos deteriorantes (KAMIYAMA, 2012; KAMIYAMA & OTENIO, 2013). Desse modo, estudos realizados por SILVA, (2015), comprovam que a presença de bactérias patogênicas no leite cru é uma preocupação para a saúde pública. Sendo assim, torna-se um risco potencial para quem o consome diretamente ou na forma de seus derivados.

Os queijos são alimentos derivados do leite, ricos em proteínas de alto valor biológico, cálcio, fósforo, zinco, iodo, selênio, vitaminas e oligoelementos, existindo em todo o mundo mais de 1.000 tipos (SILVA, *et. al.*; 2013; MAMEDE, *et. al.*; 2010). Estes laticínios podem ser produzidos tanto na forma artesanal quanto industrial (PINTO, *et. al.*; 2011; GOMES, *et. al.*; 2012). No entanto, sua elaboração é uma das atividades mais importantes nas indústrias de laticínios, sobretudo no Brasil (GOMES, *et. al.*; 2012).

O queijo coalho tem elevada produção e consumo em toda região Nordeste, merecendo destaque nos estados do CE, RN, PE, PB e PI (ARAÚJO, *et. al.*; 2012). Sua produção representa uma atividade bastante significativa para a economia regional, visto que, em determinadas localidades é a principal fonte de renda e sobrevivência da

população (BIAS, 2014; SILVA, *et. al.*; 2012). Entretanto, estudo realizado por Amorim (AMORIM, 2013), relata que o queijo é considerado um veículo freqüente de patógenos de origem alimentar, em especial os queijos frescos artesanais, por serem na maioria das vezes elaborados a partir de leite cru e não sofrerem processo de maturação, por pelo menos sessenta dias antes da comercialização (CRUZ & MENASCHE, 2014).

Sobe o ponto de vista microbiológico do queijo, a obtenção higiênica do leite é o primeiro ponto crítico no processo de fabricação de queijos e de outros derivados, uma vez que o animal, os equipamentos e o ambiente da ordenha podem representar uma fonte importante de contaminação por microrganismos (PICOLI APUD CASTANHEL, 2008). Além disso, o preparo de queijos artesanais requer constante manipulação que, por vezes, é realizado por pessoas sem nenhum conhecimento e/ou cuidado de higiene (ALVES, 2013). Em consequência disso, a contaminação microbiana de queijos merece destacada atenção a considerar que bactérias, como *Staphylococcus* spp, estão entre os micro-organismos potencialmente patogênicos mais encontrados em queijos artesanais (ROSA, *et. al.*; 2005).

O fornecimento de um alimento seguro ao consumidor envolve o conhecimento e uso de manipulação adequada, seguindo os princípios de Boas Práticas de Fabricação (BPF), englobando assim os princípios e procedimentos fundamentais necessários à produção de alimentos com qualidade desejável (SOUSA, 2006). Sendo assim, as condições higiênico-sanitárias devem ser monitoradas como uma ferramenta para determinação dos pontos que podem ser melhorados no processo de obtenção do leite, a fim de garantir um produto seguro e de qualidade (MALDANE, 2011).

Tendo em vista a importância do queijo na alimentação humana, a inexistência de condições higiênico-sanitárias adequadas constitui um risco à saúde do consumidor, pela veiculação de microrganismos patogênicos (SILVA, 2016). Sendo assim, o presente estudo tem como objetivo analisar os queijos artesanais comercializados nas feiras livres do município de Caruaru-PE, a fim de identificar possíveis contaminações através da presença de indicadores de contaminação como os coliformes totais e fecais, bactérias heterotróficas e *Pseudomonas aeruginosa*.

## **METODOLOGIA**

Trata-se de um estudo laboratorial (experimental) que ocorreu de fevereiro à outubro de 2016. O mesmo foi conduzido em feiras livres do município de Caruaru localizado na região do agreste pernambucano. De acordo com o censo realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no ano de 2010 sua população era composta de 314.912 habitantes, com área territorial de 920,611 km<sup>2</sup> (IBGE, 2016). Logo, a cidade é reconhecida nacionalmente como o maior centro econômico do Nordeste devido à feira de Caruaru, onde são comercializados vários produtos, desde artesanatos a alimentos, constituindo a base da economia local. Além disso, a agricultura e a pecuária são também importantes para a economia das comunidades

rurais (FLORENTINO, *et. al.*; 2007).

## Coleta e transporte das Amostras

Foram coletadas 50 amostras de queijos coalho comercializados, na qualidade de consumidor, em 6 feiras livres do município de Caruaru-PE de acordo com o plano de amostragem descrito no Codex Alimentarius (JAI, 2005). Desse modo, o universo da amostra foi constituído de acordo com a quantidade de queijos comercializados por feira e, deste, foram coletadas de 5-10% da quantidade total comercializada para a obtenção da amostra bruta. Essas unidades foram selecionadas das amostras em exposição, de fácil acesso ao consumidor, independente do tamanho ou peso.

As amostras foram coletadas em sacos estéreis específicos para coleta de alimentos, e após, as mesmas foram transportadas em recipiente isotérmico sob condições de refrigeração (4 a 10°C) aos laboratórios de Tecnologia e Microbiologia de Alimentos do Centro Universitário Tabosa de Almeida Ascens-Unita. O material foi mantido refrigerado em geladeira à temperatura próxima de 8°C até o momento das análises. Também foi preenchida uma ficha de registro de cada amostra coletada, contendo informações de identificação, como, data, horário e localização.

## Análise bacteriológica

No laboratório, as amostras de queijos foram submetidas à limpeza externa das embalagens com álcool a 70% para retirada de possíveis contaminantes. Posteriormente, dentro da capela de fluxo laminar foram trituradas 50g da amostra com 200 ml de soro fisiológico estéril a 0,9% em liquidificador industrial (METVISA) com copo esterilizado. As análises bacteriológicas dos queijos foram realizadas seguindo os critérios estipulados pela portaria SVS/MS 326 e a RDC nº 275 da ANVISA. Após a realização das mesmas, o queijo restante foi submetido à análise físico-química, sendo determinado o pH, através de método direto utilizando pHmetro, e temperatura utilizando termômetro digital.

## Pesquisa de coliformes totais, termotolerantes e *Pseudomonas aeruginosa*

Para a pesquisa de coliformes totais, termotolerantes e *Pseudomonas aeruginosa* foi utilizada a técnica dos tubos múltiplos recomendada pelo “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater”(EATON, *et. al.*; 2012). Os resultados obtidos foram comparados à tabela do número mais provável (NMP/g<sup>-1</sup>). A contagem de *Pseudomonas aeruginosa* foi realizada em caldo asparagina, na etapa presuntiva, e Acetamida na etapa confirmatória.

## Pesquisa de Bactérias Heterotróficas

Para o isolamento de colônias de bactérias heterotróficas foi utilizado a técnica de *pour-plate*, de acordo com o Standards Methods for the Examination of water and

wastewater (EATON, *et. al.*; 2012). A técnica consistiu na utilização de 7 placas de Petri, contendo 20mL de meio de cultura Plate Count Ágar (PCA), onde destas, uma foi destinada ao controle e as demais foram inoculados com 1mL e 0,1 mL das diluições de  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  ou  $10^{-6}$ . As placas foram homogeneizada realizando movimentos em forma de 8, e em seguida incubadas invertidas a 35°C durante 24 horas em estufa bacteriológica. Os resultados foram expressos em UFC/g de queijo.

### Análise Estatística

Os dados alcançados foram armazenados em um banco de dados utilizando o aplicativo Excel 2010 (Microsoft Office), sendo expressos por meio dos valores encontrados de Número Mais Provável (NMP) do microrganismo de interesse por grama de alimento (NMP/g), obtidos através da Tabela de Hoskins (FILHO, *et. al.*; 2009). Para classificação do grau de contaminação, foi criado um índice, desenvolvido neste estudo, estratificando o resultado em 5 partes, de acordo com a Tabela 1, tendo como base as faixas de NMP/g, com a finalidade de estabelecer o índice de contaminação das amostras por coliformes totais, termotolerantes e *Pseudomonas aeruginosa*.

Índice de contaminação	Classificação	NMP/g
0	Negativo	<2
1,0	Baixo	2 a 9
1,1	Intermediário	11 a 90
1,4	Alto	110 a 900
1,7	Muito Alto	1600 ou >1600

Tabela 1: Índice de contaminação microbiana expressos em NMP/g.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos na análise das amostras de queijos tipo coalho (n=50) comercializados em feiras livres, conforme demonstrado na Tabela 2, determinaram que 98% das amostras analisadas apresentaram crescimento para o grupo coliforme. Não havendo padrão para níveis de coliformes totais em queijo, os resultados apontam que as amostras analisadas apresentam significativo índice de contaminação.

Para Coliformes Termotolerantes, o índice alto e muito alto possuem valores acima do valor de referência preconizado pela Legislação Brasileira por meio da RDC nº 12/01, (RDC 12, 2001).

Localidade	Número Total de Amostras	Número de amostras Coliformes Totais (Classificação de índice)	Número de amostras Coliformes Termotolerantes (Classificação de índice)
Feira A	12	9 (Muito Alto) 3 (Alto)	4 (Muito Alto) 8 (Alto)

<b>Feira B</b>	12	11 (Muito Alto) 1 (Alto)	10 (Muito Alto) 2 (Alto)
<b>Feira C</b>	6	3 (Muito Alto) 3 (Alto)	1 (Muito Alto) 4 (Alto) 1 (Intermediário)
<b>Feira D</b>	6	3 (Muito Alto) 3 (Alto)	3 (Muito Alto) 2 (Alto) 1 (Baixo)
<b>Feira E</b>	6	3 Muito Alto) 2 (Baixo) 1 (Negativo)	3 (Alto) 2 (Baixo) 1 (Negativo)
<b>Feira F</b>	8	2 (Muito Alto) 2 (Alto) 4 (Intermediário)	2 (Muito Alto) 2 (Alto) 4 (Intermediário)

Tabela 2: Índice de contaminação por coliformes totais e termotolerantes.

\*Legenda: Negativo - < 2 NMP/g ; Baixo – 2 a 9 NMP/g; Intermediário -11 a 80 NMP/g; Alto – 110 a 900 NMP/g; Muito Alto – 1600 a >1600 NMP/g.

Observa-se que as amostras analisadas na feira B, tanto para coliformes totais, quanto para coliformes Termotolerantes, apresentaram um elevado índice de contaminação. Entretanto, os valores encontrados nas amostras pertencentes à feira E, encontra-se com um menor índice de contaminação microbiológica relacionado com NMP, conforme pode ser observado na tabela 2.

Os valores encontrados assemelham-se com o estudo realizado por FILHO, *et. al.*; (2009), que também encontraram contagens de coliformes fecal superior ao exigido pela legislação. Estudos realizados por OLIVEIRA, *et. al.*; (2010), no município do Cabo de Santo Agostinho- PE, no qual, das 42 amostras analisadas, 40 (95,24%) apresentaram discordância com os padrões microbiológicos estabelecidos pela RDC 12, (RDC 12, 2001).

Os coliformes presentes nas amostras analisadas podem ter relação com o controle de qualidade da matéria- prima, uma vez que esse tipo de queijo artesanal é elaborado a partir do leite cru não pasteurizado. Além disso, pode ter sido contaminado durante o processamento, no qual muitas vezes é manipulado por pessoas sem nenhuma condição higiênica adequada, e/ou durante o transporte, armazenamento ou comercialização. Tendo em vista que muitos produtores rurais não possuem os equipamentos necessários.

Assim como outros microrganismos, a pesquisa quanto à presença de *Pseudomonas aeruginosa* na água e nos alimentos tem se mostrado de grande importância. Tendo em vista, que é classificado como um dos microrganismos mais versáteis e oportunistas, e sua presença encontra-se cada vez mais difundida no meio ambiente, demonstrado uma relação clara entre o aumento dos surtos de doenças ligadas à alimentação (SILVA, *et. al.*, 2016).

Em relação a contagem de *Pseudomonas* nesse estudo, das 6 feiras analisadas 46 amostras de queijos apresentaram crescimento para o gênero *Pseudomonas spp.*,

enquanto que, em 45 amostras confirmaram *Pseudomonas aeruginosa*, demonstrado no gráfico abaixo.

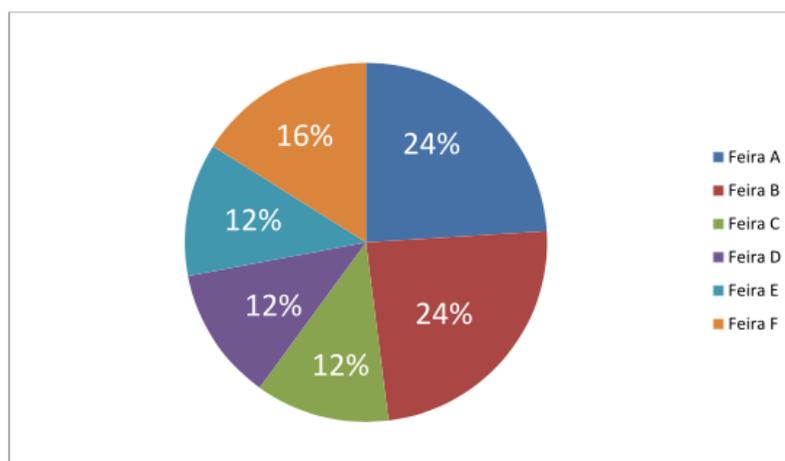


Gráfico 1- Índice de contaminação por *Pseudomonas aeruginosa*

SANGALETTI, *et. al.*; (2009), observou um aumento da população das bactérias psicrotróficas apresentando um aumento médio final de 8,50, 8,30 e 8,04 log UFC.g<sup>-1</sup>. Em um outro estudo realizado por MELO, *et. al.*; (2011), de 3 amostras de queijo coalho analisada, 2 amostras confirmaram *P. aeruginosa*, o que traduz a má qualidade higiênico- sanitária do produto.

Embora a Legislação Brasileira não exija análise para detecção da presença de *Pseudomonas* em alimentos, estudo realizado PINHO, *et. al.*; (2014), relata que várias espécies de *Pseudomonas*, quando presentes em número superior a 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, produzem proteases extremamente termorresistentes que podem degradar a caseína e reduzir a vida útil do leite UHT (ultra-high-temperature), resultando em perda de rendimento e de qualidade dos queijos devido a alterações sensoriais de sabor e textura.

GRUPOS	Feira A	Feira B	Feira C	MÉDIA UFC/g x 10 <sup>7</sup>	DESVIO PADRAO UFC/g X 10 <sup>7</sup>	CV (%)
I	11,8293	12,4468	10,7	11,6587	± 0,88580801	7,597828
II	Feira D 1,65333	Feira E 1,60834	Feira F 1,31429	1,52532	± 0,184136554	12,072

Tabela 3: Resultados de Bactérias Heterotróficas expresso em UFC/g.

A maioria das bactérias heterotróficas geralmente não são patogênicas (SCURACCHIO, 2010). Entretanto, alguns membros desse grupo estão inseridos como os principais patógenos envolvidos em doenças de origem alimentar (MALAVOTA, 2008). Neste estudo, observou-se que todas as amostras analisadas apresentaram contagem para bactérias heterotróficas. Havendo comportamentos diferentes em cada

feira, dividindo-se em dois grupos de acordo com o índice de contaminação.

As amostras de queijos pertencentes às feiras do grupo 1, mostraram-se mais contaminadas em relação ao grupo 2, estando todas fora do padrão microbiológico exigido. O alto índice desses microrganismos nas feiras do grupo 1, em especial a feira B, pode ter sido decorrente da contaminação do alimento pelos manipuladores e do ambiente, haja vista que, sua localização está nas proximidades do rio Ipojuca, contando com a presença de vetores no local.

Também foi visto nesse estudo, que os queijos analisados eram comercializados em bancas de madeiras juntamente com outros produtos expostos ao ambiente. Além disso, os comerciantes cortavam os queijos com facas que não sofria nenhum processo de higienização, e manipulavam os mesmos sem nenhum equipamento de proteção que evitasse a contaminação dos produtos. Outro ponto observado foi durante o processamento, pois havia presença de insetos (mosca doméstica), o que pode ter influenciado diretamente na contaminação do produto, já que essa espécie pode pousar em comida, contaminando-a com bactérias, sendo responsável pela propagação de possíveis DTAs.

Os resultados encontrados para o parâmetro físico-químico (pH) das amostras de queijos coalho analisadas, indicaram variação entre as amostras, como pode ser observado na Tabela 3.

Localidade	Média		Desvio Padrão	CV (%)
Feira A	5,516666667	±	0,180067327	3,26406
Feira B	5,5	±	0,175809815	3,196542
Feira C	5,55	±	0,151657509	2,732568
Feira D	5,483333333	±	0,213697606	3,897221
Feira E	5,366666667	±	0,081649658	1,521422
Feira F	5,5375	±	0,226384628	4,08821

Tabela 3: Resultados da análise Físico-Química

A análise do pH foi realizado pelo método direto, usando pHmetro. Os valores de pH das amostras analisadas variaram de 5,2-5,9 estando condizentes com o encontrado por (COSTA, 2012). Das 6 feiras analisadas, 83,3% das amostras da (feira A), 75% (feira B), 100% (feira C), 50% da (feira D e E), e 75% (feira F) não encontram-se dentro do padrão exigido pelo órgão fiscalizador que preconiza um pH em torno de 5,0 -5,3 para queijos (BRASIL, 1996).

De acordo com GOMES, *et. al.*; (2012), os alimentos podem ser classificados em função do pH: para alimentos pouco ácidos (pH > 4,5), os ácidos (pH 4 a 4,5) e os muito ácidos (pH < 4,0). O queijo tem um pH alto (5,7, quando se usa fermento, chegando a 6,5 quando não se usa fermento) criando condições favoráveis para as bactérias contaminantes se desenvolverem.

## CONCLUSÃO

Com base nos resultados encontrados, conclui-se que os queijos coalho comercializados nas feiras livres do município de Caruaru, demonstraram um elevado índice de contaminação microbiológica, tornando-se assim um produto de má condição para o consumo humano. Dessa forma, há a necessidade de uma fiscalização mais rigorosa pelos órgãos competentes a fim de garantir ao consumidor um alimento seguro do ponto vista microbiológico.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, V. O. **Avaliação higiênico- sanitária de amostras de queijos minas frescal artesanais comercializados em feiras livres da cidade de volta redonda-RJ e suscetibilidade antimicrobiana das estirpes patogênicas isoladas.** Niterói 2013.
- AMORIM, A. L. B. C. **Avaliação da qualidade higiênica e sanitária de queijos tipo minas padrão de fabricação industrial, artesanal e informal.** Brasília DF, 2013.
- ARAÚJO, J. B. C; PIMENTEL, J. C. M; PAIVA, F. F. A; MACEDO, B. A. **Produção artesanal de queijo coalho, ricota e bebida láctea em agroindústria familiar noções de boas práticas de fabricação,** Embrapa Brasília, DF, 2012.
- BRASIL. **Ministério da agricultura, do abastecimento e da reforma agrária. portaria n° 146 de 07 de março de 1996.regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos:regulamento técnico de identidade e qualidade de queijos.** Brasília, 1996.
- BRASIL. **Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Resolução RDC n. 12 de 02 de janeiro de 2001. Dispõe sobre o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.
- CARARO. P.; HAUTRIVE, T.P.; **Condições higiênico-sanitárias de queijos artesanais comercializados em feiras colonial do município de Chapecó-SC,** 2012.
- COSTA, W.N. **Análise físico-química de queijo minas padrão comercializados em feiras livres na cidade de Goiânia.** Anápolis 2012.
- CRUZ, F. T, MENASCHE, R. **O debate em torno de queijos feitos de leite cru: entre aspectos normativos e a valorização da produção tradicional.** Rev vig sanit debate; 2(4):34-42, 2014.
- DIAS, G. M. P. **Potencial tecnológico de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de coalho artesanal produzido no município de Venturosa- Pernambuco.** Recife, 2014.
- EATON, A. D; CLESCERI, L. S; RICE, E. W; GREENBERG, A. E. **Standard methods for the examination of water & wastewater. centennial edition,** 21 st edition, 2012.
- ESTEVES, F.A.M.; FIGUEIRÔA, E.O. **Deteção de enteroparasitas em hortaliças comercializadas em feiras livres do município de Caruaru –PE.** Revista baiana de saúde pública 2009; 33 (2) : 38-47.
- FILHO, J. R. F; SOUZA FILHO, J. S; OLIVEIRA, H. B; ÂNGELO, J. H. B; BEZERRA, J. D. C. **Avaliação da qualidade do queijo “coalho” artesanal fabricado em Jucati – PE.** extensio: revista eletrônica de extensão; 6( 8), 2009.

FLORENTINO, A. T. N.; ARAÚJO, E. L.; ALBUQUERQUE, U. P. **Contribuição de quintais agroflorestais na conservação de plantas da caatinga, município de Caruaru, PE, Brasil.** acta bot. Bras; 21(1): 37-47, 2007

GOMES, R. A.; MEDEIROS, U. K. L.; SILVA, F. A. P. **Caracterização físico-química dos queijos de coalho artesanal e industrial comercializados na cidade de currais novos/RN, 2012.**

IBGE - **Instituto brasileiro de geografia e estatística.** Disponível na internet via [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br), arquivo consultado em 30 de setembro de 2016.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos, 6ª ed. artmed, Porto alegre-RS, 2005.** rev. inst. Laticínios cândido tostes, Juiz de fora; 68 (391): 42-50, 2005.

KAMIYAMA C.M.; OTENIO M.H. **Aspectos sobre qualidade da água e qualidade de produtos na indústria de laticínios.** Rev. inst. laticínios cândido tostes, Juiz de fora 2013; 68 (391):42-50.

KAMIYAMA, C.M. **Qualidade da água em laticínio - a realidade da agroindústria participante do programa prosperar/ agroindústria.** Juiz de fora, 2012.

LOPES, L.H. **Feiras livres em Florianópolis – SC: práticas sustentáveis na comercialização de frutas, legumes e verduras in natura, 2014.**

MALAVOTA, L.C.M. **Avaliação dos pontos críticos no processamento sashimis” em restaurantes: análises bacteriológicas e pesquisa de sensibilidade a antimicrobianos , Niterói, RJ, 2008.**

MALDANER, N. I. **Avaliação da qualidade microbiológica do leite cru produzido em duas propriedades do extremo oeste de santa Catarina.** São Miguel do oeste, SC 2011.

MAMEDE, M.E.O.; VIANA, A.C.; SOUZA, A.L.C.; FARIAS, S.; ARAUJO P.A. **Estudo das características sensoriais e da composição química de queijo de coalho industrializado.** rev inst Adolfo lutz 2010; 69(3):364-70.

MELO, C.R.; SANTOS, D.R.; CARNEIRO, M.R.P. **Resistência antimicrobiana de isolados de pseudomonas aeruginosa em amostras de água e stuarina e alimentos comercializados em Aracaju, Sergipe- Brasil, 2011.**

MUNIZ, L.C.; MADRUGA, S.W. ARAÚJO C.L. **Consumo de leite e derivados entre adultos e idosos no sul do Brasil: um estudo de base populacional.** Rev ciência & saúde coletiva 2013; 18(12):3515-3522.

OLIVEIRA, K. A.; NETO, J. E.; PAIVA, J. E.; MEL, L. E. H. **Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no município do cabo de santo agostinho, Pernambuco, Brasil.** arq. inst. biol. , São Paulo; 77(3):435-440, 2010.

PICOLI APUD CASTANHEL, D. B D. **Qualidade microbiológica de queijos com registro de inspeção comercializados em criciúma, Santa Catarina, Criciúma, junho 2008.**

PINHO, C.R.G.; JÚNIOR, B.R.C.L.; OLIVEIRA, M.M.; TRIBST, A.A.; CRISTIANINI, M. **Atividade proteolítica de protease produzida por pseudomonas fluorescens ib 2312 em leite desnatado submetido ao processo de homogeneização à alta pressão.** Rev. inst. laticínios cândido tostes, Juiz de fora 2014; 69(4): 289-296.

PINTO F.G.S.; SOUZA, S.S.; MOURA, A.C.; **Qualidade microbiológica de queijo minas frescal comercializado no município de santa helena, PR, Brasil.** arq. inst. biol., São Paulo 2011;78(2):191-198.

ROSA, D. L. S. O, ACÚRCIO, L. B; SANT'ANNA, F. M; CASTRO, R. D; ROSA, B. O; SANDES, S. H. *et.al.* **Detecção de genes toxigênicos, susceptibilidade antimicrobiana e antagonismo in vitro de staphylococcus spp. isolados de queijos artesana.** Rev. vig sanit debate; 3(1):37-42, 2015.

SANGALETTI, N.; PORTO, E.; GUIDOLIN, S.; BRAZACA, C.; YAGASAKI, C.A.; DEA, R.C.D.; SILVA, M.V. **Estudo da vida útil de queijo minas.** Rev ciênc. tecnol. aliment 2009; 29 (2 ).

SCURACCHIO, P.A. **Qualidade da água utilizada para consumo em escolas no município de São Carlos - SP.** Araraquara - SP, 2010.

SILVA, S.G.M. **Qualidade microbiológica e contagem de células somáticas do leite de vacas mestiças coletado em Satuba- al rio largo,** 2015.

SILVA, A. F. S; LIMA, C. A; QUEIROZ, J. J. F; JÁCOME, P. R. L. A; JÁCOME JÚNIOR, A. T. **Análise bacteriológica das águas de irrigação de horticulturas,** Rev. ambient. água; 11 (2), 2016.

SILVA, A. S; SILVA, I. M. M; REBOUÇAS, L. T; ALMEIDA, J. S; ROCHA, E. V. S; AMOR, A. L. M. **Análise parasitológica e microbiológica de hortaliças.** Rev. vigil. sanit. Debate, 4(3):77-85, 2016.

SILVA, C.A.; STRAPAÇÃO, S.; YAMANAKA, E.H.U.; BALLÃO, C.; MONTEIRO, C.S. **Potabilidade da água de poços rasos em uma comunidade tradicional. revista biociências, taubaté** 2013 ;19(2): 88-92.

SILVA, R. A; BISMARA, P. A; MOURA, R. B; LIMA, FILHO, J. L; PORTO, A. L. F; CAVALCANTE, M. T. H. **Avaliação da microbiota bacteriana do queijo de coalho artesanal produzido na região agreste do estado de Pernambuco.** arq. bras. med. vet. Zootec; 64(6):.1732 -1738, 2012.

SOUSA, C. P. **Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos.** Rev aps ;9(1): 83-88, 2006.

## ANÁLISE DA EFICÁCIA DE PROGRAMAS DE CONTROLE DA DENGUE NO MUNICÍPIO DE BOA VISTA DO ESTADO DE RORAIMA

### **Fabiana Nakashima**

Universidade Federal de Roraima, Curso de Medicina

Boa Vista – Roraima

### **Ítallo de Souza Almeida**

Universidade Federal de Roraima, Curso de Medicina

Boa Vista – Roraima

### **Tulio Marroquim Galvão**

Universidade Federal de Roraima, Curso de Medicina

Boa Vista – Roraima

### **Iran Barros de Castro**

Universidade Federal de Roraima, Curso de Medicina

Boa Vista – Roraima

### **Nathalia Bittencourt Graciano**

Universidade Federal de Roraima, Curso de Medicina

Boa Vista – Roraima

### **Isabella Maravalha Gomes**

Universidade Federal de Roraima, Curso de Medicina

Boa Vista – Roraima

### **Ana Iara Costa Ferreira**

Universidade Federal de Roraima, Curso de Medicina

Boa Vista – Roraima

### **Bianca Jorge Sequeira Costa**

Universidade Federal de Roraima, Curso de Medicina

Boa Vista – Roraima

### **Leila Braga Ribeiro**

Universidade Federal de Roraima, Curso de Medicina

Boa Vista – Roraima

### **Wagner do Carmo Costa**

Governo do Estado de Roraima, Vice-governadoria

Boa Vista – Roraima

### **Fabiana Zimmermann dos Santos**

Professora colaboradora da Universidade Federal de Roraima, Curso de Medicina

Boa Vista - Roraima

### **Luis Enrique Galan Bermejo**

Universidade Federal de Roraima, Curso de Medicina

Boa Vista – Roraima

### **Rodrigo de Barros Feltran**

Universidade Federal de Roraima, Curso de Zootecnia

Boa Vista – Roraima

**RESUMO:** **Introdução:** Para combater a disseminação do arbovírus causador da dengue, vários programas de saúde nacionais e regionais são desenvolvidos com o intuito de controlar a proliferação e disseminação dos mosquitos responsáveis pela transmissão. **Objetivo:** Avaliar a eficácia dos programas de controle da dengue nas zonas do município de

Boa Vista, Roraima. **Metodologia:** Para avaliar a eficácia dos programas o sistema de notificação eletrônico da Unidade de Vigilância Epidemiológica do Hospital Geral de Roraima foi consultado. Deste sistema, dados referentes ao endereço de cada paciente notificado com dengue no período de 2013 a 2017 foram coletados. **Resultados:** Trezentos e noventa casos de dengue foram notificados entre 2013-2017. Desse total, 74 (19,0%) foram notificados no ano de 2013, 86 (22,1%) no ano de 2014, 162 (41,5%) em 2015, 40 (10,3%) em 2016 e 28 (7,2%) em 2017. As frequências de casos notificados encontradas neste período separadas por zonas foram: 3,3% para a zona centro, 2,6% zona leste, 12,1% zona norte, 76,2% oeste e 5,9% zona sul. Ao comparar as médias de casos de cada zona detectou-se que a zona oeste é a mais acometida. **Conclusão:** Diante do exposto, é possível compreender que a aplicação dos programas de combate da dengue foi eficaz, pois entre o período analisado encontrou-se redução do número de casos notificados, contudo, é necessária uma atenção especial para a zona oeste de Boa Vista.

**PALAVRAS-CHAVE:** Dengue. Promoção Nacionais de Saúde. Serviços Preventivos de Saúde. Eficácia.

**ABSTRACT: Introduction:** To combat the dissemination of arbovirus causador da dengue, several national and regional health programs are developed to control the proliferation and spread of mosquitoes responsible for transmission. **Objective:** To evaluate the effectiveness of dengue control programs in the areas of Boa Vista, Roraima. **Methodology:** To evaluate the effectiveness of the programs, the electronic notification system of the Epidemiological Surveillance Unit of the General Hospital of Roraima was consulted. From this system, data referring to the address of each patient notified with dengue in the period from 2013 to 2017 were collected. **Results:** Three hundred and ninety cases of dengue were reported between 2013-2017. Of this total, 74 (19.0%) were notified in 2013, 86 (22.1%) in 2014, 162 (41.5%) in 2015, 40 (10.3%) in 2016 and 28 (7.2%) in 2017. The frequencies of notified cases found in this period, separated by zones, were: 3.3% for the central zone, 2.6% for the eastern zone, 12.1% for the northern zone, 76.2% for the west, and 5.9% for the southern zone. When comparing the average cases of each zone it was detected that the western zone is the most affected. **Conclusion:** In view of the above, it is possible to understand that the application of dengue control programs was effective, since during the analyzed period there was a reduction in the number of reported cases, however, special attention is needed for the western area of Boa Vista.

**KEYWORDS:** Dengue. National Health Promotion. Preventive Health Services. Efficacy.

## 1 | INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença infecciosa causada pelo arbovírus da família Flaviviridae e do gênero *Flavivirus* (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005). Trata-se de

um vírus envelopado de RNA de fita simples, codificador de uma poliproteína que é clivada em proteínas estruturais [C (capsídeo), M (membrana), E (envelope)] e não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS2K, NS4B e NS5) (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005; WHITEHEAD; BLANEY; DURBIN, 2007; SALLES et al., 2018).

O ciclo de vida deste arbovírus nos seres humanos inicia-se com a hematofagia dos mosquitos vetores *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* infectados (WHITEHEAD; BLANEY; DURBIN, 2007; UNO; ROSS, 2018). A invasão à célula hospedeira ocorre após a adesão, seguida da endocitose mediada por receptores na superfície celular. No meio intracelular, a replicação do genoma viral ocorre nas membranas intracelulares e a montagem dos novos vírus acontece na superfície do retículo endoplasmático. Posteriormente a montagem, os vírus são transportados através do aparelho de Golgi e subsequentemente são liberados por exocitose (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005).

Estima-se que mais da metade da população mundial esteja em risco de infecção por este arbovírus (UNO; ROSS, 2018). No Brasil, mais de 100 mil casos foram notificados no período de 2010 a 2016 (WHO, 2019). Relatos históricos sobre a trajetória da dengue nas Américas indicam que a doença foi introduzida em Martinique e Guadeloup na França em 1635. Além disso, há indícios de que houve a erradicação do vetor em 18 países entre 1947 a 1970, entretanto, uma reinfestação do vetor surgiu no período de 1971 a 1999 devido aos fracassos dos programas de saúde voltados para o combate do mosquito, o que levou aos desenvolvimentos de surtos no período de 2000 a 2010 (BRATHWAITE-DICK et al., 2015; MARTÍN et al., 2010).

As manifestações da dengue são variadas, desde de casos assintomáticos a casos sintomáticos graves, como são os casos da dengue hemorrágica grave e da síndrome do choque da dengue (KHETARPAL; KHANNA, 2016). A doença é considerada um problema de saúde pública (SALLES et al., 2018) e a forma de prevenção da mesma é por meio do controle vetorial (BRASIL, 2009) que é de responsabilidade federal, estadual e municipal (MACIEL-DE-FREITAS; VALLE, 2014).

A responsabilidade federal envolve a criação de diretrizes para controle de vetores e destinação de recursos aos estados, os quais são responsáveis pela supervisão dos municípios, bem como como a aquisição de equipamentos e coleta de informações para notificar o Ministério da Saúde. Já os municípios são responsáveis pela operação e gerenciamento de profissionais de controle de vetores e ações (MACIEL-DE-FREITAS; VALLE, 2014).

Mesmo com todas essas funções das esferas governamentais, o controle vetorial continua sendo um desafio (VALLE, 2016), visto que os fatores que influenciam a proliferação do vetor são diversos, dentre eles estão a temperatura, a umidade relativa, o grau de urbanização e a qualidade dos serviços de controle de vetores em áreas urbanas (WHO, 2019). Como o município de Boa Vista está inserido em um espaço da Amazônia setentrional, possui o ambiente propício para a criação e propagação

do vetor (MANIERO et al., 2016). Dessa forma, o presente trabalho buscou avaliar a eficácia dos programas de controle da dengue nas zonas do município de Boa Vista, RR.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humano da Universidade Federal de Roraima (parecer 2.386.336). Para avaliar a eficácia dos programas de controle da dengue nas zonas do município de Boa Vista, RR, o sistema de notificação eletrônica da Unidade de Vigilância Epidemiológica (UVE) do Hospital Geral de Roraima (HGR) foi consultado. Desse sistema, foram extraídas as informações referentes ao endereço dos pacientes notificados no período de 2013 a 2017. A escolha deste período de estudo foi devido a UVE iniciar o uso do sistema informatizado.

Foram excluídos da pesquisa, pacientes de outro município, de outro país, de outras etnias, inclusive indígenas. Além destes, foram retirados do estudo pacientes que não relataram bairros e quando relataram bairros inexistentes, segundo o site da Folha de Boa Vista (FOLHA, 2016). Os dados foram planilhados no programa *Microsoft Excel* e analisados utilizando o *software GraphPad*.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Trezentos e noventa casos de dengue foram notificados pela UVE do HGR no município de Boa Vista entre o período de 2013 a 2017. Desse total, 74 (19,0%) foram notificados no ano de 2013, 86 (22,1%) no ano de 2014, 162 (41,5%) em 2015, 40 (10,3%) em 2016 e 28 (7,2%) em 2017. É possível observar que não houve uma diferença notável entre os números de casos notificados entre os anos de 2013 e 2014, entretanto, um aumento significativo foi observado no ano 2015, concordando com o aumento nacional de casos, de acordo com a *Health Information Platform for the Americas* (PLISA), 2019.

O estado de Roraima apresenta uma grande importância em relação ao restante do Brasil por fazer fronteira com países que são endêmicos (Venezuela e Guayana) (ROSA-FREITAS, 2003). Além disso, ao contrário do que ocorre no restante do Brasil, o município de Boa Vista apresenta uma singularidade por ter picos de incidência tanto em épocas de chuva quanto em épocas de seca (ZEIDLER et al, 2008). Essas condições podem ter favorecido o aumento do número de casos no ano de 2015, visto que, de acordo com o trabalho de Messias e colaboradores (2014), viagens internacionais são consideradas fatores-chaves para disseminação da dengue.

Nos anos seguintes (2016 e 2017) a diminuição de casos notificados no HGR também foi compatível com os dados publicados PLISA (2019). Coincidência ou não, a redução ocorreu após o Encontro Internacional para Implementação de novas

alternativas para o controle do *A. aegypti* que foi realizado no Brasil em fevereiro de 2016, sob a coordenação do Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) do Ministério da Saúde (SALLES et al., 2018).

Além do mais, o município de Boa Vista contou com o desenvolvimento de várias ações regionais, dentre elas, pode-se citar “Operação *Aedes aegypti*” em julho de 2017 (FOLHA, 2017) e o “Mutirão de combate ao *Aedes aegypti*” realizada também em julho de 2017 (PREFEITURA, 2017). Embora não seja possível apontar o fator específico que colaborou com esta diminuição, não se pode excluir o desenvolvimento destas ações. Acredita-se que o conjunto de ações e condutas colaboraram juntamente com a redução do número de casos no período estudado.

Ao estratificar os números de casos notificados no período pelas diferentes zonas do município, observou-se que os bairros mais acometidos durante os cinco anos de estudo pertencem a zona Oeste com 76,2%, seguida da zona norte com 12,1%, conforme exposto na tabela 1.

Ano/Zonas	Centro N (%)	Leste N (%)	Norte N (%)	Oeste N (%)	Sul N (%)	Total N (%)
2013	3 (4,0)	1 (1,4)	8 (10,8)	61 (82,4)	1 (1,4)	74 (100,0)
2014	2 (2,3)	3 (3,5)	9 (10,5)	64 (74,4)	8 (9,3)	86 (100,0)
2015	4 (2,5)	3 (1,9)	25 (15,4)	119 (73,5)	11 (6,8)	162 (100,0)
2016	1 (2,5)	3 (7,5)	3 (7,5)	31 (77,5)	2 (5,0)	40 (100,0)
2017	3 (10,7)	0 (0,0)	2 (7,1)	22 (78,6)	1 (3,6)	28 (100,0)
Total	13 (3,3)	10 (2,6)	47 (12,1)	297 (76,2)	23 (5,9)	390 (100,0)

Tabela 1. Número de casos de dengue notificados no período de 2013 a 2017 na Unidade de Vigilância Epidemiológica do Hospital Geral de Roraima separados por zonas do município de Boa Vista-Roraima

Os achados podem ser explicados devido ao fato da divisão das regiões na capital Boa Vista ser desigual, visto que a região Norte possui apenas seis bairros, a zona Sul possui cinco bairros, a zona Leste possui quatro bairros, a zona Centro é composta unicamente pelo bairro centro e a Zona Oeste é composta por cerca de 40 bairros (FOLHA, 2016). Sendo assim, a maior parte dos bairros da cidade está concentrada em apenas uma zona, sendo ela, a zona Oeste, podendo explicar a preponderância da mesma sobre as outras apresentadas.

De acordo com estimativas do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGEa, 2010), Boa Vista tem atualmente cerca 284.313 mil habitantes divididos em 56 bairros (FOLHA, 2016). A maior zona de Boa Vista é marcada por uma urbanização desorganizada (STAEVIE, 2011). Este fato pode contribuir para a proliferação de mosquitos devido à grande quantidade de criadouros existentes na área e pela baixa taxa de esgotamento sanitário (IBGEb, 2008).

Além destes fatores, o estado de Roraima tem recebido grande fluxo migratório de outros países, especialmente da Venezuela (BRASIL, 2018). Além disso, muitos

imigrantes estão vivendo em condições miseráveis, com pouco ou nenhum saneamento e higiene. Ambientes insalubres como esses favorecem a proliferação do mosquito vetor.

Para verificar se as frequências de casos notificados separadas por zonas apresentam diferenças estatisticamente significantes o teste ANOVA foi utilizado para comparar as médias de casos do período (2013 a 2017), conforme ilustrado na tabela 2.

	Centro	Leste	Norte	Oeste	Sul	P*
Média de casos	2,6	2	9,4	59.4	4,6	< 0.0002
Desvio-padrão	1,140	1.414	9,236	38.017	4,615	
Número (anos)	5	5	5	5	5	

Tabela 2. Média de casos de dengue notificados no período 2013-2017 separados por zonas do município de Boa Vista-RR

\*P=Valor de p determinado pelo teste ANOVA.

Com esse resultado fica evidente que há diferenças estatisticamente significantes entre as médias de casos de dengue nas diferentes zonas de Boa Vista-RR no período estudado, sendo a zona oeste a mais afetada (tabela 3).

Comparações entre zonas	P*	T**	Graus de Liberdade	Intervalo de confiança de 95%
Centro vs Oeste	0,01	3.339	8	17,576 a 96, 024
Leste vs Oeste	0,0097	3,374	8	18,167 a 96,633
Norte vs Oeste	0,0212	2.858	8	9,654 a 90,346
Sul vs Oeste	0,0126	3,200	8	-94,294 a 15,306

Tabela 3. Análise das médias de casos de dengue no período de 2013 a 2017 entre as zonas centro, leste, norte e sul com a oeste

\*P=Valor de p, \*\*T=Teste T-Student

Com este resultado fica evidente que ações públicas de saúde devem ser realizadas com maior intensidade na zona oeste, visto que a média de casos notificados foi maior do que as outras zonas para o mesmo período. As ações de prevenção são importantíssimas para se evitar a proliferação do vetor da dengue e reduzir o número de infectados e ao mesmo tempo os óbitos (SANTOS et al., 2017). Contudo, a falta de uma vacina eficaz e segura, a força de morbidade do agente infeccioso e a alta competência vetorial do *Aedes aegypti*, tornam a prevenção da dengue uma tarefa quase impossível de ser atingida com os atuais meios disponíveis para sua prevenção (BARRETO; TEIXEIRA, 2008). Dessa forma, a vigilância epidemiológica periódica e

a conscientização da população correspondem a ações necessárias para controlar a reprodução do mosquito (BRASIL, 2011).

Por esse motivo, é fundamental que haja campanhas visando repassar informações pertinentes para o combate do *Aedes aegypti* pela própria comunidade, principalmente naqueles bairros onde existe um número elevado de casos. Vale ressaltar aqui a importância de investimentos em tecnologias capazes de combater efetivamente essa doença que ceifa anualmente milhares de vidas.

## 4 | CONCLUSÃO

Compreende-se que a aplicação dos programas de combate da dengue em Boa Vista foi eficaz, pois entre o período analisado encontrou-se redução do número de casos notificados, apesar de não ser possível apontar qual foi a medicina mais eficiente. Além disso, ficou evidente que a zona oeste de Boa Vista de Roraima necessita de mais ações, visto que a média de casos foi maior quando comparada as outras zonas.

## REFERÊNCIAS

BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. L. C. **Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa**. Estud. av. v.22, n.64, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue.org.br: Prevenção da dengue**. 2011. Disponível em: [http://www.dengue.org.br/dengue\\_prevenir.html](http://www.dengue.org.br/dengue_prevenir.html). Acessado em 19 de Fevereiro de 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue**. Brasília: MS, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **INFORME Nº 10I 2017/2018**. Situação dos Casos de Sarampo nos Estados de Roraima e Amazonas – 2018. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/junho/11/af-Informe-Sarampo-n10-final-5jun18.pdf>. Acesso em: 19 de Fevereiro de 2019.

Brathwaite-Dick, O.; San Martín, J. L.; Montoya, R. H.; del Diego, J.; Zambrano, B.; Dayan, G. H. **Review: The History of Dengue Outbreaks in the Americas**. Am. J. Trop. Med. Hyg. V. 87, n. 4, 2012.

FOLHA DE BOA VISTA. **BV tem 56 bairros, alguns desconhecidos**, 2016. Disponível em: <https://folhabv.com.br/noticia/BV-tem-56-bairros--alguns-desconhecidos/13061>. Acessado em 19 de Fevereiro de 2019.

FOLHA DE BOA VISTA. **Operação do exército visitou 30 mil residências**, 2017. Disponível em: <https://folhabv.com.br/noticia/Operacao-do-exercito-visitou-30-mil-residencias/30570>>. Acesso em: 20 de agosto de 2018.

IBGEa. Instituto brasileiro de geografia e estatística. **Panorama da cidade de Boa Vista**, 2010. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rr/boa-vista/panorama>. Acesso em: 19 de Fevereiro de 2019.

IBGEb. Instituto brasileiro de geografia e estatística. **Pesquisa Nacional de Saneamento Básico da Cidade de Boa Vista**, 2008. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rr/boa-vista/pesquisa/30/30051>. Acesso em: 19 de Fevereiro de 2019.

Khetarpal, N; Khanna, I. **Review Article Dengue Fever: Causes, Complications and Vaccine Strategies.** Journal of Immunology Research, 2016.

Maciel-de-Freitas R, Valle D. **Challenges encountered using standard vector control measures for dengue in Boa Vista, Brazil.** Bull World Health Organ. V. 92, 2014.

MANIERO, V.C.; SANTOS; M.O.; RIBEIRO, R.L.; OLIVEIRA, P.A.C.; SILVA, T.B.; MOLERI, A.B.; MARTINS, I.R.; LAMAS, C.C.; CARDOZO, S.V. **Dengue, Chikungunya e Zika vírus no brasil: situação epidemiológica, aspectos clínicos e medidas preventivas.** Almanaque Multidisciplinar de Pesquisa, v. 1, n. 1, 2016.

Martín, J. L. S; Brathwaite, O; Zambrano, B; Solórzano, J. O; Bouckennooghe, A; Dayan, G. O; Guzmán, M. G. **The Epidemiology of Dengue in the Americas Over the Last Three Decades: A Worrisome Reality.** Am. J. Trop. Med. Hyg. V.82. n. 1, 2010.

Messina, J. P.; Brady, O. J.; Scott, T. W.; Zou, C.; Pigott, D. M.; Duda, K. et al. **Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history.** Trends Microbiol. v. 22, n. 3, 2014

Mukhopadhyay, S; Kuhn, R.J; Rossmann, M. G. **A Structural perspective of the flavivirus life cycle.** Nature reviews microbiology. v.3, 2005.

PLISA. HEALTH INFORMATION PLATFORM FOR THE AMERICAS. **Dengue Fever in the Americas.** Disponível em: <http://www.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/indicadores-dengue-en/dengue-nacional-en/252-dengue-pais-ano-en.html?start=2>. Acesso em: 19 de Fevereiro de 2019.

PREFEITURA MUNICIPAL DE BOA VISTA. **Saúde: Prefeitura promove mais um mutirão de combate ao Aedes aegypti,** 2017. Disponível em: <https://www.boavista.rr.gov.br/noticias/2017/07/saude-prefeitura-promove-mais-um-mutirao-de-combate-ao-aedes-aegypti>. Acessado em: 20 de agosto de 2018.

ROSA-FREITAS, M. G. et al. **Exploratory Temporal and Spatial Distribution Analysis of Dengue Notifications in Boa Vista, Roraima, Brazilian Amazon, 1999-2001.** Dengue Bulletin. v. 27, 2003.

Salles, T. S; Sá-Guimarães, T. E; Alvarenga, E. S. L; Guimarães-Ribeiro, V; Meneses, M. D. F; Castro-Salles, P. F. et al. **History, epidemiology and diagnostics of dengue in the American and Brazilian contexts: a review.** Parasites & Vectors. v. 11. n. 264, 2018.

SANTOS, R. P. L. et. al. **Casos de dengue no estado De São Paulo.** Revista Saúde em Foco. Ed.9, 2017.

STAEVIE, P. M. **Expansão urbana e exclusão social em Boa Vista–Roraima.** Oculum Ensaios. n. 13, 2011.

Uno, n.; Ross, t. m. **Dengue virus and the host innate immune response.** Emerging Microbes & Infections. V. 7, n. 167, 2018.

Valle D. **Sem bala mágica: cidadania e participação social no controle de Aedes aegypti.** Epidemiol Serv Saude. V.25, 2016.

Whitehead S. S; Blaney J.E; Durbin, A. P; Murphy B.R. **Prospects for a dengue virus vaccine.** Nat Rev Microbiol. v. 5, 2007.

WHO. Organização mundial da saúde. **Dengue Control.** Disponível em: <https://www.who.int/denguecontrol/epidemiology/en/>. Acessado em 19 de Fevereiro de 2019.

ZEIDLER, J. D. et al. **Vírus dengue em larvas de Aedes aegypti e sua dinâmica de infestação, Roraima, Brasil.** Revista de Saúde Pública, v. 42, n. 6, p. 986-991, 2008.

## ANÁLISE DO PERFIL DOS PACIENTES SUBMETIDOS AO EXAME DE MICROALBUMINÚRIA REALIZADO NO LABORATÓRIO CENTRAL DE BIOMEDICINA NO PRIMEIRO TRIMESTRE DE 2018

**Flávia Karen Carvalho Garcia**  
**Marcos Emanuel Vilanova da Costa**  
**Jessica Santana de Oliveira**  
**Layanne Barbosa dos Santos**  
**Larissa Lisboa Rêgo Brito**  
**Rachel Freire Boaventura**

**RESUMO:** A albumina é uma proteína produzida no fígado e está presente em quantidade significativa no sangue. Em estado fisiológico, a sua excreção é irrisória, porém, esta molécula torna-se uma das primeiras proteínas detectadas quando ocorre um episódio de lesão, sendo um importante biomarcador renal. Pacientes com níveis detectáveis de microalbuminúria tem um risco maior de desenvolvimento de insuficiência renal, sendo aconselhado um monitoramento mais rigoroso e em intervalos específicos. O trabalho teve como objetivo mostrar o perfil dos pacientes que realizaram a pesquisa de microalbuminúria no período de janeiro a março no laboratório central de Biomedicina e salientar a importância do monitoramento da função renal. Foram coletadas 49 amostras dos quais foram medidos o volume urinário durante 24 horas e realizado ensaio turbidimétrico para a quantificação da albumina. No mês de janeiro obteve-se 15 amostras, fevereiro 19, e março 15. Referente a idade, 69,3% eram de pacientes do sexo feminino e apenas 30,7% masculino.

Em janeiro, o percentual de alteração foi de 26,7%, fevereiro 26,5% e março, 13,3%. Em janeiro e março o percentual foi o mesmo de amostras alteradas referentes ao sexo, porém, em fevereiro, das amostras alteradas, 60% foi para o sexo feminino e 40%, para o masculino. Os resultados apresentados evidenciaram que pacientes do sexo feminino possuem um quadro clínico mais favorável. Essa relevância pode ser associada ao fato de as mesmas realizarem um maior monitoramento. Apesar da baixa frequência de alteração, é importante salientar a necessidade de monitoramento, já que patologias renais são silenciosas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Microalbuminúria; Lesão Renal; IRA; IRC;

**ABSTRACT:** Albumin is a protein produced in the liver and is present in significant amounts in the blood. In the physiological state, their excretion is negligible, however, this molecule becomes one of the first proteins detected episode when a lesion is an important renal biomarker. Patients with detectable levels of microalbuminuria has a higher risk of developing kidney failure, being advised stricter monitoring at specific intervals. The study aimed to show the profile of patients who had microalbuminuria in the period from January to March in the central laboratory of Biomedicine and stress the importance of monitoring of renal function. 49 samples were

taken which were measured urine volume and held for 24 hoursturbidimetric assay for the quantitation of albumin. In January we obtained 15 samples, February 19, and March 15. Regarding age, 69.3% were females and only 30.7% male. In January, the percentage change was 26.7%, 26.5% in February and March, 13.3%. In January and March the percentage was the same altered samples relating to sex, but in February, the altered samples, was 60% for females and 40% for males. The results presented showed that female patients have a more favorable clinical picture. This relevance can be associated with the fact that the same conduct further monitoring. Despite the low frequency change it is important to emphasize the need for monitoring, since renal pathologies are silent.

**KEYWORDS:** microalbuminuria; Renal injury; WILL; IRC;

## INTRODUÇÃO

A albumina é uma proteína globular sintetizada no fígado e está presente em quantidade significativa na circulação sistêmica. Esta é formada por aminoácidos que são solúveis em água e recebem assim, uma outra denominação, a homoproteína. Em estado fisiológico, a sua excreção é irrisória, porém, devido a sua estrutura molecular ser considerada pequena, esta molécula torna-se uma das primeiras proteínas detectadas quando ocorre um episódio de lesão renal, sendo assim, um importante biomarcador da mesma. A presença constante de microalbuminúria demonstra então, uma lesão a nível glomerular, de retina e grande vasos que podem ocasionar diversos efeitos prejudiciais a homeostase. Esta é de caráter multifatorial, mas destaca-se fatores como dislipidemia, tabagismo, hiperfiltração, diabete, hipertensão e alta ingesta proteica.

As disfunções renais podem caracterizar-se como agudas e crônicas, ambas levando a insuficiências com estágios de complicações diferentes ao paciente.

Inicialmente, a Insuficiência Renal Aguda (IRA) é o estágio inicial da lesão glomerular que muitas vezes é de caráter reversível. O alto número de casos provém de ambientes hospitalares e é descrita pela queda significativa da capacidade renal em retirar os metabolitos do organismo, que podem levar à distúrbios hídricos, eletrólitos e de caráter ácido-básico. O uso prolongado e indiscriminado de nefrotóxicos e casos de sepses são as principais causas da IRA. Estes provocam lesões que causam uma rápida e as vezes provisória disfunção dos néfrons que, se não revertidas rapidamente, pode tornar-se irreversível, conhecida como Insuficiência Renal Crônica (IRC) ou levar o paciente a óbito. Quanto à sintomatologia estão a sede constante, hipotensão ortostática, sedimento urinário ativo e oligúria entre os mais frequentes.

A IRC, caracteriza-se por uma extensa e mais complexa lesão a nível glomerular que afeta tanto a nível estrutural quanto a funcional os rins. Seus sintomas logo aparecem e são identificados inchaço na região periférica do corpo, fraqueza acompanhada com náuseas e vômitos frequentes, dificuldade de urinar, urina com muita espuma e aspecto sanguinolento e principalmente, dor na região lombar de forma constante. No Brasil a

estatística para essa disfunção aumenta a cada ano e vem se tornando uma questão de saúde pública. Estudos têm mostrado que a hipertensão arterial sistêmica (HAS) e a função renal estão intimamente relacionadas, podendo a primeira ser tanto a causa como a consequência da segunda (Luiz, 2008). Apesar da mesma ser multifatorial, a Hipertensão e o Diabetes Mellitus (DM) tem sido consideradas as principais causas atualmente identificadas, sendo a primeira, a de maior incidência de casos segundo estudos recentes.

O exame de microalbuminúria tem a finalidade de avaliar, monitorar e até mesmo prevenir patologias renais seja em um indivíduo susceptível ou não. Pacientes com níveis detectáveis consistentes de microalbuminúria tem um risco maior de desenvolvimento de insuficiência renal progressiva, sendo aconselhado um monitoramento mais rigoroso e em intervalos específicos de acordo com sua condição clínica

O presente trabalho teve como objetivo mostrar o perfil dos pacientes que realizaram a pesquisa de microalbuminúria no período de janeiro a março no laboratório central de Biomedicina localizado em Aracaju/Sergipe e salientar a importância do monitoramento da função renal regularmente.

## **METODOLOGIA**

Tratou-se de uma pesquisa exploratória de caráter longitudinal a partir de informações obtidas no Laboratório Central de Biomedicina localizado em Aracaju/SE. Os dados obtidos no laboratório deram-se no período de janeiro a março de 2018.

Foram coletadas 49 amostras dos quais foram medidos o volume urinário durante 24 horas e realizado ensaio turbidimétrico para a quantificação da albumina. Para a expressão do resultado em mg/24 horas utiliza-se a fórmula:  $\text{Microalbuminúria} = \frac{\text{Microalbuminúria} \times \text{Volume Urinário (mg/24horas)}}{\text{Volume Urinário (L)}}$  de 24 horas (L).

## **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

Foram realizadas 49 dosagens de albumina no volume urinário no primeiro trimestre de 2018. No mês de janeiro obteve-se 15 amostras, 19 em fevereiro, e em março um total de 15 amostras. Referente a idade, 69,3% eram de pacientes do sexo feminino e apenas 30,7% masculino.



Figura 1: Percentual de amostras recebidas no primeiro trimestre de 2018.

Em janeiro, o percentual de alteração foi de 26,7%, 26,5% no período de fevereiro e em março, o percentual de, 13,3%.

No mês de janeiro e março a estatística foi a mesma para as amostras alteradas referentes ao sexo, o que equivale a 50% dos laudos confirmados. Porém, em fevereiro, das amostras alteradas, 60% foi para o sexo feminino e 40%, para o masculino.



Figura 2: Alterações em cada mês do primeiro trimestre de 2018.

Os resultados apresentados evidenciaram que pacientes do sexo feminino possuem um quadro clínico mais favorável se comparado aos do sexo masculino. Essa relevância pode ser associada ao fato de as mesmas realizarem um maior e mais rigoroso monitoramento para fins de prevenção e acabam detectando precocemente a disfunção e com isso otimizam o tratamento aumentando as chances de regressão da lesão renal, e além disso, por serem mais propensas à dislipidemias e disfunções hormonais por questões fisiológicas, já que a mulher tem um percentual inferior de massa magra e maior de gordura para fins conceptivo, além de mais exposição a estresses corriqueiros que podem desencadear distúrbios hormonais, entre eles a DM

atrelado a casos de hipertensão e uma circulação comprometida. Fatores associados ao tabagismo, ingestão de substâncias nefrotóxicas e alta ingestão de alimentos é possível detectar mais fortemente no meio masculino, já que as estatísticas demonstram um alto consumo de cigarro por meio destes e a ingestão de substâncias e alimentos ricos em albumina para fins de definição e ganho de massa muscular.

## CONCLUSÕES

Apesar da baixa frequência de alteração no exame comparado a sua totalidade, é importante salientar uma maior necessidade de monitoramento, já que patologias renais costumam ser silenciosas e já descobertas em seu estado avançado, dificultando a terapêutica e conseqüentemente a sua eficácia. Políticas de prevenção e monitoramento são de grande importância tendo em vista que atualmente ainda é um exame pouco solicitado como pode-se notar com o número de solicitações no primeiro trimestre. Uma atenção em especial deve ser tomada para com o grupo de risco, já que otimizam a forma e o tempo de tratamento, deixando o paciente mais confortável e seguro para seguir com o mesmo de forma mais disciplinada, tendo em vista que é de um grande abalo psicológico e emocional para o paciente chegar ao estágio de internação e hemodiálise.

## REFERÊNCIAS

- Queiroz, M. D. S. R., de Andrade, T. V. F., de Sousa Barros, D., da Silva Alves, H., da Silva, R. O. N., Felício, I. M., ... & Dantas, D. S. (2018). **AValiação da função renal em pacientes portadores de doenças crônicas não transmissíveis**. *Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management*, 13(3).
- Dantas, E. N. D. A., da Silva, E. B., da Silva, C. P., de Oliveira, N. D., de Lima Moura, R., da Silva Ponciano, C., ... & de Mendonça Falcone, A. P. (2018). **Terapia Nutricional Submetida em Pacientes com Doença Renal Crônica**. *International Journal of Nutrology*, 11(S 01), Trab9.
- Delgado-Mejía, M., Delgado-Astorga, C., Ávalos-Ruvalcaba, T., Paredes-Casillas, P., & González-González, E. (2019). **Control and evaluation of microalbuminuria in a population of the state of Nayarit, Mexico. Study conducted by self-measurement on loan of blood pressure**. *Medicina Interna de México*, 34(6), 864-873.
- Soares, F. C., Aguiar, I. A., de Paula Furtado, N., de Carvalho, R. F., Torres, R. A., Segheto, W., ... & de Assis Costa, J. (2018). **PREVALÊNCIA DE HIPERTENSÃO ARTERIAL E DIABETES MELLITUS EM PORTADORES DE DOENÇA RENAL CRÔNICA EM TRATAMENTO CONSERVADOR DO SERVIÇO UBAENSE DE NEFROLOGIA**. *Revista Científica FAGOC-Saúde*, 2(2), 21-26.
- Luiz BL. **Hipertensão arterial e insuficiência renal crônica**. *Rev Bras Hipertens*, 15(3):152-155, 2008.
- SOUZA, S.E.; SILVA, M.C.M. **Principais causas de insuficiência renal aguda em unidades de terapia intensiva: intervenção de enfermagem**. *Rev. Enf. Ref.* vol. (9): 181-189, 2013.
- NUNES, T.F.; BRUNETTA, D.M.; LEAL, C.M.; PISI, P.C.B.; FILHO, R.J. **Insuficiência renal aguda. Simpósio: Condutas em enfermagem de clínica médica de hospital de média complexidade -**

MURUSSI, M. et al., **Risk factors for microalbuminuria and macroalbuminuria in type 2 diabetic patients**. Diabetes Care. n. 25, p.1101-1103, 2002.

Rao, T. J., & Madhukar, A. M. (2017). **Study of microalbuminuria in type 2 diabetes mellitus**. Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences, 6(14), 1110-1115.

FORNAZARI, B.; SEVIGNANI, G.; RIBAS, G.C.; NASCIMENTO, M.M.; CHULA, D.C. **Injúria Renal Aguda: Estudo de 179 casos internados no hospital de clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR)**. Revista Médica da UFPR, vol. 1, n. 3: p 92-96, 2014.

## ANÁLISE HISTOQUÍMICA DA LÂMINA FOLIAR DE *Azadirachta indica* A.Juss

### **Rafaela Damasceno Sá**

Universidade Federal de Pernambuco,  
Departamento de Ciências Farmacêuticas,  
Laboratório de Farmacognosia  
Recife-Pernambuco

### **Felipe Ribeiro da Silva**

Universidade Federal de Pernambuco,  
Departamento de Ciências Farmacêuticas,  
Laboratório de Farmacognosia  
Recife-Pernambuco

### **Girllene da Silva Cavalcanti**

Universidade Federal de Pernambuco,  
Departamento de Ciências Farmacêuticas,  
Laboratório de Farmacognosia  
Recife-Pernambuco

### **Karina Perrelli Randau**

Universidade Federal de Pernambuco,  
Departamento de Ciências Farmacêuticas,  
Laboratório de Farmacognosia  
Recife-Pernambuco

**RESUMO:** *Azadirachta indica* A.Juss., conhecida popularmente no Brasil como Nim, é uma espécie da família Meliaceae de grande importância econômica. É uma planta muito utilizada por apresentar atividade inseticida, além de seu emprego medicinal. Apresenta diversos metabólitos secundários, destacando-se os terpenos. O objetivo do trabalho foi realizar a caracterização histoquímica da lâmina foliar

de *A. indica*. Secções transversais de lâminas foliares frescas foram submetidas a diferentes reagentes. Foram identificados compostos fenólicos, taninos, triterpenos e esteroides, alcaloides, compostos lipofílicos, lignina, amido e foi demonstrado que os cristais são de oxalato de cálcio. O estudo ampliou o conhecimento dos compostos químicos da espécie e auxilia na sua padronização farmacobotânica.

**PALAVRAS-CHAVE:** Farmacobotânica; Meliaceae; Microscopia; Padronização.

### HISTOCHEMICAL ANALYSIS OF THE LEAF

#### BLADE OF *Azadirachta indica* A.Juss.

**ABSTRACT:** *Azadirachta indica* A.Juss., popularly known in Brazil as “Nim”, is a species of the family Meliaceae of great economic importance. It is a plant widely used for presenting insecticidal activity, in addition to its medicinal use. It presents several secondary metabolites, highlighting the terpenes. The objective of this work was to perform the histochemical characterization of the leaf blade of *A. indica*. Cross-sections of fresh leaf blades were subjected to different reagents. They were identified phenolic compounds, tannins, triterpenes and steroids, alkaloids, lipophilic compounds, lignin, starch and it was demonstrated that the crystals are of calcium oxalate. The study has expanded the knowledge

of the chemical compounds of the species and assists in their pharmacobotanical standardization.

**KEYWORDS:** Pharmacobotany; Meliaceae; Microscopy; Standardization.

## 1 | INTRODUÇÃO

*Azadirachta indica* A.Juss., internacionalmente conhecida como Neem, é uma árvore de até 20 m de altura, originária da Índia, onde é considerada sagrada. É uma planta de clima tropical e no Brasil passou a ser chamada de Nim (MATOS, 2007).

A espécie é considerada economicamente importante e tem sido utilizada por séculos para arborização, como material para construção, combustível, lubrificante, adubo e praguicida, apresentando ação contra mais de 430 espécies de pragas (MARTINEZ, 2002; CHAUDHARY et al., 2017).

É utilizada também como medicinal para o tratamento de gastrite e úlcera gástrica, reumatismo articular, gota, diabetes e malária (MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005; MATOS, 2007). Nos últimos anos foi descoberto um grande número de metabólitos secundários na planta com atividade biológica, dentre elas anticâncer, antidiabética, antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, além de efeitos cardioprotetor, neuroprotetor, hepatoprotetor e imunomodulador (ALZOHAIRY, 2016; BIJAULIY et al., 2018; RAHMANI et al., 2018).

Os metabólitos produzidos pelas plantas medicinais geralmente são encontrados nas secreções de estruturas especializadas, que constituem os sítios de produção e acúmulo destas substâncias. A técnica de histoquímica apresenta valor na localização microquímica dos compostos farmacologicamente ativos e contribui na identificação dos vegetais. Além disso, o reconhecimento da histolocalização nas plantas facilita a investigação fitoquímica, fornecendo subsídio ao manejo e comercialização dos seus produtos (COSTA; PROENÇA DA CUNHA, 2000). Assim, o objetivo do trabalho foi realizar a caracterização histoquímica da lâmina foliar de *A. indica* através de microscopia óptica de luz.

## 2 | METODOLOGIA

O material vegetal foi coletado na Cidade Universitária em Recife, Pernambuco, Brasil e uma exsiccata foi depositada no Herbário Dárdano de Andrade Lima, no Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), sob número de tombamento 89652.

Testes histoquímicos foram realizados em secções transversais de lâminas foliares frescas, obtidas à mão livre, usando lâminas de aço e medula do pecíolo de embaúba (*Cecropia* sp.) como material de suporte. Os seguintes reagentes foram utilizados para indicar a presença das substâncias: dicromato de potássio (10%) para compostos fenólicos (JOHANSEN, 1940); vanilina clorídrica para taninos (MACE; HOWELL, 1974); Sudan III para compostos lipofílicos (SASS, 1951); tricloreto de antimônio para

triterpenos e esteroides (MACE et al., 1974); Dragendorff para alcaloides (YODER; MAHLBERG, 1976); Lugol para amido (JOHANSEN, 1940); floroglucinol para lignina (JOHANSEN, 1940) e ácido clorídrico (10%) para estabelecer a natureza dos cristais (JENSEN, 1962). Controles foram realizados em paralelo aos testes histoquímicos e lâminas semipermanentes foram preparadas contendo as secções transversais (JOHANSEN, 1940; SASS, 1951). A análise das lâminas histológicas foi conduzida em imagens em software (Toup View Image), obtidas por uma câmera digital acoplada a um microscópio óptico de luz (Alltion).

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Figuras 1A e 1B mostram a secção transversal da lâmina foliar de *A. indica* sem nenhum reagente. Compostos fenólicos foram encontrados no mesofilo (Fig. 1C), nas células epidérmicas (Fig. 1C) e no parênquima da nervura central (Fig. 1D). Nesses mesmos locais também foi evidenciada a presença de taninos (Fig. 1E-F), o que indica que esses metabólitos são a maior parte dos compostos fenólicos presentes na lâmina foliar de *A. indica*.

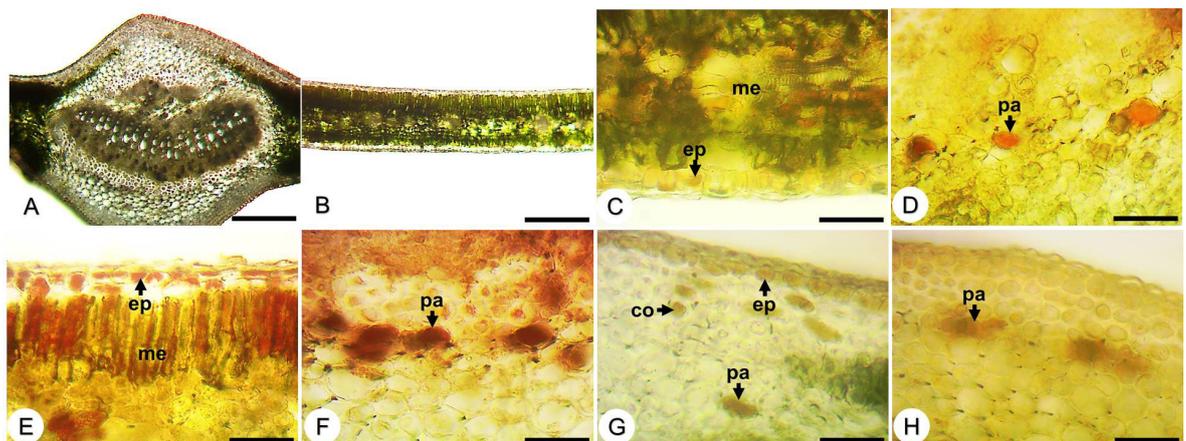


Figura 1 – Histoquímica da lâmina foliar de *Azadirachta indica* A.Juss.

A,B: Controle; C,D: Dicromato de potássio (10%); E,F: Vanilina clorídrica; G,H: Tricloreto de antimônio. co: colênquima; ep: epiderme; me: mesofilo; pa: parênquima. Barras: A-B: 200  $\mu$ m; C-H: 50  $\mu$ m.

Triterpenos e esteroides foram visualizados no parênquima e colênquima da nervura central e nas células epidérmicas (Fig. 1G). No parênquima da nervura central também foram visualizados alcaloides (Fig. 1H). Compostos lipofílicos foram encontrados na cutícula e em células do parênquima esponjoso (Fig. 2A). Grãos de amido foram observados nas células parenquimáticas próximas ao feixe vascular central (Fig. 2B). A lignina presente no xilema foi evidenciada com o uso do floroglucinol (Fig. 2C). O ácido clorídrico (10%) confirmou que os cristais são de oxalato de cálcio, após a dissolução dos mesmos (Fig. 2D-E).

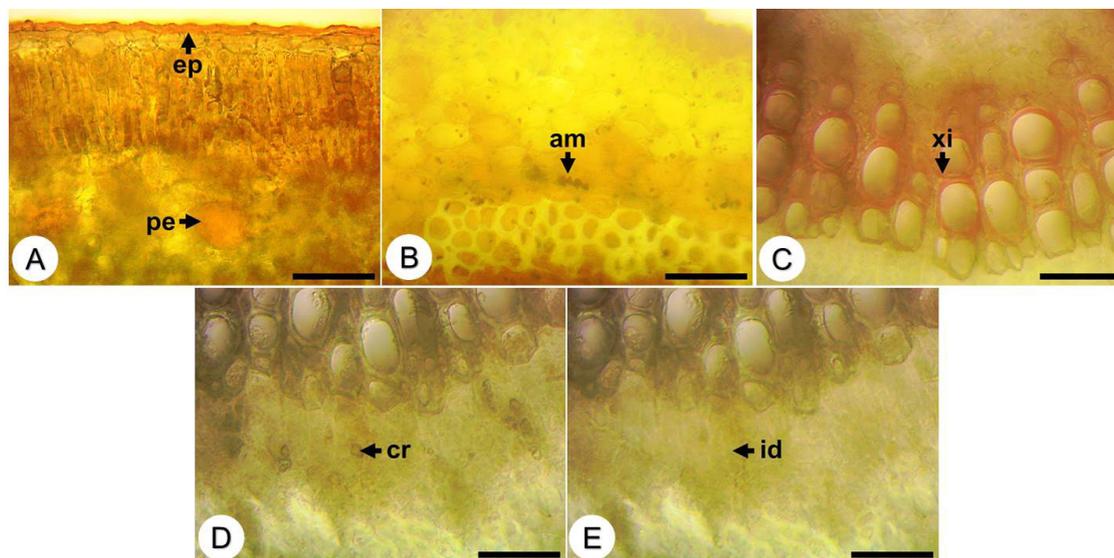


Figura 2 – Histoquímica da lâmina foliar de *Azadirachta indica* A.Juss.

A: Dragendorff; B: Lugol; C: Floroglucinol; D,E: Ácido clorídrico (10%). am: amido; cr: cristal; ep: epiderme; id: idioblasto; pe: parênquima esponjoso; xi: xilema. Barras: A-E: 50  $\mu$ m.

Estudos fitoquímicos caracterizaram a presença de alcaloides, compostos fenólicos, taninos, triterpenos e esteroides nas folhas de *A. indica* (BIU; YUSUFU; RABO, 2009; RAPHAEL, 2012; PANDEY; VERMA; SINGH, 2014; PRASHANTH; KRISHNAIAH, 2014; CRISTO et al., 2016).

Dentre as substâncias já identificadas encontra-se azadiractina, nimbolídeo,  $\beta$ -sitosterol, lupeol, rutina, catequina, quercetina, quercetrina, ácido elágico, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido clorogênico, luteolina, canferol e cumarina (MATOS, 2007; PANDEY; VERMA; SINGH, 2014; CRISTO et al., 2016; WANG et al., 2016). Algumas destas substâncias estão relacionadas a atividades biológicas, como o nimbolídeo, que possui atividade anticâncer (WANG et al., 2016), e a azadiractina, que apresenta atividade inseticida (MATOS, 2007).

Com relação aos compostos lipofílicos corados com o Sudan III, presentes em células do parênquima esponjoso, Jafari et al. (2013) afirmam que esses compostos são óleos essenciais ou resinas. Os autores ainda mostraram que a identificação dessas células de conteúdo lipofílico serve para diferenciar *A. indica* de *Melia azedarach* L., outra espécie da família Meliaceae, uma vez que nesta última espécie não se observa a presença dessas células.

#### 4 | CONCLUSÃO

O trabalho forneceu informações sobre os componentes químicos da lâmina foliar de *A. indica*, mostrando sua histolocalização e contribuindo com a padronização farmacobotânica da espécie.

## REFERÊNCIAS

- ALZOHAIRY, M. A. Therapeutics role of *Azadirachta indica* (Neem) and their active constituents in diseases prevention and treatment. **J. Evid. Based Complementary Altern. Med.**, v. 2016, 2016.
- BIJAULIYA, R. K. et al. An updated review of pharmacological studies on *Azadirachta indica* (neem). **Int. J. Pharm. Sci. Res.**, v. 9, n. 7, p. 2645-2655, 2018.
- BIU, A. A.; YUSUFU, S. D.; RABO, J. S. Phytochemical screening of *Azadirachta indica* (Neem) (Meliaceae) in Maiduguri, Nigeria. **Biosci. Res. Commun.**, v. 21, p. 281-283, 2009.
- CHAUDHARY, S. et al. Progress on *Azadirachta indica* based biopesticides in replacing synthetic toxic pesticides. **Front. Plant Sci.**, v. 8, p. 610, 2017.
- COSTA, A. F.; PROENÇA DA CUNHA, A. **Farmacognosia – Farmacognosia experimental**. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2000.
- CRISTO, J. S. et al. HPLC profile and antibiotic-modifying activity of *Azadirachta indica* A. Juss.(Meliaceae). **Ind. Crops Prod.**, v. 94, p. 903-908, 2016.
- JAFARI, S. et al. Micromorphological and preliminary phytochemical studies of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach*. **Turkish J. Bot.**, v. 37, n. 4, p. 690-697, 2013.
- JENSEN, W. A. Botanical histochemistry, principles and practice. San Francisco: W. H. Freeman and Company, 1962.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc., 1940. 523p.
- MACE, M. E.; BELL, A. A.; STIPANOVIC, R. D. Histochemistry and isolation of gossypol and related terpenoids in root of cotton seedlings. **Phytophatol.**, v. 64, p. 1297-1302, 1974.
- MACE, M. Z.; HOWELL, C. R. Histochemistry and identification of condensed tannin precursors in roots of cotton seedlings. **Can. J. Bot.**, v. 52, p. 2423-2426, 1974.
- MARTINEZ, S. S. **O Nim - *Azadirachta indica* natureza, usos múltiplos, produção**. Londrina: IAPAR, 2002.
- MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais – guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. 3. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2007.
- MOSSINI, S. A. G.; KEMMELMEIER, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): múltiplos usos. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 24, p. 139-148, 2005.
- PANDEY, G.; VERMA, K. K.; SINGH, M. Evaluation of phytochemical, antibacterial and free radical scavenging properties of *Azadirachta indica* (neem) leaves. **Int. J. Pharm. Pharm. Sci.**, v. 6, p. 444-447, 2014.
- PRASHANTH, G. K.; KRISHNAIAH, G. M. Chemical composition of the leaves of *Azadirachta indica* Linn (Neem). **Int. J. Ad. Eng. Technol. Manag. Appl. Sci.**, v. 1, p. 21-31, 2014.
- RAHMANI, A. H. et al. Pharmacological and therapeutic potential of neem (*Azadirachta indica*). **Pharmacogn. Rev.**, v. 12, n. 24, p. 250, 2018.
- RAPHAEL, E. Phytochemical constituents of some leaves extract of *Aloe vera* and *Azadirachta indica* plant species. **Glo. Adv. Res. J. Environ. Sci. Toxicol.**, v. 1, p. 14-17, 2012.

SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. 2. ed. Ames: The Iowa State College Press, 1951. 391p.

YODER, L. R.; MAHLBERG, P. G. Reactions of alkaloid and histochemical indicators in laticifers and specialized parenchyma cells of *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). **Am. J. Bot.**, v. 63, p. 1167-1173, 1976.

## ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA GOMA DE MANDIOCA COMERCIALIZADA NA FEIRA LIVRE DO BAIRRO ALVORADA II NA CIDADE DE MANAUS-AM

**Uziel Ferreira Suwa**  
**Elias da Silva Lemos**  
**Andreia Ferreira Silva**

**RESUMO:** A partir do processamento da mandioca, são gerados vários subprodutos. Um dos subprodutos que é bastante consumido em todo o Brasil e, principalmente, no Norte e Nordeste que ficou popularmente conhecida por ser um alimento saudável, livre de glúten e que em termos nutricionais a cada 100 g da goma de mandioca contém 347 calorias; 0,5 g de proteína; 0,4 g de fibras; 0,2 g de lipídios; 4 mg de sódio, 20 mg de fósforo, 20 mg de potássio, 11 mg de cálcio e 1 mg de ferro. Entretanto, devido ao seu teor mais elevado de água em comparação com a farinha de mandioca, a goma torna-se um alimento mais susceptível a contaminações por microrganismos. Diante disso, o presente estudo teve por objetivo avaliar a qualidade microbiológica em amostras de goma de mandioca, comercializadas na feira Livre do bairro Alvorada II na cidade de Manaus-Am. Foram obtidas, em condições de consumidor, 9 amostras de goma de mandioca de diferentes feirantes. As análises consistiram na avaliação da presença de coliformes termotolerantes, *Samonella/Shigella* spp e contagem de bolores e leveduras. Nas análises para coliformes termotolerantes, os

resultados variaram de 4 a  $7,2 \times 10^3$  NMP/g<sup>1</sup>, todas as amostras analisadas para os gêneros bacterianos *Salmonella/Shiguella* spp. foram positivas e no que concerne as análises de bolores e leveduras, os resultados variaram de 3,6 a  $8,1 \times 10^4$  UFC/g, estes resultados mostram que todas as amostras analisadas não estão viáveis para consumo segundo a RDC número 12.

**PALAVRAS-CHAVE:** Microbiologia de alimentos; Goma de mandioca; Segurança alimentar.

**ABSTRACT:** From the processing of cassava, several by-products are generated. One of the by-products that is widely consumed throughout Brazil and especially in the North and Northeast that is popularly known to be a healthy food, gluten-free and in nutritional terms every 100 g of cassava gum contains 347 calories; 0.5 g protein; 0.4 g of fibers; 0.2 g of lipids; 4 mg of sodium, 20 mg of phosphorus, 20 mg of potassium, 11 mg of calcium and 1 mg of iron. However, due to its higher water content compared to cassava flour, the gum becomes a food more susceptible to contamination by microorganisms. The objective of this study was to evaluate the microbiological quality of samples of cassava gum, marketed at the fair of Alvorada II in the city of Manaus-Am. 9 samples of manioc gum from different markets were

obtained under consumer conditions. The analyzes consisted in the evaluation of the presence of thermotolerant coliforms, *Salmonella* / *Shigella* spp and counting of molds and yeasts. In the analyzes for thermotolerant coliforms, the results varied from 4 to  $7.2 \times 10^3$  NMP / g<sup>1</sup>, all samples analyzed for the bacterial genera *Salmonella* / *Shigella* spp. were positive and, with respect to mold and yeast analyzes, the results ranged from 3.6 to  $8.1 \times 10^4$  CFU / g, these results show that all analyzed samples are not viable for consumption according to RDC number 12.

**KEYWORDS:** Food Microbiology; Manihot gum; Food safety.

## 1 | INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) pode ser considerada uma das plantas mais democráticas, pois é cultivada em todas as regiões tropicais do mundo e constitui-se como principal planta de subsistência. Nos países em desenvolvimento, a mandioca possui importância socioeconômica por ser um alimento de baixo custo, mas com essencial fonte de carboidratos para milhões de pessoas (ALMEIDA; SANTOS, 2011).

A partir do processamento da mandioca, são gerados vários subprodutos. Um dos subprodutos desta planta que é bastante consumido em todo o Brasil e, principalmente, no Norte e Nordeste, é a goma da mandioca (SILVA, 2016), subproduto obtido pela decantação natural da água no processo produtivo da farinha (LEAL; MOITA NETO, 2013).

Agoma de mandioca ficou popularmente conhecida por ser um alimento saudável, livre de glúten e que em termos nutricionais, a cada 100 g da goma de mandioca contém 347 calorias; 0,5 g de proteína; 0,4 g de fibras; 0,2 g de lipídios; 4 mg de sódio, 20 mg de fósforo, 20 mg de potássio, 11 mg de cálcio e 1 mg de ferro (SILVA, 2016). Entretanto, devido ao seu teor mais elevado de água em comparação com a farinha de mandioca, a goma torna-se um alimento mais susceptível a contaminações por microrganismos (SILVA, 2016).

Dentro do contexto das bactérias com capacidade de causar alterações em alimentos, o grupo dos coliformes fecais são utilizados como indicadores de condições higiênico-sanitárias. A presença desses microrganismos em produtos processados, provavelmente sugere contaminação posterior ao processamento, indicando uso de práticas inadequadas de manipulação e higiene (LIMA et al., 2007).

No que tange a Resolução RDC nº 12 de 02.01.2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, a goma de mandioca segue os padrões das (farinhas, massas alimentícias, produtos para e de panificação, (industrializados e embalados) e similares – “ amidos, farinhas, féculas e fubá, em pó ou flocados”): Coliformes a 45°C/g  $10^2$ ; ausência de *B. cereus*; ausência de *Salmonella* spp em 25g; e não há nada sobre a presença de fungos filamentosos e leveduriformes (BRASIL, 2001).

De acordo com Organização Mundial da Saúde – OMS, a contaminação dos alimentos é um risco à saúde do consumidor que podem levar a doenças de origem

alimentar, consideradas o maior problema de saúde pública em todo o mundo, sendo os manipuladores os principais agentes de contaminação (OMS, 2016).

Desta maneira, é importante considerar que pesquisas sobre microrganismos em alimentos no Brasil vem aumentando nos últimos anos. Todavia, na região Norte, pesquisas com esta vertente ainda são muito insignificantes e muitos alimentos produzidos e consumidos, principalmente os artesanais, possuem poucos estudos, sendo necessário maiores investigações, incluindo a goma de mandioca.

Diante disso, o presente estudo teve por objetivo avaliar a qualidade microbiológica em amostras de goma de mandioca, comercializadas na feira Livre do bairro Alvorada II na cidade de Manaus-Am.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Amostras, armazenamento e local de análise

Foram obtidas, em condições de consumidor, 9 amostras de goma de mandioca, comercializadas na feira Livre do bairro Alvorada II de diferentes feirantes. O material coletado foi acondicionado em sacos plásticos estéreis e armazenados em cooler refrigerados e encaminhado ao Laboratório Multiusuário do Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ, para posterior análise. Os resultados foram comparados com as diretrizes gerais da Resolução – RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (BRASIL, 2001).

### 2.2 Análise microbiológica

Foi pesado, assepticamente, 25g do alimento e homogeneizado com 225 mL peptona tamponada estéril 0,1% , após isso, fez-se a diluição seriada decimal até  $10^{-3}$ , para realização das demais análises.

Para as demais análises microbiológicas foram utilizados os métodos de preparação dos meios de cultura, de acordo com as orientações do Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos (SILVA et al., 2010). As análises consistiram na avaliação da presença de coliformes termotolerantes, *Samonella/Shigella* spp e contagem de bolores e leveduras.

Para garantir segurança e confiabilidade dos resultados, todas as amostras foram analisadas em triplicata, tirando-se a média quando positivas.

### 2.3 Coliformes Termotolerantes

Utilizou-se a técnica de tubos múltiplos, com três séries de três tubos em cada diluição ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ). Utilizou-se como meio presuntivo o caldo Lauril Sulfato Triptose, com incubação a 35°C durante 48 horas. A contagem de coliformes termotolerantes foi feita em Caldo *Escherichia coli*, (EC, MERCK®) com incubação a 45,5°C por 24 horas. Foi utilizada a tabela NMP para calcular o “Número Mais Provável” de coliformes fecais

por grama de alimento.

## 2.4 *Salmonella/Shigella* spp.

Para determinação de *Salmonella/Shigella* spp foi inoculado 0,1mL da diluição em meio Ágar *Salmonella Shigella* (SS), utilizando como técnica de *Spread Plate*, o método de plaqueamento em superfície. A incubação foi realizada na temperatura de 36°C por 24h, e, após isso, avaliou-se a presença e ausência das bactérias no meio cultura.

## 2.5 Contagem de Bolores e Levedura

Para contagem de bolores e leveduras foi inoculado 0,1mL da diluição, em meio Agar Batata (BDA), utilizando como técnica de *Spread Plate* o método de plaqueamento em superfície. Em seguida, foi realizada a incubação a 28°C por 5 dias. As colônias de bolores e leveduras foram contadas em contador de colônias e os resultados foram expressos pelo número de Unidades Formadoras de Colônia por grama de amostra (UFC/g).

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises realizadas no presente estudo, para avaliar a qualidade microbiológica da goma mandioca comercializadas na feira livre do bairro Alvorada II na cidade de Manaus – Am não apresentaram conformidade quanto ao padrão estabelecido pela RDC nº12 de 02.01.2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária para goma de mandioca, conforme descrito na Tabela 1.

Amostras	Parâmetros avaliados		
	Coliformes a 45°C/g <i>E. coli</i> NMP/g <sup>-1</sup>	<i>Salmonella/Shigella</i> spp. UFC/g	Bolores e Leveduras UFC/g
A1	6,1	Presente	5,9
A2	4	Presente	6,7
A3	4,5	Presente	4,5
A4	6	Presente	7,1
A5	4,9	Presente	6,5
A6	5,7	Presente	5,4
A7	7,2	Presente	3,6
A8	6,6	Presente	6,3
A9	4,1	Presente	8,1
<b>Padrão RDC nº 12</b>	<b>10<sup>2</sup>NMP/g<sup>-1</sup></b>	<b>AUSENTE em 25g</b>	<b>Sem padrão</b>

Tabela 1. Resultados de análises microbiológicas da goma de mandioca, na feira livre do bairro Alvorada II na cidade de Manaus – Am.

Nas análises para Coliformes Termotolerantes, os resultados variaram de 4 a

$7,2 \times 10^3 \text{NMP/g}^{-1}$ , esses resultados mostram que a goma de mandioca analisada não está dentro dos padrões da Legislação. Esta variação nos valores encontrados pode estar relacionada tanto às condições de equipamentos, processamento, manipulação, estocagem quanto às de comercialização e distribuição deste alimento. Santos (2017) estudando as condições higiênicas sanitárias das casas de farinhas em Sergipe, obteve como resultado a precariedade e a carência de Boas Práticas de Fabricação (BPF) desses estabelecimentos, o que pode comprometer a qualidade do produto final. Luna et al. (2013) analisaram o número mais provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes em amostras de goma de mandioca adquiridas em feiras livres e mercados de Juazeiro do Norte-CE, e observaram resultados abaixo de 3 NMP/g, constatando que as amostras estavam com qualidade microbiológica aceitável. Já Lima et al. (2007) estudando farinha e goma de mandioca, obtiveram  $0 \times 10^3$  a  $9,3 \times 10^4$  UFC/g de coliformes na goma de mandioca, resultados estes que vão de encontro com os resultados encontrados neste estudo.

Todas as amostras analisadas para os gêneros bacterianos *Salmonella/Shiguella* spp. foram positivas, demonstrando que as gomas de tapioca analisadas estão impróprias para consumo e fora do padrão segundo Legislação RDC nº12. Queiroz et al (2009) ao realizarem análises microbiológicas em sorvete de tapioca comercializados na cidade de Fortaleza- CE, mostraram a presença de *Salmonella* ssp em 75% das amostras, apesar de ser um alimento diferente da goma, o mesmo pode ter sido contaminado pelos utensílios utilizados no processo de fabricação e pelas próprias mãos dos manipuladores, o que não deve ter sido diferente na goma de mandioca comercializada na feira do Alvorada II na cidade de Manaus.

No que concerne as análises de bolores e leveduras, os resultados variaram de  $3,6$  a  $8,1 \times 10^4$  UFC/g, estes resultados mostram que todas as amostras analisadas não estão viáveis para consumo. Segundo Forsythe (2013) a elevada população de bolores e leveduras em alimentos é preocupante, pois a microbiota fúngica pode ser constituída por bolores do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* e os efeitos da invasão fúngica podem causar danos físico-químicos em alimentos, sendo também responsáveis pela produção de micotoxinas. Dósea et al. (2010) estudando farinha de mandioca em Sergipe, obteve resultados  $5,6 \times 10^3$  UFC de bolores e leveduras, resultados que corroboram com os apresentados neste trabalho. Pontes (2012) encontrou 66,8% das suas amostras com contaminação de fungos e bolores, onde 33,4% apresentaram acima do padrão.

Agoma de mandioca analisada neste estudo, se consumida, seria capaz de causar uma doença transmitida por alimentos – DTA, por conta de todos esses contaminantes encontrados. De acordo com Ministério da Saúde do Brasil, doenças transmitidas por alimentos, são causadas pela ingestão de alimentos e/ou água contaminados, existindo mais de 250 tipos de DTA e a maioria são infecções causadas por bactérias e suas toxinas, vírus e parasitas (BRASIL, 2017).

## 4 | CONCLUSÃO

A elevada quantificação microbiana obtida neste estudo sugere condições inadequadas de higiene durante o processamento, más condições de manipulação e comercialização, independentemente de sua patogenia. De acordo com RDC nº 12, este alimento, comercializado na feira Livre do bairro Alvorada II, na cidade de Manaus, não está dentro dos padrões estabelecidos pela norma e, portanto, não está viável para o consumo humano.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M.A.; SANTOS, E.S. Análise comportamental do agronegócio da mandioca (*Manihot esculenta*) no Brasil de 2004 a 2009. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v.5, n.2, p.441-49, 2011.

BRASIL. Informe ANVISA sobre alimentos. Disponível em: < [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/24\\_110507.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/24_110507.htm)>. Acesso em 15 de maio de 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Doenças Transmitidas por Alimentos. Portal Saúde. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/doencas-transmitidas-por-alimentos-dta>>. Acesso em 07 de julho de 2017.

DÓSEA, R.R; MARCELLINI, P.S.; SANTOS, A.A.; RAMOS, A.L.D.; LIMA, A.S. Qualidade microbiológica na obtenção de farinha e fécula de mandioca em unidades tradicionais e modelo. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.40, n.2, p.441-446, fev, 2010.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 602p.

LEAL, Régis Casimiro; MOITA NETO, José Machado. Amido: Entre a Ciência e a Cultura. **Química Nova Na Escola** 75 Vol. 35, N° 2, p. 75-78, maio 2013.

LIMA, C. P. S.; SERRANO, N. F. G.; LIMA, A. W. O.; SOUSA, C. P. Presença de microrganismos indicadores de qualidade em farinha e goma de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz). **Revista de APS**, Juiz de Fora, v. 10, p. 14-19, 2007.

LUNA, A.; RODRIGUES, F.F.G.; COSTA, J.G.M.; PEREIRA, A.O.B.; Estudo físico-químico, bromatológico e microbiológico de *Manihot esculenta* crantz (mandioca). **Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia**, v. 1, n.3, p. 1-11, 2013.

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Métodos de vigilância sanitária e gestão para manipuladores de alimento. Informe de uma reunião de consulta da OMS. Genebra, 2016. Disponível em: . Acesso em: 1 de jun. de 2017.

PONTES, C.G.C. Identificação de Fungos Contaminantes em Farinha de Mandioca (*Manihot esculenta* CRANTZ). (Dissertação) Graduação em Biologia, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2012.

QUEIROZ, Herlene Greyce da Silveira; SAMPAIO NETA, Nair do Amaral; SALES, Rachel Pinto; PASSOS, Maria do Carmo Rodrigues, COSTA, José Maria Correia da. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica de sorvetes do tipo tapioca. **Revista Ciência Agronômica** [en linea] 2009, 40 (Enero-Marzo): [Acesso em: 7 de julho de 2017] Disponível em:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=195318130009>>.

RODRIGUES, E.; ARAÚJO, A.; SOBRAL, F.; ROMÃO, N.. Avaliação da presença de bolores e leveduras em farinha de mandioca (*Manihot Esculenta Cratz*) comercializadas a granel em feiras livres do município de Ji-Paraná-RO. **South American Journal Of Basic Education, Technical And Technological**. v. 2, n. 2 P. 15-22 (2015).

SANTOS, Taynara Goes dos. Condições higiênicossanitárias de casa de farinha do município do Campo do Brito-SE. 2017. 52 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação de Tecnólogo em Alimentos) - Instituto Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2017.

SILVA, Debora Mota da. **Goma artesanal versus fécula industrial: substituição no consumo em Manacapuru-AM**. Dissertação (Mestrado em Geografia) - Universidade Federal do Amazonas. 126 f. 2016.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N.; TANIWAKI, M. H. SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4 ed. São Paulo: Varela, 2010.

## APROVEITAMENTO DA SEMENTE DE ABÓBORA (*Cucurbita moschata*) NO DESENVOLVIMENTO DE CREME HIDRATANTE ESFOLIANTE

### **Mariana Gavioli dos Reis Pena**

Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia, Juiz de Fora - MG.

### **Tatiane Amorim Lima**

Universidade Federal de Juiz de Fora, Departamento de Química, Juiz de Fora - MG.

### **Marcone Augusto Leal de Oliveira**

Universidade Federal de Juiz de Fora, Departamento de Química, Juiz de Fora - MG.

### **Guilherme Diniz Tavares**

Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia, Juiz de Fora - MG

### **Fabiano Freire Costa**

Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia, Juiz de Fora - MG

### **Paula Rocha Chellini**

Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia, Juiz de Fora - MG

**RESUMO:** A utilização de matérias primas vegetais em substituição aos materiais sintéticos é uma prática que vêm crescendo mundialmente, e entra no conceito de consumo verde, pois está diretamente relacionada ao desenvolvimento social e econômico sem agredir o meio ambiente. A semente de abóbora, da espécie *Cucurbita moschata*, é um resíduo industrial, sendo na maior parte descartado sem o devido aproveitamento. Seu principal constituinte é o óleo rico em diversos componentes bioativos

como ácidos graxos, tocoferóis, fitoesteróis, dentre outros, que são benéficos para a saúde. O objetivo desse trabalho foi incorporar o óleo e a semente de abóbora na formulação de um creme, pois o óleo apresenta característica emoliente, devido a formação de um filme lipídico sobre a pele que evita a perda de água, e a semente funciona como esfoliante físico, ajudando na remoção da camada superficial da pele eliminando as impurezas e devolvendo o seu aspecto natural. Além disso, destacar a utilização dessas sementes em substituição às microesferas de polietileno, que são altamente poluidoras do meio ambiente. Foram feitos os testes de estabilidade preliminar e acelerada, bem como a avaliação microbiológica da formulação. Em todos os casos, os parâmetros estavam dentro dos critérios de qualidade estabelecidos para cosméticos. Também foi realizada a caracterização e quantificação do teor de ácidos graxos no óleo de semente de abóbora e no creme após a sua incorporação, por cromatografia a gás, comprovando que o óleo está presente para exercer sua função e que não houve oxidação após o estudo de estabilidade.

**PALAVRAS-CHAVE:** consumo verde, semente de abóbora, esfoliação, estabilidade, cromatografia a gás.

**ABSTRACT:** The use of vegetable raw

materials as a substitute for synthetic materials is a practice that has been growing worldwide, and enters into the concept of green consumption, since it is directly related to social and economic development without harming the environment. Pumpkin seed, of *Cucurbita moschata* specie, is an industrial waste, most of it is discarded without proper use. Its main constituent is an oil rich in various bioactive components such as fatty acids, tocopherols, phytosterols, among others, which are beneficial to health. The objective of this work was to incorporate the oil and pumpkin seed in a cream formulation, because the oil presents an emollient characteristic, due to the formation of a lipid film on the skin that avoids the loss of water, and the seed acts as a physical exfoliant, helping to remove the superficial layer of the skin eliminating the impurities and returning their natural appearance. In addition, highlight the use of these seeds instead of polyethylene microspheres, which are highly environment polluting. Preliminary and accelerated stability tests were performed as well as the microbiological evaluation of the formulation. In all cases, the parameters were within the established quality criteria for cosmetics. It was also carried out the characterization and quantification of the fatty acid content in pumpkin seed oil and cream after its incorporation by gas chromatography, proving that the oil is present to perform its function and there was no oxidation after the stability study.

**KEYWORDS:** green consumption, pumpkin seed, exfoliation, stability, gas chromatography.

## 1 | INTRODUÇÃO

A pele é constantemente exposta aos diversos fatores externos, como poluição, maquiagem e radiação solar (RIBEIRO, 2010). Além disso, os fatores individuais como a idade, estilo de vida e estado de saúde, refletem e modificam a pele (SURBER, KOTTNER, 2017). Somado a isso, a busca pela manutenção da aparência jovem tem aumentado cada vez mais, favorecendo assim o desenvolvimento da indústria de cosméticos no Brasil e no mundo (CORDEIRO, 2013).

Em meio aos diversos tratamentos, a esfoliação é uma etapa fundamental, na qual as células mortas, os corneócitos, que apresentam queratina com baixo conteúdo hídrico, são removidas da superfície da pele, eliminando as impurezas, melhorando a textura e uniformidade, tendo como resultado a devolução do seu aspecto natural (CAREGNATTO, GARCIA, FRANÇA, 2007).

Os esfoliantes podem agir por mecanismos químico, físico e enzimático. Na esfoliação química, ocorre a introdução de substâncias capazes de alterar a molécula de queratina quimicamente (RIBEIRO, 2010). No processo enzimático, utiliza enzimas que realizam a hidrólise de ligações entre os aminoácidos, que formam a queratina na camada córnea. Ambos os procedimentos resultam na descamação e consequente renovação das células epidérmicas (FARIAS, 2014). No processo físico/mecânico, os agentes esfoliantes atuam essencialmente no estrato córneo da epiderme removendo parte da pele e induzindo à sua reepitelização, promovendo uma esfoliação superficial,

onde não ocorre interação do ativo com a pele no momento da aplicação (RIBEIRO, 2010). Alguns exemplos de substâncias abrasivas são de origem vegetal, mineral, marinha, orgânicos sintéticos, formadores de filme e carboidratos (CAREGNATTO, GARCIA, FRANÇA, 2007).

Uma tendência que abrange a indústria cosmética mundial é o consumo verde (OLIVEIRA, 2003). Ou seja, indústrias de cosméticos buscam a inovação, através da utilização de matérias-primas de origens diversificadas, principalmente oriundas de vegetais, representando uma alternativa de substituição dos materiais sintéticos por naturais (SOUZA, FERREIRA, 2010). Sob essa perspectiva, existem alternativas biodegradáveis e naturais para a produção de esfoliantes, que substituem as microesferas de polietileno, amplamente utilizadas em produtos cosméticos, mas que são potencialmente poluentes e podem chegar à natureza através do enxágue dos produtos e permanecer no meio ambiente por séculos. Uma vez no meio ambiente, não são conhecidas técnicas para retirar esses plásticos das águas, levando ao crescente acúmulo dessas substâncias na natureza (MOORE, 2008).

Nesse contexto, pode-se destacar a semente da abóbora como agente esfoliante natural, uma vez que a produção do óleo gera grande quantidade de resíduos, sendo importante agregar valor econômico, científico e tecnológico como forma de reaproveitar esse material (FARIAS, 2014). Além disso, o óleo da semente de abóbora pode ser incorporado como matéria-prima para o desenvolvimento de cremes, auxiliando no processo de hidratação da pele devido às propriedades emolientes (CÔRREA, 2012).

O componente principal da semente de abóbora da espécie *Cucurbita moschata* é o óleo, rico em ácidos graxos importantes como o palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oléico (C18:1 cis-9) e linoléico (C18:2 cis-9,cis-12). Além disso, contém tocoferóis e fitoesteróis (NAVES, 2010). Segundo Leonardi (2004), aproximadamente 50% dos lipídios sebáceos são triglicerídeos, o que demonstra a importância da incorporação desses ativos nas formulações cosméticas.

A técnica de cromatografia a gás é a mais utilizada entre os métodos oficiais disponíveis para identificar e quantificar ácidos graxos, podendo ser utilizada na avaliação do óleo de semente de abóbora e do creme hidratante e esfoliante. Os ácidos graxos são analisados na forma de metil esteres, após reação de derivatização empregada para converter os analitos em compostos mais voláteis (SRIGLEY, MOSSOBA, 2016).

Com esse trabalho objetivou-se o desenvolvimento de um creme esfoliante utilizando a semente de abóbora, um resíduo da indústria alimentícia, como ingrediente natural, agregando bioatividade, funcionalidade e apelo de marketing aos produtos.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Preparo da semente e do óleo de abóbora

As sementes da abóbora da espécie *Cucurbita moschata*, foram doadas pela agricultora Sra. Eni Freire Costa, sendo produzidas em uma fazenda do município de Candeias, Minas Gerais, Brasil. As sementes foram secadas naturalmente e, em seguida, torradas. Para a obtenção do óleo foi utilizado o Home-up YD-ZY\_01C para extração do óleo das sementes. A torta remanescente foi triturada e tamisada para uniformização dos tamanhos dos grãos ( $\pm 1,0$  mm).

### 2.2 Preparo da formulação

Preparou-se 500,0 gramas de base, a partir da fase aquosa (FA) e fase oleosa (FO), a primeira é constituída de água, glicerina, EDTA e solução de parabens, a segunda contém o Lanette N, vaselina líquida e BHT. Ambas as fases foram aquecidas em banho-maria separadamente, sendo que a FA foi aquecida até 75 °C e a FO até 70 °C. Com o auxílio do homogeneizador, Fisatom®. A FA foi vertida sobre a FO com constante agitação a 100 rpm, por 20 minutos, até formar o creme com posterior resfriamento da formulação. Quando o produto atingiu temperatura inferior a 40 °C foi adicionado o ciclometicone e manteve-se a agitação por mais 15 minutos. As matérias primas da formulação e suas concentrações estão descritas na **Tabela 1**.

Matéria-prima	Concentração	Função
Lanette N	10,0%	Base autoemulsionante
Vaselina líquida	3,0%	Emulsificante secundário
Glicerina	5,0%	Umectante
Ciclometicone	5,0%	Emoliente
Sal sódico do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)	0,1%	Agente quelante
Butilhidroxitolueno (BHT)	0,1%	Antioxidante
Solução de metil- e propilparabens	3,33%	Conservante Antimicrobiano
Água purificada	q.s.p 100%	Veículo

Tabela 1. Formulação do Creme

Fonte: A autora, (2019).

Após esse processo preparou-se seis formulações diferentes, contendo 30,0

gramas de base, **Tabela 2**, com diferentes concentrações de óleo e semente de abóbora visando avaliar a concentração a ser utilizada e, ainda, as propriedades emoliente (do óleo) e esfoliante (da semente).

B1	B2	B3	B4	B5	B6
Base + Semente 8,0%	Base + Semente 10,0 %	Base + Óleo 3,0% + Semente 8,0%	Base + Óleo 3,0% + Semente 10,0%	Base + Óleo 5,0% + Semente 8,0 %	Base + Óleo 5,0% + Semente 10,0%

Tabela 2: Formulações contendo diferentes concentrações de óleo e semente de abóbora.

Fonte: A autora, (2019).

## 2.3 Estudo de estabilidade

As amostras utilizadas para a avaliação da estabilidade foram acondicionadas em frascos de vidro transparente, com tampa que garantiu uma boa vedação. O volume total da embalagem não foi completado permitindo um espaço vazio (*headspace*) de aproximadamente um terço da capacidade do frasco para possíveis trocas gasosas.

Antes de iniciar o estudo da estabilidade preliminar foi feito o teste de centrifugação, no qual a amostra foi submetida a 3000 rpm por 30 minutos para avaliar qualquer instabilidade do creme e possível reformulação.

### 2.3.1 Estabilidade Preliminar

A amostra foi intercalada em temperaturas de  $50 \pm 2$  °C e  $-10 \pm 2$  °C a cada 24 horas durante 12 dias, e foi avaliada diariamente, conforme as suas características organolépticas, dando ênfase para possíveis alterações na aparência, cor e odor. Neste procedimento foi usado 30,0 g do esfoliante corporal.

### 2.3.2 Estabilidade Acelerada

A formulação foi submetida ao armazenamento em situações de temperatura e luminosidade extremas, ou seja, temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C), refrigerador ( $-5,0 \pm 2$  °C) e estufa ( $37 \pm 2$  °C) durante 90 dias. Essas formulações foram avaliadas nos dias 1, 7, 15, 30, 60 e 90 para verificar possíveis alterações nas características organolépticas (aspecto, cor e odor) e físico-químicas como pH e densidade. As amostras foram analisadas utilizando-se 50,0 g do esfoliante corporal para cada temperatura analisada.

### 2.3.3 Avaliação Microbiológica

O método de semeadura em profundidade – *pour plate* (teste de contagem microbiana) foi utilizado para a determinação do número de micro-organismos viáveis. Neste método, amostras de 10,0 gramas do creme esfoliante foram dispersas em 90,0 mL de tampão fosfato pH 7,0, obtendo a diluição 1:10. O diluente tampão fosfato pH 7,0 com 0,1% de Tween 80 foi adicionado ao meio para inativar o conservante presente na formulação. Após homogeneização da diluição 1:10, foi transferido 1,0 mL para outro frasco contendo 9,0 mL do diluente, obtendo a diluição 1:100. Após homogeneização da diluição 1:100, foi transferido 1,0 mL para outro frasco contendo 9,0 mL do diluente, obtendo a diluição 1:1000.

Alíquotas de 1,0 mL de cada diluição foram transferidas para placas de Petri, em duplicata, sobre as quais foram vertidos 20 mL dos meios específicos, liquefeitos a 45 °C. Para bactérias, foi utilizado o meio caseína-soja (TSA – *Tryptic Say Agar*) e, para fungos, o meio ágar *Sabouraud*-dextrose. As placas com ágar caseína-soja foram incubadas em estufa à temperatura de  $37 \pm 2$  °C durante 4 dias, enquanto as placas com *Sabouraud*-dextrose foram colocadas em estufa à  $25 \pm 2$  °C durante 7 dias. Após o período de incubação, foram realizadas as contagens de colônias nas placas, expresso em UFC/mL. Esta análise foi realizada no início do estudo.

## 2.4 Cromatografia a gás

### 2.4.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e a água foi purificada por deionização (sistema Milli-Q; Millipore, Bedford, MA, USA). Os solventes Metanol (MeOH) (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), e heptano (Merck, Rio de Janeiro, Brasil) foram de grau cromatográfico. A mistura padrão de metil ésteres de ácidos graxos FAME 37 foi adquirida na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

### 2.4.2 Instrumentação

As amostras foram analisadas em um cromatógrafo a gás Shimadzu GC-FID 2010 Plus equipado com auto-amostrador AOC 20i. A coluna utilizada foi a CP-SIL 88 para FAME (100 m, 0,25 mm x 0,2  $\mu$ m, Agilent Technologies, Palo Alto, USA) e o gás carreador foi o hidrogênio num fluxo de 1,0 mL/min. O volume de injeção foi de 1,0  $\mu$ L com Split 1:100, e as temperaturas do injetor e detector FID foram fixadas em 240 °C. O programa de temperatura utilizado foi: inicialmente 100 °C mantido por 5 min, então houve um aumento de 4 °C/min até 240 °C e a temperatura final foi mantida por 20 min.

### 2.4.3 Preparo da amostra

A reação de transesterificação realizada para converter ácidos graxos em

metil ésteres de ácidos graxos foi realizada conforme procedimento ISO 5509:1978, que descreve a reação de transesterificação para óleos vegetais e animais. Aproximadamente 250 mg de óleo de semente de abóbora foram adicionados a um tubo de vidro juntamente com 2.5 mL de heptano. A solução foi agitada em vortex a 10000 rpm por 1 min e então 0.5 mL de uma solução metanólica de NaOH (0.5 mol L<sup>-1</sup>) foi adicionada ao tubo. Depois de 30 s em agitação e repouso até separação de fases, a fase superior foi recolhida em outro tubo e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anídrico foi adicionado a solução para secar resíduos de água. A solução foi então filtrada e transferida a um vial para análise.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Desenvolvimento farmacotécnico

Para o desenvolvimento do creme foi feito um estudo das características das matérias primas que seriam incorporadas à formulação para obter uma emulsão estável. O Lanette N (*INCI Name: Cetearyl Alcohol / Sodium Cetearyl Sulfate*) é uma base autoemulsificante aniônica formada por um álcool graxo, considerado excelente espessante para a emulsão e, além disso, pode auxiliar na formação das micelas óleo/água, e um tensoativo, responsável pela redução da tensão interfacial entre a água e o óleo (CORRÊA, 2012).

A vaselina líquida ou óleo mineral é o emulsificante secundário, ou seja, sua função principal na formulação é aumentar a viscosidade do meio. A glicerina é o umectante, já que apresenta a capacidade de reter água da formulação, evitando assim a quebra da emulsão através do balanceamento das trocas gasosas do ar com o produto. Além disso, pode apresentar efeito umectante na pele, o que depende da umidade relativa do ar (CORRÊA, 2012).

O silicone escolhido para a formulação foi o ciclometicone, que é um fluído volátil, quando adicionado na formulação apresenta ação emoliente, não comedogênica e suave, diminuindo a sensação de untuosidade deixada pelas matérias primas oleosas, deixando um tato mais sedoso, portanto, favorece a espalhabilidade da emulsão. O EDTA é o agente quelante, pois forma complexo com os íons metálicos disponíveis na formulação e, com isso, tende a aumentar a eficácia dos conservantes antimicrobianos por remover cátions importantes para a atividade de membrana dos micro-organismos e para reações de oxidação, evitando assim problemas de estabilidade, como mudança de cor, de cheiro e de aparência (CÔRREA, 2012; AMIRALIAN, FERNANDES, 2018).

O BHT é o antioxidante da formulação, ou seja, inibe os processos oxidativos através da inativação dos radicais livres formados durante a propagação da reação, interrompendo a reação em cadeia. A solução de parabenos (metil e propilparabeno) constitui o sistema conservante antimicrobiano e apresentam amplo espectro de ação

(CÔRREA, 2012).

Foram desenvolvidas seis formulações de creme esfoliante com diferentes concentrações de óleo e semente de abóbora. E a partir da análise das características organolépticas e sensoriais foi escolhida a melhor formulação, sendo a B6 (5,0% de óleo e 10,0% de sementes), que apresentou maior poder hidratante e emoliente devido à adição do óleo da semente de abóbora e melhor ação esfoliante após a incorporação da semente. A esfoliação obtida foi suave, e não é necessário lavar a pele após a aplicação, pois as sementes não ficam aderidas no creme, sendo facilmente retiradas com o movimento das mãos.

Ó óleo de semente de abóbora, na formulação forma um filme lipídico sobre a pele, por mecanismo de oclusão, impedindo a perda de água transepidermal e apresentando um alto poder emoliente, pois a presença de umidade no interior das células córneas mantém a maciez e a elasticidade da pele. Além disso, é rico em ácidos graxos, principalmente linoléico e oléico, que fazem parte dos lipídeos intercelulares, no estrato córneo, sendo constituídas predominantemente de ceramidas, ácidos graxos livres e colesterol, que promovem a função barreira da pele (LEONARDI, 2004).

O envelhecimento e as agressões ambientais resultam numa redução da capacidade do estrato córneo em reter seu conteúdo de umidade ideal, tornando a pele seca e rugosa (RIBEIRO, 2010; LEONARDI, 2004). A pele seca e cronoenvelhecida renova as células mais lentamente, acumulando maior quantidade de escamas na superfície, por isso, a frequência pode ser duas esfoliações por semana, para conseguir reduzir a espessura do estrato córneo através da reativação da renovação celular (SOUZA, 2009). Desta forma, o creme hidratante e esfoliante formulado é indicado para peles maduras e/ou ressecadas devido às características apresentadas das materiais primas em ação conjunta com o óleo e a semente de abóbora.

## 3.2 Estudo de estabilidade

### 3.2.1 Teste de Centrifugação

Antes de iniciar o estudo preliminar de estabilidade foi realizada a centrifugação do creme, para que as partículas contidas no interior do tubo se movimentem devido ao aumento da força da gravidade, fazendo com que ocorra a antecipação de possíveis instabilidades, como a precipitação e separação de fases (BRASIL, 2004).

Foram feitas as análises do teste de centrifugação no primeiro dia e no último dia do estudo de estabilidade acelerada, além do creme que passou pelo teste de congelamento/descongelamento (**Figura 1**). No teste de centrifugação A e B, os cremes permaneceram sem separação de fases, cremeação (movimentação das partículas dispersas para cima), porém, ocorreu sedimentação das sementes para o fundo do tubo.

Esse resultado demonstrou que a emulsão formada é estável, ou seja, as matérias

primas utilizadas estavam na concentração ideal, o que evitou as possíveis instabilidades físicas como a agregação (união das partículas dispersas) e a coalescência (fusão das partículas dispersas) das gotículas de óleo, consequentemente, evitando a separação de fases.

No entanto, no teste de centrifugação C, devido ao processo de congelamento e descongelamento durante 12 dias da emulsão, esta absorveu umidade e quando passou pela centrifugação a água se separou do restante do creme, pois não foi emulsificada, como pode ser observado na **Figura 2**. Quanto aos outros aspectos do creme, não houve separação de fases e cremeação, mas também ocorreu sedimentação das sementes.

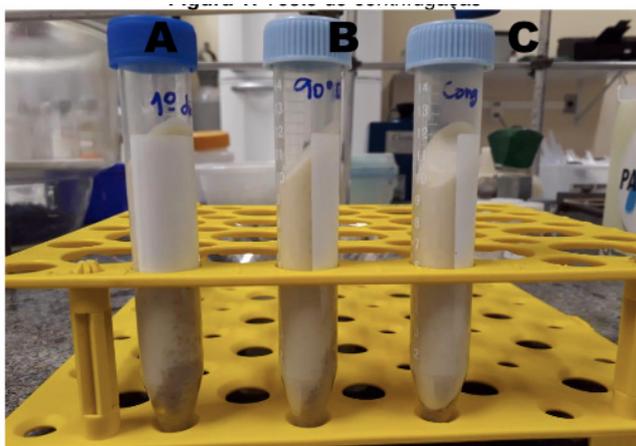


Figura 1: Teste de centrifugação

Legenda: A – 1º dia teste de estabilidade; B – 90º dia teste de estabilidade e C – Creme teste de congelamento/descongelamento. Fonte: A autora, (2018).



Figura 2: Teste de centrifugação creme após teste de congelamento/descongelamento.

Fonte: A autora, (2018).

### 3.2.2 *Estudo de estabilidade preliminar*

O ensaio de estabilidade preliminar tem como objetivo submeter o produto a temperaturas extremas, com finalidade de acelerar reações que venham a causar a instabilidade do produto (BABY et al., 2008). É um procedimento preditivo, ou seja, não representa o resultado absoluto, possui uma ótima probabilidade de fornecer dados relevantes sobre o comportamento de um produto durante o seu armazenamento e utilização (FELIPPIM, 2016).

A amostra foi submetida a 6 ciclos de 24 horas de congelamento ( $-10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e 24 horas de descongelamento ( $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), correspondendo a 12 dias de estudo. Os resultados estão dispostos na **Tabela 3**. Em relação ao pH da formulação, foi feita a medição no início (pH= 5,45) e no último dia (pH=5,42) do teste de estabilidade preliminar.

Quanto aos resultados apresentados, nos dois primeiros ciclos de mudança de temperatura não ocorreu alteração no creme, nos três parâmetros estudados que são aspecto, cor e odor, e o aspecto permaneceu sem alterações até o final do estudo, porém, no 3º e 4º ciclo, a cor e o odor sofreram leves modificações. A cor começou a ficar mais clara e o cheiro característico do óleo de semente de abóbora ficou mais fraco, permanecendo assim até o final do estudo. No 5º e 6º ciclos, ocorreu modificação da cor, passando de bege claro a quase branco.

Parâmetros	CICLOS						
	Início	1	2	3	4	5	6
Aspecto	N	SA	SA	SA	SA	SA	SA
Cor	N	SA	SA	LM	LM	M	M
Odor	N	SA	SA	LM	LM	LM	LM

Tabela 3: Resultados do estudo de estabilidade preliminar quanto aos parâmetros físico-químicos (Aspecto, Cor e Odor).

Legenda: Normal (N); Sem Alteração (SA); Levemente modificado (LM); Modificado (M). Fonte: A autora, (2019).

### 3.2.3 Estudo de Estabilidade Acelerada

Cada componente pode afetar a estabilidade de um produto. Variáveis como formulação, processo de fabricação, material de armazenamento e condições ambientais e de transporte podem influenciar na estabilidade do produto. Podem ser classificadas conforme a origem, como extrínsecas, quando modificadas por fatores externos; ou intrínsecas, quando modificadas por fatores inerentes à formulação (BRASIL, 2004).

- a. Fatores extrínsecos: tempo, temperatura, luz, oxigênio, umidade, material de acondicionamento, microorganismos e vibração;
- b. Fatores intrínsecos: incompatibilidade física, química (pH, reações de óxido-redução, hidrólise, interação entre ingredientes da formulação e entre os

ingredientes da formulação com o material de acondicionamento).

O estudo de estabilidade acelerada tem como objetivo fornecer dados para prever a estabilidade do produto, tempo de vida útil e compatibilidade da formulação com o material de acondicionamento. Durante 90 dias foram feitas as análises organolépticas para verificação dos parâmetros de aspecto, cor e odor e o parâmetro físico-químico de pH, conforme a **Tabela 4**.

A verificação do pH é importante durante o estudo, pois, sua alteração acontece devido ao tempo de estocagem, as condições inadequadas de transporte e armazenamento dos produtos (FRANÇA et. al, 2011).

RESULTADOS																			
Temperatura/ Tempo	Temperatura Ambiente (25 ± 2 °C)						Temperatura Estufa (40 ± 2 °C)						Temperatura Geladeira (5 ± 2 °C)						
	0	7	15	30	60	90	0	7	15	30	60	90	0	7	15	30	60	90	
Aspecto	N	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	
Cor	N	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	LM	LM	SA	SA	SA	SA	SA	SA	
Odor	N	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	LM	LM	SA	SA	SA	SA	SA	SA	
pH	5,45	5,45	5,44	5,44	5,43	5,42	5,45	5,45	5,43	5,43	5,42	5,42	5,45	5,45	5,44	5,44	5,43	5,43	

Tabela 4: Resultados do teste de estabilidade acelerada

Legenda: Normal (N); Sem Alteração (SA); Levemente modificado (LM); Modificado (M). Fonte: A autora, (2019).

De acordo com os resultados apresentados, o creme se manteve estável durante o tempo de análise em relação às possíveis instabilidades físicas, como a separação de fases. No entanto, a cor e o odor tiveram leves modificações na temperatura da estufa de 40 ± 2 °C, a cor ficou mais clara e o odor mais fraco, que podem ser corrigidos adicionando corante e essência na formulação. Tais dados demonstram a importância do estudo em diferentes temperaturas, pois influencia diretamente na estabilidade das diferentes formas cosméticas e dos princípios ativos incorporados.

A coloração obtida do creme é devido ao óleo que varia de marrom-avermelhado a marrom-esverdeado devido à presença de carotenóides e clorofila, a quantidade dessas substâncias altera de acordo com a espécie de abóbora, condições ambientais, grau de maturação, métodos de armazenamento e tipo de extração (KACHEL-JAKUBOWSKA et al, 2015).

O pH da formulação se manteve dentro dos padrões, entre 4,60 a 5,80, o que é importante para não alterar o “manto ácido cutâneo” que funciona como barreira protetora da pele. Tal manto apresenta capacidade tamponante, neutralizando produtos inadequados para a pele, inibe o crescimento bacteriano, restaura e mantém o ambiente ácido necessário para a flora natural da pele (LEONARDI, GASPAR, CAMPOS, 2002).

Em relação à avaliação microbiológica, os resultados foram satisfatórios, ambas as análises dos meios TCA e o *Sabourard*, estão dentro dos limites máximos para microorganismo segundo a Resolução N° 481 de 1999, que é  $5,0 \times 10^3$  UFC/mL. A amostra foi analisada no final do teste de estabilidade e os resultados são apresentados na **Tabela 5**.

MEIO	RESULTADO (UFC/mL)
TCA	$4,05 \times 10^3$
	$1,50 \times 10^3$
BSA	$2,75 \times 10^2$
	$3,00 \times 10^2$

Tabela 5: Resultados da contagem de colônias na amostra em temperatura ambiente

Fonte: A autora (2019).

### 3.3 Análise por cromatografia a gás

O estudo teve como objetivo quantificar o teor de AGs presentes no óleo de abóbora e no creme esfoliante para verificar se a concentração incorporada do óleo no creme foi suficiente para garantir a presença de todos os AGs. Além disso, pretendia-se verificar se o teor de AG se mantém estável após o teste de estabilidade, pois pode ocorrer oxidação dos AG insaturados presentes no óleo. Para isso, foram feitas as análises das amostras de óleo puro (**Figura 4**) e o creme esfoliante, com o óleo e a semente incorporados (**Figura 5**).

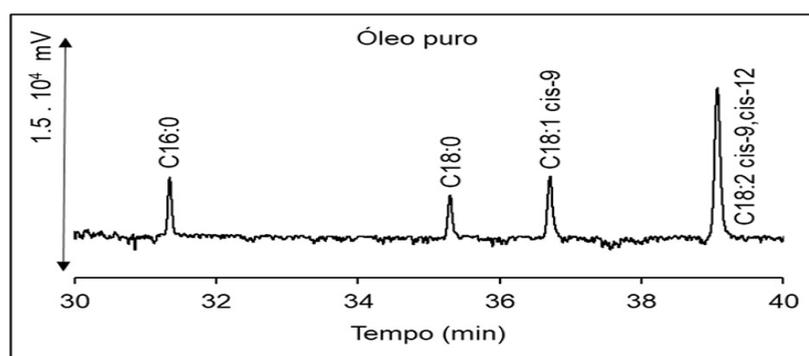


Figura 4: Cromatograma do óleo puro.

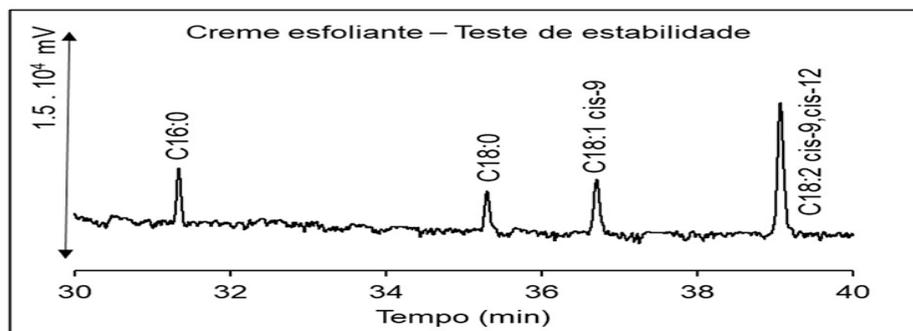


Figura 5: Cromatograma do creme esfoliante

A partir da análise dos cromatogramas, confirma-se a presença dos ácidos graxos: palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1 cis-9) e linolênico (C18:2 cis9,cis12), assim como reportado em trabalho da literatura (KIM et al, 2012). Os resultados quantitativos do estudo são mostrados na **Tabela 6**.

AMOSTRAS	C 16:0 g/100g amostra	C 18:0 g/100g amostra	C 18:1 g/100g amostra	C 18:2 g/100g amostra
Óleo puro	14,72	10,74	18,75	55,80
Creme esfoliante	16,59	10,98	21,90	50,53

Tabela 6: Resultado da quantificação das amostras por cromatografia a gás

Fonte: A autora (2019).

Como se pode observar não houve diferença de conteúdo de AG nas amostras analisadas.

#### 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos com as análises do creme hidratante e esfoliante, pode-se concluir que a formulação se manteve estável durante todo o tempo de estudo, apresentando leves modificações na cor e odor quando expostas a altas temperaturas, porém essas alterações não são significativas e podem ser corrigidas adicionando corante e essência na formulação. Esses resultados mostram a importância do planejamento farmacotécnico correto.

Além disso, o estudo microbiológico se manteve dentro do limite predisposto pela ANVISA na Resolução N°481/1999, mais uma vez comprovando a eficácia dos conservantes antimicrobianos e do agente quelante, que é considerado conservante secundário, utilizados para estabilizar a formulação.

Com os resultados da cromatografia a gás pode-se observar que o óleo de semente de abóbora foi incorporado à formulação em concentrações suficientes e que

possuem potencial para exercer os efeitos emolientes na formulação. E que esse óleo não sofreu oxidação durante o tempo de análise do teste de estabilidade (90 dias), comprovando a eficácia do conservante antioxidante.

O conceito de “consumo verde” pôde ser aplicado no desenvolvimento dessa formulação, pois as sementes obtiveram bons resultados como esfoliantes físicos e, sendo assim, podem ser utilizadas no lugar das microesferas de polietileno que são altamente poluidoras do meio ambiente. Além disso, vale lembrar que as sementes são resíduos, não aproveitados pela indústria, 18,30% do seu peso corresponde ao óleo, que é altamente rico em ácidos graxos, vitaminas, fitoesteróis e outras substâncias, que valem à pena investimento em pesquisa e desenvolvimento para maior aplicabilidade, evitando assim o desperdício.

## REFERÊNCIAS

AMIRALIAN, L.; FERNANDES, C. R. Shampoos. **Cosmetics & Toiletries (Brasil)**, v. 30, p. 30-33, jan-fev 2018.

BABY, A. R. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações cosméticas anticelulíticas contendo o extrato vegetal comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Pthychoptalum olacoides* Benth, padronizado em flavonóides totais.** (2005). 159f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos / **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 1. ed. Brasília: ANVISA, 2004. 52 p.

CAREGNATTO, B.D.; GARCIA, G. A.; FRANÇA, A. J. V. B. Du V. **Estudo comparativo entre esfoliante químico e enzimático no processo de esfoliação facial.** 2007. 33f. Projeto (Iniciação Científica). Universidade do Vale do Itajaí, Balneário Camboriú, 2007.

CORDEIRO R. E. P.; RIBEIRO L.O.; CHIMATTI W.; MENDES M.F.; PEREIRA C.S.S. Reaproveitamento do caroço da azeitona para produção de sabonete esfoliante: uma produção sustentável. **Revista Eletrônica Teccen**, n.6 (1/2), p. 5-9, 2013.

CÔRREA, M. A. **COSMETOLOGIA Ciência e Técnica.**1.ed, 2012.

FARIAS, V. C. **Desenvolvimento e estudo da estabilidade preliminar de formulações de sabonete cremoso contendo óleo e sementes de algodão (*Gossypium herbaceum* L.).** 2014. 47f. Monografia (Graduação). Centro Universitário Luterano de Palmas, Palmas.

FELIPPIM, E. C. Pó de café como alternativa ao uso de microesferas de plástico na produção de cosméticos esfoliantes. In: **16º CONGRESSO DE NACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, 2016, Guarulhos, São Paulo. Anais eletrônicos: Universidade São Francisco, 2016. Disponível em: < <http://conic-semesp.org.br/anais/files/2016/trabalho-1000023010.pdf>>. Acesso em: 21 de jan. 2019.

FRANÇA, L. A. F.; CARDOSO, J. C.; LIMA, C. M. Desenvolvimento de sabonete cremoso para controle de pH vaginal. **Caderno de Graduação – Ciências Biológicas e Saúde**. V. 13, n. 14, p. 57-56 jul./ dez. 2011.

KACHEL-JAKUBOWSKA, M.; KRASZKIEWICZ, A.; LORENCOWICZ, M. K.; PRZYWARA, A. Effects of thermal treatment of seeds on quality and oxidative stability of oils. **Agriculture and agricultural Science Procedia**, n. 7, p. 255-259, 2015.

KIM, M. Y.; KIM, E. J.; KIM, Y. N.; CHOI, C.; LEE, B. H. Comparison of the chemical compositions and nutritive values of various pumpkin (Cucurbitaceae) species and parts. **Nutrition research and practice**, 6(1), 21-7, 2012.

LEONARDI, G. R. **Cosmetologia aplicada**. São Paulo, Medfarma Livraria e Editora, 2004.

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva\*. **Anais brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 77, n. 5, p. 563-569, set./out. 2002.

MOORE, C.J. Synthetic polymers in the marine environment: A rapidly increasing, long-term threat. **Environmental Research**, v. 108, p. 131-139, 2008.

NAVES, L. P.; CORRÊA, A. D.; ABREU, C. M. P.; SANTOS, C. D. Nutrientes e propriedades funcionais em sementes de abóbora (*Cucurbita maxima*) submetidas a diferentes processamentos. **Ciência e Tecnologia**, v. 30(Supl.1), p. 185-190, 2010.

OLIVEIRA, L. M. Benefícios comprovados de óleos brasileiros. **Cosmetics & Toiletries**. v.15, n.5, p. 50-55, 2003.

RIBEIRO, C. J. **Cosmetologia aplicada a dermocosméticos**. 2. ed. Pharmabook, 2010.

SRIGLEY, C.T.; MOSSOBA, M.M. Current Analytical Techniques for Food Lipids In: **Food safety: Innovative Analytical Tools for Safety Assessment**. Wiley: Scrivener Publishing LLC, 2016.

SOUZA, V. B.; FERREIRA, J. R. N. Desenvolvimento e estudos de estabilidade de cremes e géis contendo sementes e extratos do bagaço da uva Isabel (*Vitis brusca* L.). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas**, v. 31, n. 3, p. 217-222, 2010.

SOUZA, V. M. **Ativos dermatológicos utilizados na farmácia de manipulação para médicos e farmacêuticos**. São Paulo, v. 6, 2009.

SURBER, C.; KOTTNER, J. Skin Care products: What do they promise, what do they delivery. **Journal of tissue viability**, v. 26, p. 29-36, 2017.

## ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PLANTAS DE USO POPULAR NO BRASIL: CAMOMILA (*MATRICARIA CHAMOMILLA*), ERVA DOCE (*PIMPINELLA ANISUM*) E JUCÁ (*CAESALPINIA FERREA*)

### **Caroline Mendes Santos**

Universidade do Estado do Pará  
Marabá - Pará

### **Carina Assis Lima Da Silva**

Universidade do Estado do Pará  
Marabá – Pará

### **Carolina Azevedo Amaral**

*Hospital Regional* do Sudeste do Pará Dr. Geraldo  
Veloso  
Marabá – Pará

### **Joyce dos Santos Brasil**

Universidade do Estado do Pará  
Marabá – Pará

### **Daniela Soares Leite**

Universidade do Estado do Pará - Departamento  
de Morfologia e Ciências Fisiológicas  
Marabá - Pará

**RESUMO:** O uso de plantas para fins medicinais é uma prática generalizada no país, sendo a diarreia uma das patologias tratadas pelos métodos tradicionais. No Brasil, a diarreia é a segunda principal causa de morte infantil. O objetivo deste trabalho foi verificar a atividade antimicrobiana e a Concentração Inibitória Mínima de Camomila (*Matricaria chamomilla*), capim-doce (*Pimpinella anisum*) e jucá (*Caesalpinia ferrea*) em *E. coli* e *Salmonella* spp. Este é um estudo experimental de laboratório. Os extratos utilizados foram

etanólicos com teste de extrato puro e diluições (1: 1, 1: 2, 1: 4, 1: 8, 1:10 e 1:16). Controles negativos e positivos foram realizados. A avaliação da atividade antimicrobiana ocorreu pela técnica de difusão em ágar Mueller Hinton. Após verificação das placas por 24h e 48h, não foi observada atividade antimicrobiana para nenhum dos extratos testados, em nenhuma das concentrações testadas. A atividade antimicrobiana das plantas analisadas apresenta grande divergência na literatura, com estudos mostrando atividade antimicrobiana e ausência de atividade antimicrobiana. Para realizar estudos futuros, recomenda-se modificar a metodologia utilizada, com menor temperatura de secagem e utilizar um método para verificar as porcentagens dos princípios ativos das plantas, antes e após o processo de extração.

**PALAVRAS-CHAVE:** Plantas medicinais. *Matricaria chamomilla*. *Pimpinella anisum*. *Caesalpinia ferrea*. Extratos vegetais. *E. coli*. *Salmonella*

**ABSTRACT:** The use of plants for medicinal purposes is a widespread practice in the country, with diarrhea being one of the pathologies treated by traditional methods. In Brazil, diarrhea is the second leading cause of child death. The objective of this work was to verify the antimicrobial activity and Minimum Inhibitory

Concentration of Chamomile (*Matricaria chamomilla*), sweet grass (*Pimpinella anisum*) and jucá (*Caesalpinia ferrea*) on *E. coli* and *Salmonella* spp. This is an experimental laboratory study. The extracts used were ethanolic with pure extract test and dilutions (1: 1, 1: 2, 1: 4, 1: 8, 1:10 and 1:16). Negative and positive controls were performed. The evaluation of the antimicrobial activity occurred by the diffusion technique in Mueller Hinton agar. After checking the plates for 24h and 48h, no antimicrobial activity was observed for any of the extracts tested, in any of the concentrations tested. The antimicrobial activity of the analyzed plants presents a great divergence in the literature, with studies showing both antimicrobial activity and absence of antimicrobial activity. In order to carry out future studies, it is recommended to modify the methodology used, with a lower drying temperature and to use a method to verify the percentages of the active principles of the plants, before and after the extraction process.

**KEYWORDS:** Medicinal plants. *Matricaria chamomilla*. *Pimpinella anisum*. *Caesalpinia ferrea*. Plant extracts. *E. coli*. *Salmonella*

## 1 | INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), entre 65% e 80% da população mundial utiliza as plantas medicinais populares para suprir necessidades de assistência médica na Atenção Primária (Palhares et al., 2015), uma vez que grande parcela da população não tem acesso à medicamentos ou práticas médicas, por falta de recursos e por localização distante dos centros urbanos (Veiga Junior, 2008). Essa realidade levou ao crescente estudo das plantas e utilização das mesmas para a cura e tratamento de enfermidades, contudo ainda pouco se sabe sobre a eficácia das mesmas no tratamento de doenças e suas respectivas reações adversas (Firmo et al., 2011).

O crescente interesse pelo estudo das plantas contribui para a criação de maior número de medicamentos naturais, os fitoterápicos, que são extraídos de diversas partes de vegetais, como folhas, raízes, cascas e frutos. A criação dos fitoterápicos é feita de forma técnica e monitorada, de modo a comprovar a eficácia e prevenir a intoxicação por estes compostos. Os mesmos são utilizados em forma de xarope, comprimidos, pomadas e gel (Flor et al., 2015).

Visando garantir a segurança da população, a OMS recomenda à população o uso adequado e cuidados ao utilizar plantas medicinais, atenção ao cultivo, modo correto de preparo e discernimento sobre os usos de cada planta. Informações e indicações para o uso consciente das plantas medicinais são disponibilizadas pela organização (Silva et al., 2013). Em âmbito nacional, o Sistema Único de Saúde (SUS) conta com diversas normativas e manuais que visam informar a população e atualizar os profissionais de saúde no que diz respeito ao uso de plantas medicinais (BRASIL, 2015).

O tratamento de doenças do sistema gastrointestinal inclui uma das utilizações

dos chás terapêuticos no país (Gois et al., 2016). Uma das doenças deste complexo, a diarreia, pode ser definida com a ocorrência de três ou mais evacuações amolecidas ou líquidas em um prazo de 24h. Embora qualquer indivíduo esteja susceptível a esta problemática, crianças e pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) são os principais acometidos (Logan et al., 2016; Pereira et al., 2008). De acordo com o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF), a diarreia caracteriza a terceira maior causa de morte em crianças em países subdesenvolvidos. Estas mortes são consequência direta da desidratação, quando se trata de diarreia aguda. A diarreia por tempo prolongado também pode conduzir a desnutrição.

A mortalidade por diarreia é maior em países subdesenvolvidos devido ao saneamento básico deficiente, falta de acesso à água potável e nutrição inadequada (WHO, 2009). Além disso, as doenças diarreicas também caracterizam um dos principais motivos de internação para menores de 5 anos (Bühler et al., 2014). No Brasil, a diarreia caracteriza a segunda principal causa de morte infantil (Imada et al., 2016). Apesar da mortalidade por diarreia encontrar-se em declínio, as regiões Norte e Nordeste do país, ainda apresentam números elevados, enquanto o oposto ocorre nas regiões Sul e Sudeste do país (Bühler et al., 2014).

A maior parte de diarreias em crianças está ligada ao rotavírus, fator que indica precariedade na imunização do país, uma vez que a vacina contra rotavírus integra o calendário vacinal brasileiro desde 2006 (MENEGUESSI et al., 2015). Dentre as diarreias bacterianas de maior importância clínica destacam-se aquelas geradas pelos gêneros *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter* e cepas patogênicas de *Escherichia coli* (*E. coli*) (Vorpapel et al., 2012). Além das citadas bactérias, vírus e parasitas configuram os principais agentes etiológicos para gastroenterites infantis, a exemplo do rotavírus, norovírus, adenovírus, *Giardia lamblia*, *Blastocystis hominis* e *Ascaris lumbricoides* (Sánchez-Capilla et al., 2015; Silva-Días et al., 2017).

A *E. coli* pertence à família Enterobacteriace, sendo um bacilo anaeróbio facultativo, Gram-negativo, capaz de reduzir nitrato a nitrito, fermentador de lactose e glicose e produtor de catalase. A diarreia produzida pela *E. coli* varia de acordo com a categoria a qual a bactéria pertence e os fatores de virulência associados, contudo todas as bactérias desta espécie capazes de gerar esta patologia possuem fímbrias que se aderem a parede do trato gastrointestinal ou produzem toxinas e denominam-se *E. coli* diarreicogênicas. O desenvolvimento da doença também está ligado a fatores relativos ao hospedeiro. As diarreias mais severas são geradas pela categoria *E. coli* enterotoxigênica, que produz toxina Shiga e pode gerar quadro diarreico sanguinolento, colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica. Além da diarreia, a *E. coli* também está relacionada a diversos casos de infecção urinária, meningite e outras infecções extra-intestinais (Trabulsi & Alterthum, 2005; Souza et al., 2016). A *E. coli* enteropatogênica é descrita como a principal causa de diarreia em crianças menores de cinco anos (Souza et al., 2016).

O gênero *Salmonella* compõe-se por bactérias Gram negativas, em formato de

bastonete e não esporuladas. Embora diversas bactérias da família *Enterobacteriaceae* possuam as mesmas características bioquímicas, as componentes do gênero *Salmonella* não fermentam lactose, a exceção daquelas que possuem plasmídeos de resistência para fermentação de lactose. A diarreia bacteriana por *Salmonella* spp. costuma ser aquosa, o que se relaciona ao local de preferência para colonização, o intestino grosso. Além da gastroenterite, a *Salmonella* spp. pode gerar febre tifoide, uma infecção generalizada. Para o diagnóstico da infecção por *Salmonella* spp., deve-se realizar cultura de excretas e fluidos corporais, para posterior isolamento e identificação (Trabulsi & Alterthum, 2005; Riveros & Ochoa, 2015). Em trabalhos de cunho epidemiológico, a *Salmonella enteritidis* costuma ser a espécie do gênero *Salmonella* mais identificada em amostras diarreicas (Sánchez-Capilla et al., 2015; Silva-Días et al., 2017).

O tratamento de diarreias envolve a utilização de Terapia de Reposição Oral e de administração de zinco, acrescida, por vezes, do uso de antimicrobianos (WHO, 2009), contudo, o uso de plantas medicinais para este fim também ocorre (Gois et al., 2016). A partir do uso medicinal atribuído a cada planta por determinado grupo populacional (abordagem etnofarmacológica) verificou-se que a camomila (*Matricaria chamomilla*), a erva doce (*Pimpinella anisum*) e o jucá (*Caesalpinia ferrea*) são plantas amplamente utilizadas para o tratamento da diarreia (Leite et al., 2015; Maciel et al., 2002; Pinto, 2008; Sousa et al., 2016).

O chá da flor de *Matricaria chamomilla* é descrito pela medicina popular como calmante, utilizado para o tratamento de cólicas, vômitos, flatulência, menstruação dolorosa, infecção urinária e problemas intestinais (Carvalho et al., 2014).

O infuso de sementes de *Pimpinella anisum* costuma ser relacionado ao tratamento de problemas digestivos e ginecológicos, cólicas, gases, insônia e como calmante. As propriedades farmacológicas descritas desta planta apontam para efeitos antifúngicos, inseticidas e estrogênicos (Sousa et al., 2016; Pinto, 2008). O fruto do jucá (*Caesalpinia ferrea*) possui reconhecida atividade contra microrganismos Gram positivos, o que faz com que a planta seja utilizada para tratamento de infecções orais (Sampaio et al., 2009). Outros usos tradicionais das vagens do jucá são o tratamento de infecções intestinais, diarreia, doenças renais e diabetes, além de também ser descrito como agente anti-inflamatório e cicatrizante (Gonçalves & Pasa, 2015; Leite et al., 2015). Os compostos ativos possivelmente envolvidos nos benefícios gerados por tais plantas permanecem pouco descritos na literatura (Maciel et al., 2002).

A vulnerabilidade socioeconômica de algumas populações, o saneamento básico inadequado e o acesso ao Sistema de Saúde são fatores determinantes para as mortes por diarreia, bem como o pouco ou nenhum contato que certas populações possuem com a Medicina Moderna, a exemplo de alguns grupos indígenas e quilombolas (Passos et al., 2016). Má alimentação na infância, desmame precoce e fatores culturais também possuem impacto (Pereira et al., 2008), além do comprometimento do sistema imunológico por alguma outra doença (Passos et al., 2016).

Deste modo, faz-se importante a elucidação de um método simples e acessível para prevenir e tratar casos de diarreia bacteriana geradas por *E. coli* ou *Salmonella* spp., sobretudo em crianças, um dos grupos mais acometidos por esta situação. Ademais, estudos que verificam a eficácia de extratos vegetais possibilitam a verificação de novas substâncias bactericidas ou bacteriostáticas para a confecção de novos antibióticos e aumentam a literatura corrente sobre fitoterápicos, fator que contribui para a segurança no uso de práticas tradicionais para a cura de doenças.

The objective of this work was to verify the antimicrobial activity of plants of traditional medicine: chamomile (*Matricaria chamomilla*), sweet grass (*Pimpinella anisum*) and jucá (*Caesalpinia ferrea*) on *E. coli* and *Salmonella* spp.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo experimental laboratorial, no qual foi avaliada a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos, glicólicos e hidroalcoólico sobre *E. coli* e *Salmonella* spp., através da técnica de difusão em ágar. Os extratos vegetais de camomila (*Matricaria chamomilla*) e erva-doce (*Pimpinella anisum*) foram adquiridos em farmácia de manipulação, em frasco de 20 mL, sendo obtidos por meio de extração glicólica, que utiliza como solvente o propilenoglicol. A tintura de jucá (*Caesalpinia ferrea*) foi obtida em farmácia de manipulação, em frasco de 100 mL, com extração hidroalcoólica.

Uma vez que todos os extratos foram obtidos, foram feitas diluições com água destilada estéril de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 e 1:10 e 1:16 (Figura 1). As diluições foram feitas utilizando pipeta de volume fixo. Foram utilizados sete discos de papel filtro para cada um dos extratos, com diâmetro de 10mm. Cada disco foi embebido com 20µL de uma diluição do respectivo extrato, de modo que fosse possível verificar a Concentração Inibitória Mínima.

As cepas padrão de *Escherichia coli* (LB 25922) utilizadas no estudo foram obtidas junto ao setor de Microbiologia do Hospital Público do Sudeste Doutor Geraldo Veloso. A linhagem de *Salmonella* spp. foi obtida junto ao setor de Microbiologia do Laboratório Biotest, com identificação confirmada pelo aparelho Vitek 2, que realiza identificação por meio da leitura das reações colorimétricas ocorridas em 64 poços, onde a mudança de cor no poço indica reação no meio presente. A leitura do Vitek 2 baseia-se em um sistema de transmitância óptica (BIOMÉRIEUX, 2017). O semeio e a incubação das colônias bacterianas foram realizados no Laboratório Biotest.

O controle negativo, que tem como finalidade verificar a viabilidade do crescimento bacteriano, foi realizado com inoculação da *E. coli* e da *Salmonella* spp. em placas separadas de meios de cultura comercial ágar MacConkey, meio seletivo para bactérias Gram negativas (presença do cristal violeta inibe o crescimento de microrganismos gram-positivos). O semeio bacteriano foi feito conforme as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2013). A preparação das bactérias

para a inoculação foi feita em solução salina a 0,9% e o semeio foi realizado com uso de alça bacteriológica de 10 µL. A semeadura foi feita por método de esgotamento. Após o semeio, o controle negativo foi inoculado em estufa bacteriológica por 24h a 36°C.

O controle positivo consistiu na semeadura de *E. coli* e *Salmonella* spp. em meios comerciais ágar Mueller Hinton, em placas de Petri separadas. A suspensão bacteriana foi preparada a partir da cepa padrão, em solução salina a 0,9%, em tubo de ensaio, até atingir turbidez média de 0,5 na escala de McFarland, o que corresponde a  $1,5 \cdot 10^8$  Unidades Formadoras de Colônia por mL. A turbidez foi verificada com o DensiCHECK Plus. Antes da inoculação em placa, comprimiu-se a alça contra a parede do tubo, para eliminar o excesso de microrganismos. O método de semeadura utilizado foi o de estriamento por toda a placa. Após a semeadura, foram acrescentados discos de antibióticos utilizados para o antibiograma de enterobactérias, sendo estes: tazobactam, amicacina, imipenem, ampicilina, ceftriaxona, ceftazidina, aztreonam, cefalotina, gentamicina e clorafenicol.

A sensibilidade dos extratos vegetais foi testada por meio da metodologia de disco-difusão. Foram utilizadas três placas de Petri contendo meio ágar Mueller Hinton para cada extrato em relação a cada bactéria. O método de semeadura utilizado foi análogo ao utilizado no controle positivo. Em cada trio de placas, avaliou-se a atividade antimicrobiana de um extrato diferente (*Matricaria chamomilla*, *Pimpinella anisum* e *Caesalpinia ferrea*), com sete discos de papel filtro por placa, cada qual com uma diluição (puro, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:10 e 1:16). A avaliação da atividade antimicrobiana foi feita por meio da medição do halo formado em torno do disco, utilizando halômetro, 24h e 48h após a incubação em estufa bacteriológica a 36°C. Foram consideradas plantas com atividade antimicrobiana as com halo igual ou maior do que 8mm, de acordo com a metodologia de Ribeiro et al. (2009). Todos os testes foram realizados em triplicata.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### ***Matricaria chamomilla* sobre *E. coli* e *Salmonella* spp.**

Após o extrato glicólico de camomila (*Matricaria chamomilla*) ser diluído em água destilada, em concentrações de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:10 e 1:16, não foi verificada a formação de halo de inibição em *E. coli* nem em *Salmonella* spp, em leituras de 24h e 48h (Figuras 1 e 2).

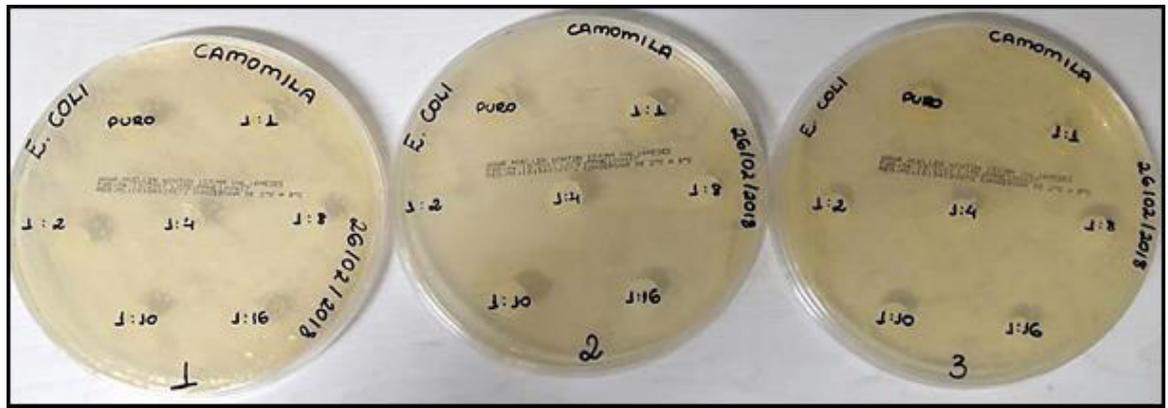


Figura 1. Extrato glicólico de *Matricaria chamomilla* em cultura de *E. coli*, leitura em triplicata.

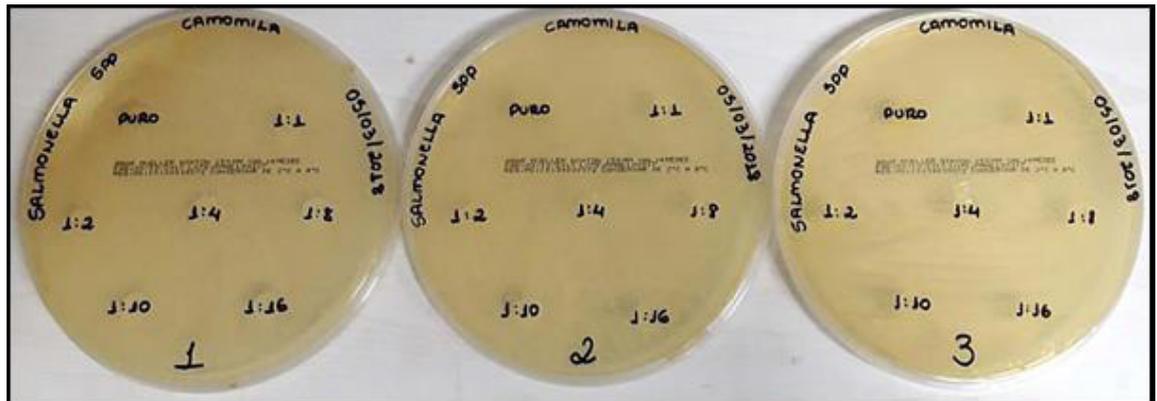


Figura 2. Extrato glicólico de *Matricaria chamomilla* em cultura de *Salmonella* spp., leitura em triplicata.

O extrato glicólico de *Matricaria chamomilla* (camomila) não demonstrou atividade antimicrobiana frente as bactérias *Escherichia coli* e *Salmonella* spp, ambas Gram negativas e amplamente identificadas em amostras diarreicas (Adam et al., 2018). A ausência de atividade contra bactérias Gram negativas também foi verificada nos estudos de Stanojevic et al. (2016) e Carvalho et al. (2014), onde o óleo e o extrato etanólico das flores de *Matricaria chamomilla* não demonstraram atividade contra *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* e *Salmonella enterica*. No estudo de Mekonnen et al. (2016) o extrato de camomila não demonstrou efeito inibitório sobre *Salmonella typhi*, *E. coli*, outras cepas de bactérias Gram positivas e negativas e contra fungos. Contudo, em estudo realizado em 2014, Munir et al. verificaram atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *Staphylococcus aureus* em todas as concentrações testadas dos extratos etanólico e metanólico da *Matricaria chamomilla*.

### ***Pimpinella anisum* sobre e. coli E Salmonella spp.**

Após o extrato glicólico de erva-doce (*Pimpinella anisum*) ser diluído em água destilada, em concentrações de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:10 e 1:16, não foi verificada a formação de halo de inibição em *E. coli* nem em *Salmonella* spp. em leituras de 24h e 48h (Figuras 3 e 4).



Figura 3. Extrato glicólico de *Pimpinella anisum* em cultura de *E. coli*, leitura em triplicata.



Figura 4. Extrato etanólico de *Pimpinella anisum* em cultura de *Salmonella* spp., leitura em triplicata

A partir da metodologia de disco-difusão em placa, o extrato glicólico das sementes de *Pimpinella anisum* (erva doce) não demonstrou atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *Salmonella* spp. Resultados semelhantes foram encontrados por Mohamed et al. (2015), onde o extrato aquoso de *Pimpinella anisum* não inibiu o crescimento de bactérias Gram positivas e negativas, dentre elas *E. coli*. No estudo de Evrendilek (2015), conduzido com a testagem dos efeitos antimicrobianos dos óleos essenciais de diversas plantas, foi verificado resultado oposto, com atividade contra bactéria Gram positivas e negativas, incluindo-se *E. coli* e *Salmonella Typhimurium*.

A ocorrência de resultados negativos pode ter relação com os métodos de extração utilizados. Em trabalho semelhante a este, Pereira et al. (2009) verificaram que o extrato glicólico de *Pimpinella anisum* foi eficaz contra diversas bactérias Gram negativas, incluindo *E. coli* – a divergência de resultados entre Pereira et al. (2009) e o presente trabalho provavelmente encontra-se na concentração do extrato utilizado, uma vez que o extrato que obteve ação antimicrobiana foi preparado com 75% de massa vegetal seca para 25% de solvente propilenoglicol, enquanto não existem informações sobre a diluição do extrato comercial.

### ***Caesalpinia férrea* sobre *e. coli* E *Salmonella* spp.**

Após a tintura de jucá (*Caesalpinia férrea*) ser diluída em água destilada, em concentrações de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:10 e 1:16, não foi verificada a formação de halo

de inibição em *E. coli* nem em *Salmonella* spp. . em leituras de 24h e 48h (Figuras 5 e 6).



Figura 5. Extrato hidroalcoólico de *Caesalpinia férrea* em cultura de *E. coli*, leitura em triplicata.



Figura 6. Extrato hidroalcoólico de *Caesalpinia férrea* em cultura de *Salmonella* spp., leitura em triplicata

A tintura (extrato hidroalcoólico) de *Caesalpinia ferrea* (jucá) também não demonstrou efeito antimicrobiano sobre as bactérias de interesse. O mesmo ocorreu em estudos com extrato hidroalcoólico e glicólico da planta, onde a mesma não inibiu o crescimento de *E. coli* e mostrou-se eficaz apenas contra o *Staphylococcus aureus* (Lacerda, 2011; Magalhães et al., 2015). Em oposição aos resultados obtidos no presente trabalho, Araújo et al. (2014) verificaram que a *Caesalpinia ferrea* inibiu o crescimento de bactérias Gram positivas e negativas, a exemplo de *E. coli*, *Salmonella enteritidis* e *Shigella flexneri*. Estudos acerca da atividade antimicrobiana do jucá são pouco numerosos na literatura, embora existam diversos trabalhos que discutem outras propriedades da planta, como potencial mutagênico, cicatrizante, antioxidante e anti-diabético, com controle da hiperglicemia (Batista et al., 2017; Cunha et al., 2017; Sousa, 2017).

Em comparação de diferentes métodos de extração, Uyub et al. (2010) verificaram que a inibição do crescimento de um mesmo microrganismo ocorria com alguns métodos de extração e outros não, sendo que o solvente com maior número de halos formados foi o metanol e o menor, o petróleo éter, embora este último tenha demonstrado maior capacidade para inibição para a bactéria de interesse do estudo, a *Helicobacter pylori*.

Em estudo com análise por injeção de fluxo, Souza Neto et al. (2010) verificaram que os métodos de extração que melhor conservaram metabólitos com propriedades antimicrobianas utilizaram os solventes acetato de etila, diclorometano, metanol ou hexano. Os métodos de extração também são apontados como importante fator para a ocorrência de atividade antimicrobiana por Sanches et al. (2005) e Mohamed et al. (2015).

Outra explicação para a não ocorrência de atividade antimicrobiana dos extratos testados pode encontrar-se em variações inerentes as próprias plantas. Carvalho Filho et al. (2006) e Vigo et al. (2004) verificaram que o tempo, a época da colheita e o método de secagem provocam variações na composição bioquímica dos vegetais, com maior preservação dos princípios ativos em colheitas realizadas pela manhã, no inverno e com secagem ao sol ou entre 40°C. As condições de clima, solo, exposição ao sol e a chuva e idade variam as concentrações dos componentes químicos dos vegetais, o que também pode ser correlacionado ao grande número de dados divergentes na literatura a respeito da atividade de plantas contra agentes microbianos (Andrade, 2016).

Para realização de estudos futuros, recomenda-se modificações da metodologia utilizada, com menor temperatura de secagem e utilização de método que permita a verificação das porcentagens dos princípios ativos das plantas, antes e após o processo de extração.

## AGRADECIMENTOS

Ao setor de Microbiologia do Hospital Público do Sudeste Doutor Geraldo Veloso e ao Laboratório BIOTEST, ambos no município de Marabá/PA, pelo apoio logístico prestado ao longo desse trabalho.

## REFERÊNCIAS

Adam MA, Wang J, Enam K, Shen H, Wang H, El Hussein AR, Musa AB, Khidir IM, Ma X (2018). Molecular Survey of Viral and Bacterial Causes of Childhood Diarrhea in Khartoum State, Sudan. *Frontiers in Microbiology* 28:257- 263. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.00112>

Andrade SFV (2016). **Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da casca de *Schinus terebinthifolius* Raddi. através de análise comparativa entre os métodos de difusão em disco e de cavidade em placa.** 23 p. Monografia (Conclusão de Curso de Ciências Biológicas). Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande.

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2013). **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 5 :Tecnologias em Serviços de Saúde: descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos/**Agência Nacional de Vigilância Sanitária.– Brasília: Anvisa.

Araújo AA, Soares LA, Assunção-Ferreira MR, Souza-Neto MA, Silva GR, Araújo RF Jr, Guerra GC, Melo MC (2014). Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone–water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia*

rigida and Psidium guajava. **Journal of Ethnopharmacology** 156:88-96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.07.031>

Batista EKF, Trindade HI, Farias IS, Martins FMM, Silva Filho OF, Batista MCF (2017) Avaliação da atividade cicatrizante de preparados à base de jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart.). **Archives of Veterinary Science** 22(3):30-39. <http://dx.doi.org/10.5380/avs.v22i3.50360>

BRASIL (2015). Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS: atitude de ampliação de acesso**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde.

Bühler HF, Ignotti E, Neves SMAS, Hacon SS (2014). Análise espacial de indicadores integrados de saúde e ambiente para morbimortalidade por diarreia infantil no Brasil, 2010. **Cadernos de Saúde Pública** 30(9):1921-1934. <http://dx.doi.org/10.1590/0102-311X00078013>

Carvalho AF, Silva DM, Silva TRC (2014). Avaliação da atividade antibacteriana de extratos etanólico e de ciclohexano a partir das flores de camomila (*Matricaria chamomilla* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** 16(3):521-526. [http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/12\\_159](http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/12_159)

Carvalho Filho JL S, Blank AF, Alves PB, Ehlert, PAD, Melo AS, Cavalcanti SCH, Arrigoni-Blank MF, Silva-Mann R (2006). Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 16(1):24-30. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2006000100007>

Cunha AP, Ribeiro ACB, Ricardo NMPS, Oliveira AC, Dávila LSP, Cardoso JHL, Rodrigues DC, Azeredo HMC, Silva LMA, Brito ES, Mendes Filho J, Rocha TM, Leal LKAM, Ricardo NMPS (2017). Polysaccharides from *Caesalpinia ferrea* seeds – Chemical characterization and anti-diabetic effects in Wistar rats. **Food Hydrocolloids** 65:68-76. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.039>

Evrendilek GA (2015). Empirical prediction and validation of antibacterial inhibitory effects of various plant essential oils on common pathogenic bacteria. **International Journal of Food Microbiology** 202:35-41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.030>

Firmo WCA, Menezes VJM, Passos CEC, Dias CN, Alves LPL, Dias ICL, Neto MS, Olea RSG (2011). Contexto Histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa** 18:90-95.

Flor ASSO, Barbosa WLR (2015). Sabedoria popular no uso de plantas medicinais pelos moradores do bairro do sossego no distrito de Marudá – PA. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** 17(4): 757-768. [http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/14\\_064](http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/14_064)

Gois MAF, Lucas FCA, Costa JCM, Moura PHB, Lobato GJM (2016). Etnobotânica de espécies vegetais medicinais no tratamento de transtornos do sistema gastrointestinal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** 18(2):547-557. [http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/15\\_170](http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/15_170)

Gonçalves KG, Pasa MC (2015). A etnobotânica e as plantas medicinais na Comunidade Sucuri, Cuiabá, MT, Brasil. **Interações** 16(2):245-256. <http://dx.doi.org/10.1590/1518-70122015201>

Imada KS, Araújo TS, Muniz PT, Pádua VL (2016). Fatores socioeconômicos, higiênicos e de saneamento na redução de diarreia na Amazônia. **Revista de Saúde Pública** 50:1-11. <http://dx.doi.org/10.1590/S1518-8787.2016050006505>

Lacerda SLR (2011). **Estudo microbiológico da ação de extratos vegetais hidroalcoólicos sobre microrganismos bucais**. 37 p. Monografia (Conclusão de Curso de Odontologia). Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande.

Leite IA, Morais AM, Silva do Ó KD, Carneiro RG, leite CA (2015). A etnobotânica de plantas

medicinais no município de São José de Espinharas, Paraíba, Brasil. **Biodiversidade** 14(1):22-30.

Logan C, Beadsworth MBJ, BEECHING NJ (2016). HIV and diarrhea: what is new? **Current Opinion in Infection Disease** 29(5):486-494. <http://dx.doi.org/10.1097/QCO.0000000000000305>

Maciel MAM, Pinto AC, Veiga VF (2002). Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova** 25(3):429-438. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422002000300016>

Magalhães LS, Pussente CG, Azevedo LR, Crespo JMRS (2015). Avaliação da atividade antibacteriana do extrato de *Caesalpinia ferrea* Martius e desenvolvimento de uma formulação fitocosmética. **Revista Científica da Faminas** 11(1):27-43.

Mekonnen A, Yitayew B, Tesema A, Taddese S (2016). In Vitro Antimicrobial activity of essential oil of *Thymus schimperii*, *Matricaria chamomilla*, *Eucalyptus globulus*, and *Rosmarinus officinalis*. **International Journal of Microbiology** 2016: 8pages. <https://doi.org/10.1155/2016/9545693>

Meneguessi GM, Mossri RM, Segatto TCV, Reis PO (2015). Morbimortalidade por doenças diarreicas agudas em crianças menores de 10 anos no Distrito Federal, Brasil, 2003 a 2012. **Epidemiologia e Serviços de Saúde** 24(3):721-730. <http://dx.doi.org/10.5123/S1679-49742015000400014>

Mohamed HSAA, Abdelgadir WS, Almagboul AZI (2015). In vitro antimicrobial activity of Anise seed (*Pimpinella anisum* L.). **International Journal of Advanced Research** 3(1):359-367.

Munir N, Iqbal AS, Altaf I, Bashir R, Sharif N, Saleem F, Naz F (2014). Evaluation of antioxidant and antimicrobial potential of two endangered plant species *Atropa Belladonna* and *Matricaria Chamomilla*. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines** 11(5):111-117. PMID: PMC4202527

Palhares RM, Drummond MG, Brasil BSAF, Consenza GP, Brandão MGL, Oliveira G (2015). Medicinal plants recommended by the World Health Organization: DNA barcode identification associated with chemical analyses guarantees their quality. **Plos One** 10(5): 1-29.e0127866. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127866>

Passos PHS, Cunha VN (2016). Análise das condições sociais de saúde de indígenas da Amazônia Brasileira. **Revista Contribuciones a las Ciencias Sociales** 1:1-17.

Pereira IV, Cabral IE (2008). Diarreia aguda em crianças menores de um ano: subsídios para o delineamento do cuidar. **Escola Anna Nery Revista de Enfermagem** 12(2):224-229. <http://dx.doi.org/10.1590/S1414-81452008000200004>

Pereira CA, Vilela PGF, Oliveira LD, Jorge AOC (2009). Ação antimicrobiana in vitro de extratos glicólicos de *Psidium guajava* L., *Syzygium cumini* L. e *Pimpinella anisum* L. **Revista do Instituto Adolfo Lutz** 68(1):102-108.

Pinto LN (2008). **Plantas medicinais utilizadas em comunidades do município de Igarapé-Miri, Pará: etnofarmácia do município de Igarapé-Miri – Pará**. 112 f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos). Universidade Federal do Pará. Belém.

Ribeiro CM, Souza KGS, Ribeiro TAC, Vieira ABR, Mendonça LCV, Barbosa WLR, Vieira JMS (2009). Avaliação da atividade antimicrobiana de plantas utilizadas na medicina popular da Amazônia. **Infarma** 21(1/2):45-49.

Riveros M, Ochoa TJ (2015). Enteropatógenos de importancia en Salud Pública. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública** 32(1):157-164.

Sampaio FC, Pereira MSV, Dias CS, Costa VCO, Conde NCO, Buzalaf MAR (2009) In vitro

antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. **Journal of Ethnopharmacology** 24(2):289-294. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.04.034>

Sanches NR, Cortez DAG, Schiavini MS, Nakamura CV, Dias Filho BP (2005) An evaluation of antibacterial activities of *Psidium guajava* (L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology** 48(3):429-436. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132005000300014>

Sánchez-Capilla AD, Sorlózano-Puerto A, Rodríguez-Granger, J, Martínez-Brocal A, Navarro-Marí JM, Gutiérrez-Fernández J (2015). Infectious Etiology Of Diarrheas Studied In A Third-Level Hospital During A Five-Year Period. **Revista Española De Enfermedades Digestivas** 107(2):89-97. <http://dx.doi.org/1130-0108/2015/107/2/89-97>

Silva-Días H, Bustamante-Canelo O, Aguilar-Gamboa FR, Mera-Villasis K, Ipanaque-Chozo J, Seclen-Bernabe E, Vergara-Espinoza M (2017). Enteropatógenos predominantes en diarreas agudas y variables asociadas en niños atendidos en el Hospital Regional Lambayeque, Perú. **Horizonte Medico** 17(1):38-44.

Silva FG, Oliveira GL (2013). Conhecimento popular e atividade antimicrobiana de *Cydonia oblonga* Miller (Rosaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** 15: 98-103. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722013000100014>

Sousa YN, Silva MD, Dantas KF, Diniz VB (2016). Análise elementar de cinco plantas medicinais comercializadas no mercado do Ver-o-Peso em Belém Pará, Brasil. **Scientia Plena** 12(6):1-9. <https://doi.org/10.14808/sci.plena.2016.069914>

Sousa MJB (2017). **Avaliação do Potencial Genotóxico e Mutagênico de Extratos Padronizados de *Caesalpinia ferrea* (jucá) e *Brosimum gaudichaudii* (inharé)**. 91 p. Dissertação (Mestrado em Genética). Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Goiânia.

Souza Neto ID, Manfrin MG, Costa MB (2010). Estudo da atividade antimicrobiana da *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae) em sistemas de injeção em fluxo. In: Seminário De Iniciação Científica, 8, 2010, Anápolis. **Anais do VIII SIC**. Anápolis: UEG.

Stanojevic LP, Marjanovic-Balaban ZR, Kalaba VD, Stanojevic JS, Cvetkovic DJ (2016). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of chamomile flowers essential oil (*Matricaria chamomilla* L.). **Journal of Essential Oil Bearing Plants** 20(6):2017-2028. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2016.1224689>

Trabulsi LR, Alterthum F. **Microbiologia**. 4 ed. 718 p. São Paulo: Atheneu, 2005.

Uyub AM, Nwachukwu IN, Azlan AA, Fariza S S (2010). In-vitro antibacterial activity and cytotoxicity of selected medicinal plant extracts from Penang Island Malaysia on metronidazole-resistant *Helicobacter pylori* and some pathogenic bacteria. **Ethnobotany Research & Applications** 8:95-106. <http://hdl.handle.net/10125/21002>

Veiga Júnior VF (2008). Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 18(2):308-313. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000200027>

Vigo CLS, Narita E, Marques LC (2004). Influências da variação sazonal e tipos de secagem nas características da droga vegetal – raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia** 14(2):137-144. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2004000200007>

Vorpagel AS, Miranda EH, Colacite J, Tiunan TS (2012). Frequência e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de bactérias isoladas de diferentes amostras clínicas em laboratório privado de Marechal Cândido Rondon, PR. **Revista Thêma et Scientia** 2(2):111-119.

World Health Organization (WHO) (2009). The United Nations Children's Fund (UNICEF). **Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done.**

## ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PLANTAS DE USO POPULAR NO BRASIL: GOIABA (*PSIDIUM GUAJAVA* L.) E MELÃO DE SÃO CAETANO (*MOMORDICA CHARANTIA*)

### Daniela Soares Leite

Universidade do Estado do Pará - Departamento de Morfologia e Ciências Fisiológicas  
Marabá - Pará

### Caroline Mendes Santos

Universidade do Estado do Pará  
Marabá - Pará

### Carina Assis Lima Da Silva

Universidade do Estado do Pará  
Marabá - Pará

### Carolina Azevedo Amaral

Hospital Regional do Sudeste do Pará Dr. Geraldo Veloso  
Marabá - Pará

**RESUMO:** O uso de plantas para fins medicinais constitui uma prática difundida na Amazônia, sendo a diarreia uma das patologias tratadas pelos métodos tradicionais. No Brasil, a diarreia é a segunda causa principal de morte infantil. O objetivo deste trabalho foi verificar a atividade antimicrobiana e a Concentração Inibitória Mínima de goiabas (*Psidium guajava* L.) e melão de São Caetano (*Momordica charantia*) sobre *E. coli* e *Salmonella* spp. Este é um estudo laboratorial experimental. Foi utilizado o extrato etanólico (goiaba e melão de São Caetano) com extrato puro e diluição (1: 1, 1: 2, 1: 4, 1: 8, 1: 10 e 1:16). Controles negativos e positivos foram realizados. A avaliação da

atividade antimicrobiana ocorreu pela técnica de difusão em ágar Mueller Hinton. Nenhuma atividade antimicrobiana foi observada para nenhum dos extratos testados. Em trabalhos futuros, recomenda-se que outras abordagens metodológicas sejam empregadas, com métodos adequados de preparação e secagem de extratos vegetais.

**PALAVRAS-CHAVE:** Plantas medicinais. Extratos vegetais. *E. coli*. *Salmonella*.

**ABSTRACT:** The use of plants for medicinal purposes constitutes a widespread practice in the Amazon Region, with diarrhea being one of the pathologies treated by traditional methods. In Brazil, diarrhea is the second master cause of infant death. The objective of this work was to verify the antimicrobial activity and the Minimum Inhibitory Concentration of guava (*Psidium guajava* L.) and bitter melon (*Momordica charantia*) on *E. coli* and *Salmonella* spp. This is an experimental laboratorial study. The extracts used were ethanolic (guava and bitter melon) with pure extract test and dilutions (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:10 e 1:16). Negative and positive controls were performed. The evaluation of the antimicrobial activity occurred by the diffusion technique in Mueller Hinton agar. No antimicrobial activity was observed for any of the extracts tested. In future works, it is recommended that other methodological approaches be employed, with

adequate preparation and drying methods of plant extracts.

**KEYWORDS:** Medicinal plants. Plant extracts. *E. coli*. *Salmonella*.

## 1 | INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, as plantas são usadas pela humanidade como remédio para curar várias doenças (Kovalski et al., 2013). O uso na forma de chás, tinturas ou in natura caracteriza a prática milenar, é transmitida oralmente de geração em geração. Às vezes, esses ensinamentos oferecem oportunidades para a indústria farmacêutica, que tira das plantas a base de vários compostos. Estima-se que aproximadamente 25% das drogas utilizadas na prática clínica sejam baseadas em produtos vegetais (Bruning et al., 2012; Sá Júnior et al., 2016; Palhares et al., 2015). O Brasil possui uma grande variedade de espécies com propriedades medicinais. Nos centros urbanos, a venda de ervas ocorre em mercados e mercados livres, além do plantio caseiro, o que caracteriza aspectos culturais importantes de algumas regiões do país (Maciel et al., 2002; Ribeiro et al., 2009).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), entre 65% e 80% da população mundial utiliza as plantas medicinais populares para suprir necessidades de saúde na Atenção Básica (Palhares et al., 2015), pois uma grande população não tem acesso a medicamentos ou práticas médicas, por falta de recursos e localização distante dos centros urbanos (Veiga Junior, 2008). Esse fato levou ao crescente estudo de plantas e seu uso para o tratamento e cura de doenças, mas muito ainda se precisa conhecer sobre sua eficácia no tratamento de doenças e suas respectivas reações adversas (Firmo et al., 2011).

A fim de garantir a segurança da população, a OMS recomenda que a população use com parcimônia as plantas medicinais, tendo atenção ao cultivo, à forma correta de preparo e discernimento sobre os usos de cada planta. Informações e indicações para o uso consciente de plantas medicinais são fornecidas pela OMS (Silva et al., 2013). No âmbito nacional, o Sistema Único de Saúde (SUS) possui diversos regulamentos e manuais que visam informar a população e atualizar os profissionais de saúde sobre o uso de plantas medicinais (Brasil, 2015).

O tratamento de doenças do sistema gastrointestinal inclui, também, usos dos chás terapêuticos (Gois et al., 2016). Uma das doenças desse complexo, a diarreia, que pode ser definida com a ocorrência de três ou mais evacuações suaves ou líquidas em até 24 horas. Embora qualquer indivíduo seja suscetível a esse problema, crianças e pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) são os principais pacientes acometidos (Logan et al., 2016; Pereira et al., 2008). Segundo o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF), a diarreia é a terceira principal causa de morte em crianças. Essas mortes são uma consequência direta da desidratação quando se trata de diarreia aguda. A diarreia prolongada também pode levar à desnutrição. A mortalidade por diarreia é maior nos países em desenvolvimento devido à falta de

saneamento, falta de acesso a água potável e nutrição inadequada (Who, 2009). Além disso, as doenças diarreicas também caracterizam uma das principais razões para a hospitalização de crianças menores de cinco anos (Bühler et al., 2014).

No Brasil, a diarreia é a segunda causa de morte infantil (Imada et al., 2016). Apesar da mortalidade por diarreia encontrar-se em declínio, as regiões Norte e Nordeste do país, ainda apresentam números elevados, enquanto o oposto ocorre nas regiões Sul e Sudeste do país (Buhler et al., 2014).

A maioria das diarreias em crianças está associada ao rotavírus, fator que indica imunização precária no país, uma vez que a vacina contra o rotavírus faz parte do calendário vacinal brasileiro desde 2006 (Meneguessi et al., 2015). Entre as diarreias bacterianas clínicas mais importantes estão aquelas causadas pelos gêneros *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter* e cepas patogênicas de *Escherichia coli* (E. coli) (Vorpapel et al., 2012). Além das bactérias, os vírus e parasitas acima citados constituem os principais agentes etiológicos da gastroenterite infantil, como o rotavírus, norovírus, adenovírus, *Giardia lamblia*, *Blastocystis hominis* e *Ascaris lumbricoides* (Sánchez-Capilla et al., 2015; Silva-Días et al., 2017).

O tratamento da diarreia envolve o uso de terapia de reposição oral e administração de zinco, às vezes com o uso de antimicrobianos (Who, 2009), entretanto, também ocorre o uso de plantas medicinais para essa finalidade (Gois et al., 2016). A partir do uso medicinal atribuído a cada planta por um grupo populacional específico (abordagem etnofarmacológica), goiabas (*Psidium guajava* L.) e melão de São Caetano (*Momordica charantia*) são amplamente utilizadas no tratamento da diarreia (Leite, 2005; Maciel et al., 2002).

O chá da folha da goiaba (*Psidium guajava* L.) é uma das formas mais comuns de tratamento da diarreia dentro das práticas tradicionais. Esta planta também é descrita como eficaz para hemorragia, colite e cólica (Pinto, 2008; Vendruscolo et al., 2006; Borges et al., 2016). O melão de São Caetano (*Momordica charantia*) tem uso medicinal extenso no Brasil e em países europeus, para uso no tratamento de diarreia, micoses, dengue e malária. Embora o órgão vegetal mais utilizado em práticas medicinais seja as folhas, galhos e frutos também são descritos na literatura (Maia et al., 2008; Gonçalves & Pasa, 2015). Os compostos ativos possivelmente envolvidos nos benefícios gerados por tais plantas permanecem pouco descritos na literatura (Maciel et al., 2002).

Sabe-se que a diarreia caracteriza o principal fator de mortalidade para crianças menores de um ano (Imada et al., 2016; Pereira et al., 2008). Além disso, a vulnerabilidade socioeconômica de algumas populações, saneamento básico inadequado e acesso ao Sistema Único de Saúde são fatores determinantes para a morte diarreica, bem como o pouco ou nenhum contato que certas populações têm com a Medicina Moderna, como alguns grupos indígenas e quilombolas (Passos et al., 2016, Nunes, 2013). A má alimentação na primeira infância, o desmame precoce e fatores culturais também têm impacto (Pereira et al., 2008), bem como o comprometimento do sistema imunológico

por alguma outra doença (Passos et al., 2016).

Assim, é importante elucidar um método simples e acessível para prevenir e tratar casos de diarreia bacteriana gerada por *E. coli* ou *Salmonella* spp., especialmente em crianças, um dos grupos mais afetados por esta situação. Além disso, estudos que verifiquem a eficácia dos extratos vegetais permitem a verificação de novas substâncias bactericidas ou bacteriostáticas para a preparação de novos antibióticos e aumentam a literatura atual sobre fitoterápicos, fator que contribui para a segurança no uso de práticas tradicionais para o uso de fitoterápicos no tratamento de doenças.

O objetivo deste trabalho foi verificar a atividade antimicrobiana de plantas de medicina tradicional: goiaba (*Psidium guajava* L.) e melão de São Caetano (*Momordica charantia*) em *E. coli* e *Salmonella* spp.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

Este é um estudo laboratorial experimental no qual a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos em *E. coli* e *Salmonella* spp. foram avaliados pela técnica de difusão em ágar. Os extratos das folhas de goiaba (*Psidium guajava* L.) e do melão de São Caetano (*Momordica charantia*) foram preparados utilizando a metodologia de extração etanólica. O extrato etanólico foi obtido separadamente, utilizando álcool etílico a 96° GL, segundo metodologia adaptada por Carvalho et al. (2014). Inicialmente, 100 g de folhas secas de *Psidium guajava* L. foram pesadas em balança analítica e maceradas em moinho.

O mesmo processo foi realizado com folhas de *Momordica charantia*. Uma vez macerado, o material vegetal foi depositado em um béquer de vidro de 1000 mL, com álcool etílico a 96 ° GL em quantidade suficiente para entrar em contato com todo o macerado. O recipiente foi tapado com papel alumínio e, após 72 horas em temperatura ambiente, a filtração foi realizada utilizando papel de filtro esterilizado. O filtrado foi levado ao forno de secagem durante sete dias a uma temperatura de 100 ° C para remover o solvente e obter o extrato seco. O extrato seco bruto foi misturado com água destilada estéril, deixando 1 g de extrato para 1 mL de água destilada.

Uma vez obtidos todos os extratos, foram feitas diluições com água destilada estéril de 1: 1, 1: 2, 1: 4, 1: 8 e 1:10 e 1:16. Diluições foram feitas usando pipeta de volume fixo. Sete discos de papel filtro foram utilizados para cada um dos extratos, com diâmetro de 10mm. Cada disco foi embebido com 20 µL de uma diluição do respectivo extrato para que fosse possível verificar a Concentração Mínima Inibitória.

As cepas padrão de *Escherichia coli* (LB 25922) utilizadas no estudo foram obtidas do setor de Microbiologia do Hospital Público do Sudeste Doutor Geraldo Veloso. A *Salmonella* spp. foi obtido do setor de Microbiologia do Laboratório Biotest, com identificação confirmada pelo dispositivo Vitek 2.

O controle negativo, que tem como finalidade verificar a viabilidade do

crescimento bacteriano, foi realizado com inoculação da *E. coli* e da *Salmonella* spp. em placas separadas de meios de cultura comercial ágar MacConkey, meio seletivo para bactérias Gram negativas (presença do cristal violeta inibe o crescimento de microrganismos gram-positivos). O semeio bacteriano foi feito conforme as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2013). A preparação das bactérias para a inoculação foi feita em solução salina a 0,9% e o semeio foi realizado com uso de alça bacteriológica de 10 µL. A semeadura foi feita por método de esgotamento. Após o semeio, o controle negativo foi inoculado em estufa bacteriológica por 24h a 36°C.

O controle positivo consistiu na semeadura de *E. coli* e *Salmonella* spp. em meios comerciais ágar Mueller Hinton, em placas de Petri separadas. A suspensão bacteriana foi preparada a partir da cepa padrão, em solução salina a 0,9%, em tubo de ensaio, até atingir turbidez média de 0,5 na escala de McFarland, o que corresponde a  $1,5 \cdot 10^8$  Unidades Formadoras de Colônia por mL. A turbidez foi verificada com o DensiCHECK Plus. Antes da inoculação em placa, comprimiu-se a alça contra a parede do tubo, para eliminar o excesso de microrganismos. O método de semeadura utilizado foi o de estriamento por toda a placa. Após a semeadura, foram acrescentados discos de antibióticos utilizados para o antibiograma de enterobactérias, sendo estes: tazobactam, amicacina, imipenem, ampicilina, ceftriaxona, ceftazidina, aztreonam, cefalotina, gentamicina e clorafenicol.

A sensibilidade dos extratos vegetais foi testada por meio da metodologia de disco-difusão. Foram utilizadas três placas de Petri contendo meio ágar Mueller Hinton para cada extrato em relação a cada bactéria. O método de semeadura utilizado foi análogo ao utilizado no controle positivo. Em cada trio de placas, avaliou-se a atividade antimicrobiana de um extrato diferente (*Psidium guajava* L., e *Momordica charantia*), com sete discos de papel filtro por placa, cada qual com uma diluição (puro, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:10 e 1:16). A avaliação da atividade antimicrobiana foi feita por meio da medição do halo formado em torno do disco, utilizando halômetro, 24h e 48h após a incubação em estufa bacteriológica a 36°C. Foram consideradas plantas com atividade antimicrobiana as com halo igual ou maior do que 8mm, de acordo com a metodologia de Ribeiro et al. (2009). Todos os testes foram realizados em triplicata.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### ***Psidium guajava* L. sobre *E. coli* e *Salmonella* spp.**

Após o extrato etanólico de goiabeira (*Psidium guajava* L.) ser diluído em água destilada, em diluições de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:10 e 1:16, e aplicado na placa semeada, não foi verificada a formação de halo de inibição em presença *E. coli* nem *Salmonella* spp, em leituras de 24h e 48h (Figuras 1 e 2).

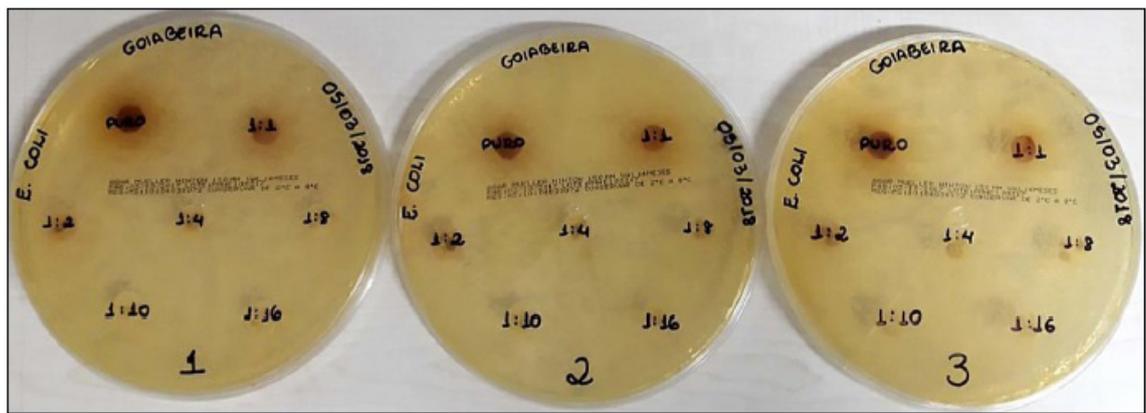


Figura 1. Extrato etanólico de *Psidium guajava* L. em cultura de *E. coli*, leitura em triplicata de 24h

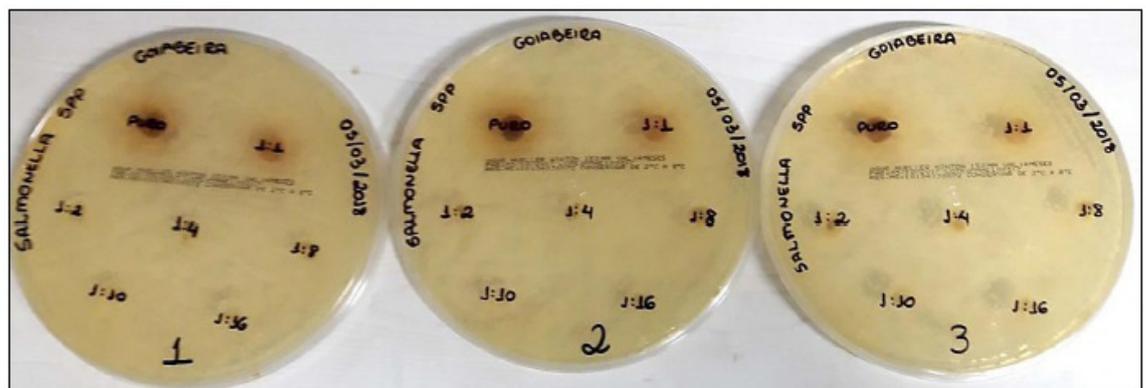


Figura 2. Extrato etanólico de *Psidium guajava* L. em cultura de *Salmonella* spp., leitura em triplicata de 24h

As folhas de *Psidium guajava* L. (goiabeira) não apresentaram atividade antimicrobiana no presente estudo. O solvente utilizado para extração foi o etanol, semelhante ao realizado por Ribeiro et al. (2009), que também verificou ausência de inibição para *E. coli*. Sanches et al. (2005) também não verificaram atividade antimicrobiana contra os Gram negativos *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* a partir de extratos da folha, raiz e casca de *Psidium guajava* L. Em estudo de metodologia semelhante, verificou-se atividade antimicrobiana de três extratos (obtidos com solvente hexano, metanol e acetato de etilo) e do óleo de *Psidium guajava* L. contra *Salmonella* spp, *Salmonella* Anatum e *E. coli*, embora o halo de inibição tenha sido menor do que o observado para *Staphylococcus aureus*, uma bactéria Gram positiva (Gonçalves et al., 2008). Apesar dos resultados verificados no estudo, de ausência de atividade antimicrobiana para duas enterobactérias, o principal uso terapêutico da *Psidium guajava* L. encontra-se no tratamento de doenças do Sistema Gastrointestinal, como diarreia, disenteria e gastrite, verificando-se inclusive atividade da planta contra a *Helicobacter pylori* (Uyub et al., 2010).

Em experimento com diarreia induzida em ratos, verificou-se que o extrato etanólico das folhas de *Psidium guajava* L. reduziu a motilidade gastrointestinal, mecanismo que pode fazer parte do princípio ativo desta planta para o tratamento de diarreia (Mazundar et al., 2015).

Em verificação da atividade antimicrobiana da *Psidium guajava* L. pelo método de extração etanólica, Ribeiro et al. (2009) verificaram que, apesar da planta inibir certas bactérias Gram positivas e o fungo *Candida albicans* não houve eficácia sobre *E. coli*, o que condiz com os resultados encontrados no presente trabalho.

### **Momordica charantia sobre E. coli e Salmonella spp.**

Após o extrato etanólico de melão de são Caetano (*Momordica charantia*) ser diluído em água destilada, e aplicado na placa semeada, em diluições de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:10 e 1:16, não foi verificada a formação de halo de inibição em *E. coli* nem *Salmonella* spp, em leituras de 24h e 48h (Figuras 3 e 4).



Figura 3. Extrato etanólico de *Momordica charantia* em cultura de *E. coli*, leitura em triplicata de 24h



Figura 4. Extrato etanólico de *Momordica charantia* em cultura de *Salmonella* spp., leitura em triplicata de 24h

Atividade antimicrobiana também não foi observada no extrato etanólico de *Momordica charantia* (melão de são Caetano). Divergindo dos achados, Saeed e Tariq (2005) observaram atividade antimicrobiana contra diversas bactérias Gram negativas, incluindo *E. coli* e três espécies de *Salmonella*, a partir do suco da epiderme e dos frutos de *Momordica charantia*. Suprajana et al. (2017) também relataram que o extrato aquoso desta planta inibiu o crescimento em placa de *E. coli*. Resultados semelhantes aos do presente estudo foram relatados por Roopashree et al. (2008), onde o extrato etanólico do melão de são Caetano não foi eficaz para a inibição de *E.*

*coli* e *Salmonella* spp. Os resultados negativos relatados neste trabalho provavelmente estão associados ao solvente utilizado para extração, uma vez que diversos estudos utilizaram o método de extração hidroalcoólico ou associaram o método de extração etanólico ao metanólico (Maia et al., 2008; Souza Neto et al. 2010; Ponzi et al. 2010).

Em comparação de diferentes métodos de extração, Uyub et al. (2010) verificaram que a inibição do crescimento de um mesmo microrganismo ocorria com alguns métodos de extração e outros não, sendo que o solvente com maior número de halos formados foi o metanol e o menor, o petróleo éter, embora este último tenha demonstrado maior capacidade para inibição para a bactéria de interesse do estudo, a *Helicobacter pylori*. Em estudo com análise por injeção de fluxo, Souza Neto et al. (2010) verificaram que os métodos de extração que melhor conservaram metabólitos com propriedades antimicrobianas utilizaram os solventes acetato de etila, diclometano, metanol ou hexano. Os métodos de extração também são apontados como importante fator para a ocorrência de atividade antimicrobiana por Sanches et al. (2005) e Mohamed et al. (2015).

Outra explicação para a não ocorrência de atividade antimicrobiana pode encontrar-se em variações inerentes as próprias plantas. Carvalho Filho et al. (2006) e Vigo et al. (2004) verificaram que o tempo, a época da colheita e o método de secagem provocam variações na composição bioquímica dos vegetais, com maior preservação dos princípios ativos em colheitas realizadas pela manhã, no inverno e com secagem ao sol ou entre 40°C. As condições de clima, solo, exposição ao sol e a chuva e idade variam as concentrações dos componentes químicos dos vegetais, o que também pode ser correlacionado ao grande número de dados divergentes na literatura a respeito da atividade de plantas contra agentes microbianos (Andrade, 2016). No presente trabalho, a ocorrência de resultados negativos provavelmente está associada a temperatura de secagem dos extratos, que pode ter sido responsável pela degradação de alguns compostos ativos.

## AGRADECIMENTOS

Ao setor de Microbiologia do Hospital Público do Sudeste Doutor Geraldo Veloso e ao Laboratório BIOTEST, ambos no município de Marabá/PA, pelo apoio logístico prestado ao longo desse trabalho.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, S. F. V. **Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da casca de *Schinus terebinthifolius* Raddi. através de análise comparativa entre os métodos de difusão em disco e de cavidade em placa.** 2016. 23 f. Monografia (Conclusão de Curso de Ciências Biológicas). Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande.

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2013). **Microbiologia Clínica para o Controle**

**de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 5 :Tecnologias em Serviços de Saúde: descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos/Agência Nacional de Vigilância Sanitária.– Brasília: Anvisa.**

BORGES, R. M.; MOREIRA, R. P. M. Estudo etnobotânico de plantas medicinais no município de Confresa Mato Grosso, Brasil. **Biodiversidade**, v. 15, n. 3, p. 68-82, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS: atitude de ampliação de acesso**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M. M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Revista Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, n. 10, p. 2675-2685, 2012.

BÜHLER, H. F.; IGNOTTI, E.; NEVES, S. M. A. S. et al. Análise espacial de indicadores integrados de saúde e ambiente para morbimortalidade por diarreia infantil no Brasil, 2010. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, n. 9, p. 1921-1934, 2014.

CARVALHO, A. F.; SILVA, D.M.; SILVA, T.R.C. Avaliação da atividade antibacteriana de extratos etanólico e de ciclohexano a partir das flores de camomila (*Matricaria chamomilla* L.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n.3, p. 521-526, 2014.

CARVALHO FILHO, J. L. S.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B. et al. Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 24-30, 2006.

FIRMO, W. C. A.; MENEZES, V. J. M.; PASSOS, C. E. C. et al. Contexto Histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, v. 18, p. 90-95, 2011.

GOIS, M. A. F; LUCAS, F. C. A.; COSTA, J. C. M. et al. Etnobotânica de espécies vegetais medicinais no tratamento de transtornos do sistema gastrointestinal. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.18, n. 2, p.547-557, 2016.

GONÇALVES, K. G. e PASA, M. C. A etnobotânica e as plantas medicinais na Comunidade Sucuri, Cuiabá, MT, Brasil. **Interações**, v. 16, n. 2, p. 245-256, 2015.

IMADA, K. S.; ARAÚJO, T. S.; MUNIZ, P. T. et al. Fatores socioeconômicos, higiênicos e de saneamento na redução de diarreia na Amazônia. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, p 1-11, 2016.

PASSOS, P. H. S.; CUNHA, V. N. Análise das condições sociais de saúde de indígenas da Amazônia Brasileira. **Revista Contribuciones a las Ciencias Sociales**, 2016.

KOVALSKI, M. L.; OBARA, A. T. O estudo da etnobotânica das plantas medicinais na escola. **Ciência & Educação**, v. 19, n. 4, p. 911-927, 2013.

LEITE, I. A.; MORAIS, A. M.; Ó, K. D. S. et al. A etnobotânica de plantas medicinais no município de São José de Espinharas, Paraíba, Brasil. **Biodiversidade**, v. 14, n. 1, p. 22-30, 2015.

LOGAN, C.; BEADSWORTH, M. B. J.; BEECHING, N. J. HIV and diarrhea: what is new? **Current Opinion in Infection Disease**, v. 29, n. 5, p. 486-494, 2016.

MACEDO, A. F.; OSHIIWA, M; GUARIDO, C. F. Ocorrência do uso de plantas medicinais por moradores de um bairro do município de Marília-SP. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 123-128, 2007.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAIA, R. R.; PEREIRA, M. S. V.; HIGINO, J. S. et al. Efeito antimicrobiano do extrato de *Momordica charantia* Linn isolado e em associação com antibiótico sobre *Staphylococcus aureus* multirresistentes. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v. 4, p. 12-17, 2008.

MAZUNDAR, S.; AKTER, R.; TALUKDER, D. Antidiabetic and antidiarrhoeal effects on ethanolic extract of *Psidium guajava* (L.) Bat. leaves in Wister rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 1, p. 10-14, 2015.

MENEGUESSI, G. M.; MOSSRI, R. M.; SEGATTO, T. C. V. et al. Morbimortalidade por doenças diarreicas agudas em crianças menores de 10 anos no Distrito Federal, Brasil, 2003 a 2012. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 24, n. 3, p. 721-730, 2015.

MOHAMED, H. S. A. A.; ABDELGADIR, W. S.; ALMAGBOUL, A. Z. I. *In vitro* antimicrobial activity of Anise seed (*Pimpinella anisum* L.). **International Journal of Advanced Research**, v. 3, n. 1, p. 359-367, 2015.

NUNES, D. J. **Saúde da criança em Comunidades Quilombolas: uma revisão sistemática**. 2013. 40 f. Monografia (Conclusão de Curso Médico). Universidade Federal da Bahia. Salvador.

PALHARES R. M.; DRUMMOND, M. G.; BRASIL, B. S. A. F et al. Medicinal plants recommended by the World Health Organization: DNA barcode identification associated with chemical analyses guarantees their quality. **Plos One**, 2015.

PEREIRA, I. V.; CABRAL, I. E. Diarreia aguda em crianças menores de um ano: subsídios para o delineamento do cuidar. **Escola Anna Nery Revista de Enfermagem**, v. 12, n. 2, p. 224-229, 2008.

PINTO, L. N. **Plantas medicinais utilizadas em comunidades do município de Igarapé-Miri, Pará: etnofarmácia do município de Igarapé-Miri – Pará**. 112 f. 2008. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos). Universidade Federal do Pará. Belém.

PONZI, E. A. C.; OLIVEIRA, T. L.; MORAIS, I. A. F. et al. Atividade antimicrobiana do extrato de *Momordica charantia* L. **Revista de cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial**, v. 10, n.1, p. 89-94, 2010.

RIBEIRO, C. M.; SOUZA, K. G. S.; RIBEIRO, T. A. C. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de plantas utilizadas na medicina popular da Amazônia. **Infarma**, v. 21, n. 1/2, p. 45-49, 2009.

ROOPASHREE, T. S.; DANG, R.; RANI, S. R. H. et al. Antibacterial activity of antipsoriatic herbs: *Cassia tora*, *Momordica charantia* and *Calendula officinalis*. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v. 1, n. 3, p. 20-28, 2008.

SÁ JÚNIOR, P. F.; MUNIZ, E. B.; PEREIRA, N. A. et al. Atividade antimicrobiana in vitro dos extratos aquosos, hidroalcoólicos e alcoólicos de espécies da família Anacardiaceae. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 15, p. 56-61, 2016.

SAEED, S. e TARIQ, P. Antibacterial activities of *Mentha piperita*, *Pisum sativum* and *Momordica charantia*. **Pakistan Journal of Botany**, v. 37, n. 4, p. 997-1001, 2005.

SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; SCHIAVINI, M. S. et al. An evaluation of antibacterial activities of *Psidium guajava* (L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n.3, p. 429-436, 2005.

SÁNCHEZ-CAPILLA, A. D.; SORLÓZANO-PUERTO, A.; RODRÍGUEZ-GRANGER, J. et al. Infectious etiology of diarrheas studied in a third-level hospital during a five-year period. **Revista Española de Enfermedades Digestivas**, v. 107, n. 2, p. 89-97, 2015.

SILVA, F. G.; OLIVEIRA, G. L. Conhecimento popular e atividade antimicrobiana de *Cydonia oblonga* Miller (Rosaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 15, p. 98-103, 2013.

SILVA-DÍAS, H.; BUSTAMANTE-CANELO, O.; AGUILAR-GAMBOA, F. R. et al. Enteropatógenos predominantes en diarreas agudas y variables asociadas en niños atendidos en el Hospital Regional Lambayeque, Perú. **Horizonte Medico**, v. 17, n. 1, p. 38-44, 2017.

SOUZA NETO, I. D.; MANFRIN, M. G.; COSTA, M. B. Estudo da atividade antimicrobiana da *Momordica charantia* L. (*Cucurbitaceae*) em sistemas de injeção em fluxo. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 8, 2010, Anápolis. **Anais do VIII SIC**. Anápolis: UEG, 2010. Disponível em: [http://www.prp2.ueg.br/sic2010/fronteira/arquivos/trabalhos\\_2009/ciencias\\_exatas\\_e\\_da\\_terra/sic/estudo\\_da\\_atividade\\_antimicrobiana.pdf%20%3E%20Acesso%20em:%2020%20mai.%202018](http://www.prp2.ueg.br/sic2010/fronteira/arquivos/trabalhos_2009/ciencias_exatas_e_da_terra/sic/estudo_da_atividade_antimicrobiana.pdf%20%3E%20Acesso%20em:%2020%20mai.%202018).

SUPRAJANA, N.; AVINASH, B.; PRASAD, T. N. V. K. V. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles from *Momordica charantia* fruit extract: study of antimicrobial activities. **International Journal of Pure & Applied Bioscience**, v. 5, n. 1, p. 107-117, 2017.

UYUB, A. M.; NWACHUKWU, I. N.; AZLAN, A. A. et al. In-vitro antibacterial activity and cytotoxicity of selected medicinal plant extracts from Penang Island Malaysia on metronidazole-resistant *Helicobacter pylori* and some pathogenic bacteria. **Ethnobotany Research & Applications**, v. 8, p. 95-106, 2010.

VEIGA JÚNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p.308-313, 2008.

VENDRUSCOLO, G. S.; MENTZ, L. A. Estudo da concordância das citações de uso e importância das espécies e famílias utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, RS, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 367-382, 2006.

VIGO, C. L. S.; NARITA, E.; MARQUES, L. C. Influências da variação sazonal e tipos de secagem nas características da droga vegetal – raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 2, p.137-144, 2004.

VORPAGEL, S. A.; MIRANDA, E. H.; COLACITE, J. et al. Frequência e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de bactérias isoladas de diferentes amostras clínicas em laboratório privado de Marechal Cândido Rondon, PR. **Revista Thêma et Scientia**, v. 2, n. 2, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The United Nations Children's Fund (UNICEF). **Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done**. 2009.

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DA FOLHA DE *Bauhinia forficata* Link (PATA DE VACA)

**Clara Santos Shen**

UNIVERSIDADE CEUMA – São Luís/MA

**Eduarda dos Santos Lima**

Faculdade Uninassau - São Luís/MA

**Mariana Oliveira Arruda**

Faculdade Uninassau – São Luís/MA

**RESUMO:** As plantas do gênero *Bauhinia*, pertencentes à família *Leguminosae*, são encontradas principalmente nas áreas tropicais do planeta e são conhecidas no Brasil como “Pata-de-vaca” ou “Unha-de-boi”. São amplamente utilizadas em forma de chás e outras preparações fitoterápicas para o tratamento de várias enfermidades, como o diabetes. Porém apesar de muitos desses compostos serem conhecidos, pouco se sabe a respeito da atividade farmacológica da maioria das substâncias isoladas do gênero *Bauhinia*. Além disso, são necessários estudos que avaliem a atividade antimicrobiana, para que se possa ampliar seu uso na medicina. Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcólico das folhas de *Bauhinia forficata* L. contra linhagens de bactérias e fungos de interesse clínico. Utilizou-se o método de difusão em ágar, seguido pela microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e a realização da análise fitoquímica. Foi demonstrado propriedades antibacterianas

contra bactérias Gram-positivas (*Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*), com concentração inibitória mínima (CIM) de 20 mg/ml para *Listeria monocytogenes*, 10 mg/ml para *Pseudomonas aeruginosa* e 5mg/ml para *Staphylococcus aureus*. Foi constatada a presença de metabólitos secundários como taninos e flavonoides. As infecções causadas por bactérias e fungos é um grave problema de saúde pública. Diante deste cenário, a busca por novas substâncias antimicrobianas a partir de fontes naturais, como as plantas, tem ganhado importância nas companhias farmacêuticas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Ação antimicrobiana, *Bauhinia forficata*, Pata de vaca.

**ABSTRACT:** The plant genus *Bauhinia* belong to the *Leguminosae* family and are found in the tropical areas of the planet and are known in Brazil as “Pata de Vaca” or “Unha de boi”. They are widely used in the form of herbal teas and other herbal preparations that can be use for treatment of many diseases, such as diabetes and bacterial diseases. Although many of these compounds aren’t known, and very little is know about the pharmacological activity of most substances isolated from this genus. Nervertheless, other studies are needed to evaluate the antimicrobial activity, to be able to use in medicine are expanded. To evaluate the

antimicrobial activity of the hydroalcoholic extract of the leaves of *Bauhinia fortificata* L. against strains of bacteria and fungi from clinical samples. The agar diffusion method was used, followed by broth microdilution to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and the performance of the phytochemical analysis. Antibacterial properties against Gram-positive (*Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*) and Gram-negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*), the minimum inhibitory concentration (MIC) was; 20 mg/ml for *Listeria monocytogenes*, 10 mg/ml for *Pseudomonas aeruginosa* and 5mg/ml for *Staphylococcus aureus*. The presence of secondary metabolites such as tannins and flavonoids was observed. Infections caused by bacteria and fungi are an increasingly important health problem. Within this scenario, the search for novel antimicrobial substances from natural sources such as plants are important for society and many pharmaceutical companies who works with this products.

**KEYWORDS:** Antimicrobial activity; *Bauhinia fortificata*; Pata de vaca

## 1 | INTRODUÇÃO

O emprego de plantas como medicamentos se dá desde o início da história da humanidade. A busca por alívio e cura de doenças através da ingestão de ervas, provavelmente tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (KINGSTON, 2011).

As plantas de uso medicinal são frequentemente utilizadas no tratamento e prevenção de diversas patologias, sendo consideradas fontes importantes de compostos biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em matérias-primas ou protótipos para síntese de novos fármacos. Estima-se que pelo menos 25% de todos os medicamentos comercializados sejam provenientes direta ou indiretamente de plantas medicinais (ROBINSON; ZHANG, 2011).

O interesse popular no uso de planta medicinal para fins terapêuticos tem sido muito significativo, principalmente nos países em desenvolvimento, devido ao difícil acesso da população aos medicamentos sintéticos. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), entre 60-80% da população mundial utiliza a medicina tradicional ou a fitoterapia no tratamento de várias doenças (BAGATINI et al., 2007).

As pesquisas com propósito de obter novos medicamentos a partir de plantas ou de aprimorar fitoterápicos já existentes, vêm reassumindo um papel importante nos últimos anos. Dentre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal, destaca-se as plantas do gênero *Bauhinia*, pertencentes à família Leguminosae, as quais são encontradas principalmente nas áreas tropicais do planeta, compreendendo em torno de 300 espécies, sendo que aproximadamente 200 são encontradas no Brasil, e destas, 98 são nativas (ACHENBACH, 1988; VAZ; TOZZI, 2005).

No Brasil, as plantas do gênero *Bauhinia* são conhecidas popularmente como “pata-de-vaca” ou “unha-de-boi”, devido ao formato bilobado de suas folhas, que lembra

o rastro da pata dos bovinos. São amplamente utilizadas em forma de chás e outras preparações fitoterápicas para o tratamento de várias enfermidades (CECHINEL, 2009).

Estudos experimentais a respeito das atividades farmacológicas de espécies do gênero *Bauhinia* já foram relatados na literatura, como por exemplo: atividade anti-ulcerogênica do extrato de flores de *B. racemosa* por meio da indução de úlceras gástricas em ratos (AKHTAR; AHMAD, 1995); atividade hipoglicemiante das espécies *B. candicans*, *B. cheilantha*, *B. divaricata*, *B. megalantra*, *B. monandra*, sendo destacada a espécie *B. forficata*, por apresentar maior número de estudos que avaliam seu efeito anti-diabético (SILVA; CECHINEL FILHO, 2002).

A utilização popular de espécies do gênero *Bauhinia* para o tratamento de doenças infecciosas tem sido comprovada por meio de estudos experimentais na busca de confirmar seu potencial antimicrobiano, como observado por Achenbach et al. (1988), o potencial antifúngico de *B. manca*, e, adicionalmente Savi et al. (1996) verificaram que a espécie *B. splendens* possui princípios ativos contra bactérias patogênicas. Entretanto, apesar de muitos desses compostos serem conhecidos, pouco se conhece sobre a atividade farmacológica da maioria das substâncias isoladas do gênero *Bauhinia* (CECHINEL, 2009), em particular da espécie *B. forficata*.

Considerando que as plantas são conhecidas como a principal fonte de drogas utilizadas na terapia, com comprovação de ações farmacológicas relevantes, faz-se necessário o reconhecimento e validação dessas informações e a procura por novas estratégias derivadas de produtos naturais para o controle de doenças infecciosas.

Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das folhas da *Bauhinia forficata* Link, contra linhagem de bactérias e levedura de interesse clínico.

## 2 | METODOLOGIA

### 2.1 Espécie vegetal e local de coleta

O material vegetal utilizado nesse estudo foram as folhas da *Bauhinia forficata* Link coletadas com uma tesoura de poda, no período matutino, no herbário Ático Seabra da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), localizado no município de São Luís-MA.

A identificação da espécie vegetal foi realizada pela Prof<sup>a</sup>. Ana Zélia Silva da UFMA, e uma exsicata da espécie encontra-se depositada no Herbário deste Núcleo sob nº 01161.

### 2.2 Preparação do extrato hidroalcoólico

O extrato hidroalcoólico foi preparado conforme as recomendações da Farmacopéia Brasileira (2010). Para a realização da maceração foi utilizado um vidro

âmbar com tampa rosqueada, onde foram colocados 81,87 gramas do pó das folhas de *B. forficata* e adicionado 327,28 ml do solvente extrator (etanol 70%) na proporção de 1:4 (m/v). Esse frasco permaneceu a temperatura ambiente sob agitação manual diárias de pelo menos 3 vezes, durante 10 dias. Após esse período as soluções extrativas foram filtradas em um papel filtro e concentradas em rotaevaporador, sob pressão reduzida e temperatura de 50°C para retirada do solvente, obtendo um rendimento final de 10%.

## 2.3 Atividade antimicrobiana

### 2.3.1 Micro-organismos avaliados

A atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico, preparado a partir das folhas da espécie vegetal estudada, foi testada contra os seguintes micro-organismos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella enterica typhimurium* (ATCC 14028), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313) e *Candida albicans* (ATCC 18804). Todas as linhagens dos micro-organismos foram obtidas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Setor de Bactérias de Referências da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil).

### 2.3.2 Padronização da suspensão

As cepas bacterianas foram semeadas em placa com ágar Mueller-Hinton e a levedura em ágar Sabouraud, incubados a 35°C por 24 e 48 horas, respectivamente. Após o período de incubação foi preparada a suspensão dos micro-organismos com turbidez equivalente ao tubo 0,5 da escada de *McFarland* ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) (ARAÚJO, 2011).

### 2.3.3 Teste de difusão em ágar

Para a detecção da atividade antimicrobiana foram utilizados os ensaios de difusão em ágar, de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013) e a microdiluição em caldo. Para a realização do teste de difusão em ágar foram utilizadas placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton (bactérias) e ágar Sabouraud (fungo). Nestas placas foram confeccionados orifícios com canudos estéreis de aproximadamente 6 mm de diâmetro. As suspensões bacterianas e de *C. albicans* foram semeadas nas placas com os respectivos meios de cultura utilizando um *swab* estéril. Em seguida, foram adicionados nos poços alíquotas de 50 µL do extrato na concentração de 100 mg/ml (poço 1), 50 µL de DMSO 1% (controle negativo – poço 2) e 50 µL de ciprofloxacina (controle positivo – poço 3). As placas foram incubadas a

35°C por 24h (bactérias) e 48h (fungo) para verificação da presença ou não de halo de inibição. Os diâmetros dos halos foram mensurados através de uma régua milimétrica. Todo o ensaio foi realizado em triplicata.

#### *2.3.4 Concentração Inibitória Mínima (CIM)*

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo (LIMA et al., 2006; SANTOS et al., 2007).

Para a determinação da CIM foram utilizadas microplacas de 96 poços esterilizadas e com tampas. Os poços da linha A da microplaca foi preenchido com 160  $\mu\text{L}$  de caldo Mueller-Hinton (bactérias) ou caldo Sabouraud (fungos) e 40  $\mu\text{L}$  do extrato, em seguida foi realizada a diluição seriada, obtendo concentrações finais de 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 mg/ml. O controle positivo utilizado foi a ciprofloxacina (3,12 – 400  $\mu\text{g/mL}$ ) e o negativo foi DMSO 1%. Adicionalmente foi inoculado 1  $\mu\text{L}$  das suspensões de micro-organismos com turbidez equivalente a escala 0,5 de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) em todos os poços da microplaca. A microplaca foi incubada a 37°C por 24h (bactérias) e 48h (fungos). Após a incubação foi adicionado 30  $\mu\text{L}$  de resazurina a 0,03 % em cada poço e novamente as placas foram incubadas nas mesmas condições por aproximadamente 40 minutos, para visualização da mudança de coloração. A CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano/ fúngico, ou seja, onde não houve mudança de coloração do azul para rosa (PALOMINO et al., 2002).

#### *2.3.5 Concentração Bactericida Mínima (CBM)*

Logo após a determinação da CIM foi avaliada a CBM. Foram utilizadas alças bacteriológicas para homogeneizar cada poço das microplacas e inocular nos seus respectivos meios de cultura: ágar Mueller Hinton para bactérias e ágar Sabouraud. As placas foram incubadas a 35°C por 24h em condições de aerobiose para todas as bactérias e 48h para os fungos. Após a incubação, as culturas foram observadas para a verificação visual do crescimento microbiano. A ausência de crescimento significou ação bactericida. Os testes foram realizados em triplicata.

### **2.4 Análise fitoquímica**

A análise dos metabólitos secundários foi realizada segundo a metodologia adaptada de MATOS (1997).

### 3 | RESULTADOS

#### 3.1 Atividade Antimicrobiana

A análise da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da folha da *B. forficata* no teste de difusão em ágar não apresentou halo de inibição, enquanto no teste de microdiluição em caldo, foi verificada a atividade antibacteriana para *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, onde a menor concentração inibitória encontrada foi para o *S. aureus* (5 mg/ml), seguido por *P. aeruginosa* (10 mg/ml). A concentração bactericida mínima (CBM) para *P. aeruginosa* foi de 20 mg/ml.

Ressalta-se que não houve atividade antimicrobiana para *Salmonella enterica typhimurium* e *Candida albicans*.

Micro-organismos	Extrato de <i>B. forficata</i> (mg/mL)	
	CIM	CBM
<i>Listeria monocytogenes</i>	20	>20
<i>Salmonella enterica typhimurium</i>	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	20
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	5
<i>Candida albicans</i>	-	-

Tabela 1 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato hidroalcoólico da folha de *Bauhinia forficata* contra patógenos de interesse médico.

Legenda: (-) ausência de atividade antimicrobiana.

#### 3.2 Análise Fitoquímica

A abordagem fitoquímica revelou a presença de taninos, e flavonoides, porém o extrato não apresentou triterpenos/esteroides, nem saponinas.

Fitoquímica	Extrato <i>B. forficata</i>
Triterpenos e esteroides	-
Flavonoides	+
Taninos	+
Saponinas	-

Tabela 2 – Composição fitoquímica do extrato hidroalcoólico do extrato das folhas de *B. forficata*.

Legenda: Sinal positivo (+) significa presença da substância; Sinal negativo (-) ausência da substância.

### 4 | DISCUSSÃO

Vários pesquisadores têm demonstrado que extratos, frações e compostos isolados extraídos de fontes naturais têm apresentado significativas propriedades,

dentre estas a antimicrobiana (HOLETZ et al., 2002; FLEISCHER et al., 2003; BETONI et al., 2006; CHOUDHURY et al., 2012).

Em um estudo realizado por Ahmed et al. (2012), foi verificada atividade antimicrobiana do gênero *Bauhinia*, mais precisamente das espécies *B. bowkeri*, *B. galpinii*, *B. petersiana*, e *B. variegata*, inibindo o crescimento de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, nas concentrações de 30 a 2500 µg/mL, porém ainda existem poucos estudos com a espécie *B. forficata*.

Nesse estudo, para avaliação da atividade antimicrobiana foi utilizado primeiramente o teste de difusão em ágar e para confirmação dos resultados, empregou-se o método de microdiluição em caldo. Este último mostrou-se mais sensível, uma vez que detectou atividade antibacteriana não detectada pelo método de difusão. Esses resultados podem ser explicados pela dificuldade de difusão do extrato no meio de cultura. Essa dificuldade de difusão de produtos naturais pode estar relacionada à sua hidrossolubilidade e à sua massa molecular.

Portanto, uma das desvantagens deste método é a dependência do peso molecular das substâncias, assim soluções de peso molecular mais baixo difunde mais rapidamente que aquelas de maior peso, podendo gerar resultados falso-positivos. Deste modo, mesmo que a substância testada seja um potente agente antimicrobiano, essa propriedade pode ser “camuflada” devido às características moleculares do produto (ORLANDO, 2005).

De acordo com Ribeiro; Soares (2000), diversos fatores podem influenciar no método de difusão em ágar, como: a presença de enzimas bacterianas, a composição do meio, a difusão da substância no meio, a densidade do inóculo, o período de incubação, bem como a temperatura e a estabilidade da substância em uso. Nesse método, a presença de matéria particulada na amostra também pode interferir na difusão da substância antimicrobiana no ágar (VANDEN BERGUE; VLIETINCK, 1991).

Nesse trabalho o extrato hidroalcoólico de *B. forficata* demonstrou atividade sobre o crescimento de bactérias Gram-positivas (*Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*). Dados semelhantes foram obtidos por Sousa et al. (2000), que avaliaram a atividade antimicrobiana dos extratos das frações de *B. forficata* e *B. microstachya* por meio do método de difusão em ágar, observando que somente uma fração da *B. forficata* inibiu o crescimento de *E. coli* e *S. aureus* na concentração de 1000 µg/mL.

Nesse estudo não foi verificada ação antimicrobiana para a levedura, *C. albicans*, corroborando com os resultados obtidos por Silva; Cechinel Filho (2002) que testaram a atividade antimicrobiana do extrato de *B. forficata* para fungos filamentosos e leveduras patogênicas, e também não detectaram atividade antifúngica.

Todos esses estudos apresentados, corroboram com o resultado deste trabalho, pois demonstram que a *B. forficata* e as outras espécies desse gênero apresentam propriedades antimicrobianas. Porém, vale ressaltar que existe uma diferença entre

as concentrações inibitórias, esta diferença pode ser explicada porque utilizaram diferentes espécies desse gênero, sendo que cada uma apresenta composição química diferente e conseqüentemente maior ou menor concentração de princípios ativos, podendo haver ainda diferenças decorrentes do solo, clima e sazonalidade de onde são obtidas as plantas (PEREIRA et al., 2014).

A atividade antimicrobiana observada nos testes realizados com os extratos brutos pode ser explicada pela presença de determinados componentes químicos. Substâncias que são resultantes do metabolismo secundário das plantas, que no vegetal têm a função de defesa contra predadores ou atração de agentes polinizadores, mas também apresentam outras atividades biológicas (COSTA et al., 2005). O extrato hidroalcoólico de *B. fortificata*, apresentou tanino na sua composição química, conforme outros estudos já realizados (LORENZI e MATOS, 2002; SARTORATTO et al., 2004; MARQUES, 2006).

Os taninos possuem três hipóteses quanto ao mecanismo de ação antimicrobiana: a primeira, quando ocorre inibição de enzimas bacterianas, ou complexando-se com os substratos dessas enzimas; a segunda inclui a ação dos taninos sobre as membranas celulares dos micro-organismos, modificando seu metabolismo e a terceira fundamenta-se na complexação dos taninos com íons metálicos, diminuindo a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano (SCALBERT, 1991).

Segundo Loguercio et al. (2005), os taninos possuem considerável atividade contra bactérias Gram-positivas, devido a constituição da parede celular dessas bactérias, menos complexa e com menor teor lipídico, do que as Gram-negativas, permitindo que os taninos atuem sobre a membrana alterando sua funcionalidade, o mesmo foi verificado neste trabalho, onde o extrato hidroalcoólico de *B. forficata* apresentou atividade antibacteriana contra as bactérias Gram-positivas *L. monocytogenes* e *S. aureus*.

Nesse estudo o extrato não apresentou triterpenos/esteroides, nem saponinas, mas apresentou flavonoides. No entanto, no trabalho de Silva; Cechinel Filho (2002) sobre a composição química das plantas do gênero *Bauhinia*, detectaram a presença de esteroides e flavonoides na espécie *B. forficata*. De uma forma geral, o efeito antibacteriano dos flavonoides deve-se também à atribuição de grupos fenólicos hidroxilo que apresentam afinidade para as proteínas e, por essa razão, atuam como inibidores de enzimas bacterianas e interferem nas suas vias de síntese (ALCARÁZ et al., 2000; ÀVILA et al., 2008; LI et al., 2012).

Portanto, a busca por opções terapêuticas para diferentes patologias faz da pesquisa de produtos naturais um campo fértil em opções de moléculas com diferentes atividades biológicas. Isso se deve a inúmeros fatores, como: o aumento a resistência a múltiplos antibióticos, o impacto das doenças infecciosas na morbidade e mortalidade, o alto custo dos antibióticos convencionais, a busca pelas terapias naturais, entre outros.

## 5 | CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstraram as propriedades antibacterianas do extrato hidroalcoólico da folha de *Bauhinia fortificata* contra bactérias Gram-positivas (*L. monocytogenes* e *S. aureus*) e Gram-negativas (*P. aeruginosa*), adicionando um valor global ao seu potencial medicinal. Porém é necessário que haja uma pesquisa mais extensa, pois apesar de constatada a presença de metabólitos que apresentam atividade antimicrobiana como os taninos e flavonoides, é recomendável a continuação de estudos, para determinar as frações purificadas e os compostos bioativos, já que são raros os estudos que relacionam tais metabólitos ao efeito biológico indicado.

## REFERÊNCIAS

- ACHENBACH, H.; STOCKER, M.; CONSTENLA, M.A. **Flavonoid and other constituents of *Bauhinia manca***. *Phytochemistry*, v.27, n. 6. p. 1835-1841, 1988.
- AHMED, S.J.; FARAJ, R.A.; AZAWI, R.; AL-KAREEM, M.M. A. **Study of comparison of antimicrobial potencies of *Bauhinia Variegata* leave extracts with antibiotics against selected bacteria**. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, v. 4, n. 3, p. 44-46, 2012.
- AKHTAR, A.H.; AHMAD, K.U. **Anti-ulcerogenic evaluation of the methanolic extracts of some indigenous medicinal plants of Pakistan in aspirin-ulcerated rats**. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 46, n.1, p. 1-6, 1995.
- ALCARÁZ, L.E.; BLANCO, S.E.; PUIG, O.N.; TOMÁS, F.; FERRETI, F.H. **Antibacterial Activity of Flavonoids Against Methicilin – resistant *Staphylococcus aureus* strains**. *Journal of Theoretical Biology*, v. 205, n. 2, p. 231 – 240, 2000.
- ARAÚJO, I.S. **Atividade antimicrobiana de plantas aromáticas que ocorrem no estado do Pará**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal do Pará. Feira de Santana – BA, 2011.
- ÁVILA, P.H.; SMÂNIA, E.F.A.; MONACHE, F.D.; SMÂNIA JÚNIOR, A. **Structure – activity relationship of antibacterial chalcones**. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v.16, n. 22, p. 9790 – 9794, 2008.
- BAGATINI, M.D.; SILVA, A.C.F.; TEDESCO, S.B. **Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais**. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 3 p. 444 - 447, 2007.
- BETONI, J.E.C.; MANTOVANI, R.P.; BARBOSA, L.N.; Di STASI, L.C.; FERNANDES JÚNIOR, A. **Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 101, n. 4, p. 387-390, 2006.
- CECHINEL FILHO, V. **Chemical Composition and Biological Potential of Plants from the Genus *Bauhinia***. *Phytotherapy Research*, v. 23, p. 1347-1354, 2009.
- CHOUDHURY, S.; SHARAN, L.; SINHA, M.P. **Phytochemical and Antimicrobial Screening of *Psidium Guajava* L. Leaf Extracts against Clinically Important Gastrointestinal Pathogens**. *Journal of Natural Product and Plant Resources*, v. 2, n. 4, p. 524-529, 2012.
- CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Publication M100-S23 Suggested

Grouping of US-FDA Approved Antimicrobial Agents That Should Be Considered for Routine Testing and Reporting on Nonfastidious Organisms by Clinical Laboratories, 2013.

COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F.F.G.; ANGÉLICO, E.C.; SILVA, M.R.; MOTA, M.L.; SANTOS, N.K.A.; et al. **Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzygium aromaticum* frente a larvas do *Aedes aegypti*.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 15, n. 4, p. 304-309, 2005.

FLEISCHER, T.C.; AMEADE, E.P.K.; MENSAH, M.L.K.; SAWER, I.K. **Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*.** Fitoterapia, v. 74, n. 1-2, p. 136-138, 2003.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V. **Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 97, p. 1027–1031, 2002.

KINGSTON, D.G.I. **Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation.** Journal of Natural Products, v. 74, n. 3, p. 496-511, 2011.

LI, Y.; Luo, Y.; Hu, Y.; Zhu, D.D.; Zhang, S.; Liu, Z.J.; Gong, H.B.; Zhu, H.L. **Design, synthesis and antimicrobial activities of nitroimidazole derivatives containing 1,3,4 – oxadiazole scaffold as FabH inhibitors.** Bioorganic and Medicinal Chemistry, v. 20, p. 4316 – 4322, 2012.

LIMA, M.R.F.; LUNA, J.S.; SANTOS, A.F.; ANDRADE, M.C.C.; SANT'ANA, A.E.G.; GENET, J.P.; et al. **Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants.** Journal of Ethnopharmacology, v. 105, n. 1-2, p. 137-147, 2006.

LOGUERCIO, A.P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A.C.; HENZE, A.; WITT, N.M. **Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells).** Ciência Rural, Santa Maria, v.35, n.2, p. 371 – 376, 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** São Paulo: Instituto Plantarum de estudos da flora LTDA, p. 512, 2002.

MARQUES, M.F. **Estudo da Resposta Imunológica induzida por *Arnica montana* L.** Tese (Doutorado em Análises Clínicas) - Universidade Estadual Paulista/UNESP, Araraquara, São Paulo, 112p., 2006.

MATOS, F.A. **Introdução a Fitoquímica Experimental.** Fortaleza: UFC Edições, 1997.

ORLANDO, SC. **Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico bruto da casca do *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (barbatimão).** 2005. 89f. [Dissertação de Mestrado] – Universidade de Franca, Franca, 2005.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. **Resazurin Microtiter Assay Plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.** Antimicrobial Agents Chemotherapy, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PEREIRA, A.C.S.; RIBEIRO, G.E.; SOUZA, L.C.R.; RUFINO, L.R.A.; CABRAL, I.S.R.; BORIOLLO, M.F.G.; NOGUEIRA, D.A.; OLIVEIRA, N.M.S.; FIORINI, J.E. **Atividade biológica do extrato hidroalcoólico de *Bauhinia forficata* Link sobre *Herpetomonas samuelpessoai* (Galvão.) Roitman.** Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v.16, n.3, p.585-592, 2014.

RIBEIRO, M.C.; SOARES, M.M.S.R. **Microbiologia prática: roteiro e manual.** São Paulo: Atheneu, 2000.

ROBINSON, MM; ZHANG, X. **The world medicines situation 2011 traditional medicines: global situation, issues and challenges.** Geneva: World Health Organization; 2011. Disponível em: < http://

[www.who.int/medicines/areas/policy/world\\_medicines\\_situation/WMS\\_ch6\\_wPricing\\_v6.pdf](http://www.who.int/medicines/areas/policy/world_medicines_situation/WMS_ch6_wPricing_v6.pdf) Acesso em 10.10.2017.

SANTOS, S. C; FERREIRA F.S.; ROSSI-ALVA J.C.; Fernandez L.G. **Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes.** Revista Brasileira de Farmacognosia. V. 17, n. 2, p. 215 – 219, 2007.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L.M.; DELARMELENA, C.; FIGUEIRA, G.M.; DUARTE, M.C.T.; REHDER, V.L.G. **Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 35, p. 275-280, 2004.

SAVI, A.O.S.; BREVIGLIERI, E.; CRUZ, A.B.; YUNES, R.A.; FILHO CEEHINEL, V. **Antibacterial activity of *Bauhinia splendens* leaves (Leguminosae).** Revista de Biologia Tropical, v. 44/45, p.601-603, 1996.

SCALBERT, A. **Antimicrobial properties of tannins.** Phytochemistry, v. 30, p. 3875-3883, 1991.

SILVA, K.L.; CECHINEL FILHO, V.C. **Plantas do Gênero *Bauhinia*: Composição química e potencial farmacológico.** Química Nova, v. 25, p.449, 2002.

SOUZA, R S. S.; SANTOS, D.R; BELLA CRUZ, R.C.; **VI Seminário Integrado de Iniciação Científica,** Camboriú, Brasil, 2000.

VANDEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. **Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants.** In: DEY, P.M. & HARBONE, J. D. (eds), Methods in Plant Biochemistry, Academic Press, London, p.47–69 1991.

VAZ, A. M. S. F.; TOZZI, A. M. G. A. **Sinopse de *Bauhinia* sect. *Pauletia* (Cav.) DC. (Legumino: Caesalpinioideae: Cercideae) no Brasil.** Revista Brasileira de Botânica., v. 28, n.3, p.477-491, 2005.

## AVALIAÇÃO DA CITOXIDADE, MUTAGENICIDADE E TOXICIDADE DO EXTRATO ETANÓLICO DOS FRUTOS DO *Lycium barbarum* (GOJI BERRY) POR MÉTODOS *Allium cepa* EM CÉLULAS EUCLARIONTES

**Ogenya Rafaela Bispo de Souza**  
**Francisca dos Santos**  
**Manoel Pinheiro Lúcio Neto**

**RESUMO:** No Brasil a preferência dos consumidores por plantas medicinais vem crescendo, isso se deve ao baixo custo e variações de fórmulas preparatórias (MARTINS et al. 2014). Pode-se dizer que tanto a planta medicinal quanto os produtos de sua biotransformação são substâncias presentes em concentrações muito mais elevadas que o normal, portanto, extremamente tóxico. Podendo ter efeitos não somente imediatos mais efeitos que se instalam em longo prazo e de forma com que o paciente não tenha sintoma algum. Diante disso objetivou-se avaliar os possíveis efeitos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do extrato etanólico dos frutos de *Lycium barbarum*, através do teste *Allium cepa* em células eucariontes, em seguida analisou-se os dados no graph prisma versão 5.0 com teste ANOVA (one-way) seguido do teste de tukey. De acordo com os resultados pode se constatar que o *Lycium barbarum* (Goji berry ) em concentrações elevadas como as de 215 e 430 mg/mL apresentam genotoxicidade, toxicidade, citotoxicidade e mutagênicas evidente. Porém na dose de 107,5 mg/mL não apresenta toxicidade. Por tudo isso, verifica-se que é

necessário estudos complementares, como estudos não clínicos de segurança no sentido de confirmação dos resultados e elucidação dos possíveis mecanismos geradores dos danos.

**PALAVRAS- CHAVE:** *Lycium. barbarum*. Goji. berry. Toxicidade. Fitoterapia.

**ABSTRACT:** In Brazil, the preference of consumers for medicinal plants has been increasing, due to the low cost and variations of preparatory formulas (MARTINS et al., 2014). It can be said that both the medicinal plant and the products of its biotransformation are substances present in concentrations much higher than the normal, therefore, extremely toxic. It may have effects not only immediate but effects that settle in the long term and so that the patient has no symptoms at all. The objective of this study was to evaluate the possible toxic, cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of the ethanolic extract of the fruits of *Lycium barbarum* by means of the *Allium cepa* test in eukaryotic cells, and then analyzed the data in graph prism version 5.0 with ANOVA ( One-way) followed by the tukey test. According to the results it can be seen that *Lycium barbarum* (Goji berry) at high concentrations such as 215 and 430 mg / mL present evident genotoxicity, toxicity, cytotoxicity and mutagenicity. However, at the dose of 107.5 mg / mL there is no toxicity. Therefore, it is necessary to carry out complementary studies,

such as non-clinical safety studies in order to confirm the results and elucidate the possible mechanisms causing the damage.

**KEYWORDS:** *Lycium. Barbarum* Goji. Berry. Toxicity. Phytotherapy.

## 1 | INTRODUÇÃO

A fitoterapia tem se tornado uma alternativa pela população em maneira geral, por suas propriedades de cura, sejam elas verdadeiras ou ritualísticas. AOMS (Organização Mundial da Saúde) estima que cerca de 80% da população depende da medicina tradicional para o tratamento de inúmeras patologias, desse modo o uso de plantas e de outras fontes naturais com propriedades terapêuticas tem sido muito valorizado pelo mundo inteiro devido à busca constante por hábitos saudáveis e pela dificuldade em tratamento de algumas doenças. No Brasil a expansão da fitoterapia deve-se aos efeitos adversos de medicamentos sintéticos. A preferência dos consumidores por plantas medicinais vem crescendo, isso se deve ao baixo custo e variações de fórmulas preparatórias, a validação científica das propriedades farmacológicas de fitofármacos vem sendo estudada ao longo de suas utilizações (MARTINS *et al.* 2014)

O *Lycium barbarum* também conhecida como Goji Berry seu fruto é bastante consumido por conta de suas propriedades medicinais e por seu potencial nutritivo, deste modo possui elevado valor comercial. A *Lycium barbarum* pertence à família Solanaceae, cultivada abundantemente no Oriente e Mediterrâneo. Quanto as suas características morfológicas trata-se de uma planta arbustiva, com folhas caducas (CAVAZIM *et al.* 2014).

Segundo Martins *et al* (2014), no que diz respeito à composição seu fruto contém um complexo rico em carotenóides, incluindo o betacaroteno, zeaxantina e a luteína, taurina, grande quantidade de vitamina C e vitaminas B1, B2, B6, além de minerais como K, Ca, Zn, Fe, Co, Mn, Se, Mg, oligoelementos, carotenoides antioxidantes (betacaroteno e zeaxantinas).

De acordo com Cavazim *et al* (2014), recentemente bastante atenção foi atraída para o carotenoide contido no Goji berry e seus efeitos benéficos sobre a retinopatia, degeneração macular, e visão. Além da atividade terapêutica no tratamento da obesidade e diabetes, redução do nível de colesterol total, hepatoproteção e redução da infertilidade.

Como o Goji Berry vem sendo utilizado por autocuidado e seus efeitos tóxicos não são bem divulgados, faz-se necessário ensaios de avaliação dos possíveis efeitos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do extrato do fruto *Lycium barbarum* com a intenção de traçar um perfil de segurança do seu uso popular.

## 2 | METODOLOGIA

### 2.1 Coleta do material botânico

Os frutos do *Lycium barbarum* foram adquiridos comercialmente em Teresina-PI, onde escolheu-se três marcas diferentes totalizando 400 g de frutos secos, pois o intuito da pesquisa era estudar a toxicidade dos frutos.

Quanto aos organismos testes *Allium cepa* esses foram adquiridos 40 bulbos comercialmente de supermercados em Teresina-PI, que apresentavam-se com catafilos externos brancos, mesmas origens, não germinados e saudáveis.

### 2.2 Preparo do extrato

Para a obtenção do extrato etanólico dos frutos do *Lycium barbarum*, usou-se uma proporção de 1:6 p/v (1g do fruto seco para cada 6mL) de álcool etílico 70%. Após a coleta o material botânico foi triturado em liquidificador convencional, pesado em balança semi analítica 396,2g) e acondicionado com o solvente extrator (2,530 mL) à temperatura ambiente em frasco âmbar com tampa rosqueada por sete dias, sendo agitado periodicamente. Após esse período, a solução foi filtrada por filtração a vácuo e em seguida concentrada em rotaevaporador sob pressão reduzida a uma temperatura de 40 °C. Finalmente, o extrato foi armazenado sob temperatura ambiente, ao abrigo da luz. O rendimento do extrato bruto foi de 28,4 g. O preparo do extrato foi adaptado conforme o método de Silva (2011).

### 2.3 Condições de crescimento das raízes, concentrações do ensaio e tratamentos

O teste *Allium cepa* foi realizado segundo descrição de Fiskesjo (1985), com algumas adaptações, conforme descrito por Mitteregger *et al* (2007). Cada grupo experimental constou com o extrato aquoso dos frutos *Lycium barbarum* (Goji Berry) nas concentrações de 430, 215 e 107,5 mg/mL. Como controles negativo e positivo foram utilizados, respectivamente, água sem cloro e sulfato de cobre 0,0006 mg/mL.

Essas concentrações foram escolhidas baseadas na utilização de forma empírica pela população que é de 500mg/ml, com isso, foram analisadas concentrações semelhantes para possíveis detecções de toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade.

Utilizou-se bulbos de cebolas da espécie *Allium cepa* (2n=16; diâmetro: 20 a 30 mm e peso: 5 a 10 g), com catafilos externos brancos, mesmas origens, não germinados e saudáveis, estes foram mantidos em local livre de umidade e ao abrigo da luz. Antes do teste, os catafilos externos secos foram removidos com bisturi, cuidando-se para que a área radicular não seja danificada. Em seguida, os bulbos foram postos em água de torneira por duas horas para que se reduza os efeitos de possíveis inibidores do brotamento.

Cada experimento constou com 05 (cinco) bulbos. Cada solução foi distribuída

em recipientes de vidro, previamente esterilizados, de capacidade de 10 mL e colocou-se um bulbo em cada recipiente com a área radicular em contato com a solução, sendo deixado para germinar a 18–22°C (KOVALCHUK *et al.*, 1998). O volume de solução absorvido foi repostado diariamente, objetivando a manutenção das raízes mergulhadas. Após 72 horas de exposição, as raízes foram medidas com o auxílio de régua sendo desprezadas aquelas muito curtas ou muito longas, sendo o tamanho das raízes utilizado como um índice de toxicidade. Após a mensuração, foram cortadas, sendo 1,5 a 2,0 cm do ápice das raízes, em um total de três raízes por bulbo. Colocou-se em solução fixadora de Carnoy (etanol 99% ácido acético glacial– 3: 1 v/v) durante 24h e, após, em etanol 70%, conservando-se sob refrigeração até o momento da preparação histológica das lâminas. O teste foi conduzido em temperatura controlada de 20°C, sobre bancada sem vibrações e sem iluminação direta (FESKEJO, 1985).

## 2.4 Preparo das lâminas

Para o preparo das lâminas, duas a três raízes foram retiradas do etanol 70%, lavadas em água destilada (3 banhos de 5 min) e hidrolizadas em HCl 1N a 60°C por 8 minutos. Após, transferiu-se as raízes para frascos escuros (âmbar), contendo o reativo de Schiff (fuccina básica/metabissulfio de sódio – 3:1 p/p), por aproximadamente 2 horas. Com a pinça e a lâmina de bisturi, cortou-se a coifa (porção apical da raiz) aproximadamente 1 mm a 2 mm de comprimento, desprezando o restante da raiz. Adicionou-se duas gotas de carmim acético 2% e deixou-se corar durante 10 minutos. Logo em seguida as pontas das raízes foram transferidas para uma lâmina e uma lamínula foi então colocada sobre a lâmina. Realizou-se então o *squash* (esmagamento) com o dedo polegar, com razoável pressão. O material preparado foi então levado ao microscópio para observação, e posteriormente fotografado para melhor e mais eficiente leitura.

## 2.5 Análises tóxica, citotóxica e mutagênica

Um total de 1000 células por cada bulbo foram examinadas ao microscópio (objetiva de 100x com óleo de imersão). Os seguintes parâmetros foram observados: (a) índice mitótico (IM) (1000 células por lâmina); (b) aberrações cromossômicas (AC) no ciclo mitótico; e (c) presença de micronúcleo (MN) (2000 células por lâmina). O IM corresponde à relação do número de células em divisão e total de células observadas, em porcentagem, sendo analisada a presença de prófase, metáfase, anáfase e telófase. Para a análise de AC, vários tipos de aberrações cromossômicas soltas e fragmentos cromossômicos em todas as fases do ciclo celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase), além de pontes e atrasos anafásicos, sendo que todos os registros foram reunidos em uma só categoria para possibilitar a avaliação das AC como um único “*end point*”.

A avaliação da toxicidade será realizada pela medição do comprimento das

raízes.

## 2.6 Local do Estudo

A pesquisa foi realizada no laboratório de Ciências Farmacêuticas da Faculdade Santo Agostinho (FSA), Instituição de Ensino Superior na cidade de Teresina-Piauí, no ano 2016 a Março de 2017.

## 2.7 Amostra do Estudo

A amostra do estudo foram os frutos da planta *Lycium barbarum* (Goji Berry) que é uma planta semi-arbusta com folhas ovais e flores com pedúnculo longo de cor rosa com toque lilás pertencente à família solanaceae, seus frutos são ovais, vermelhos, quando maduros com muitas sementes pequenas finas e amareladas. O extrato aquoso dessas frutas (Goji Berry) foi a nossa amostra.

## 2.8 Amostragem do estudo

Segundo Cervo, 2007 amostragem é quando a pesquisa procura estabelecer generalizações a partir de observações em grupos ou conjuntos de indivíduos chamados de população ou universo. E amostragem é a coleta de dados de uma parte dessa população que selecionada segundo critérios que garantam sua representatividade.

A amostragem foi o extrato etanólico nas concentrações de 430, 215 e 107,5 mg/mL contendo 5 amostras para cada dose.

## 2.9 Análise Estatística

A análise estatística foi conduzida utilizando-se o programa graph prisma versão 5.0, por meio de estatística descritiva e ANOVA não paramétrica, com o teste de Tukey, para múltiplas comparações entre os grupos do sistema teste, com níveis de significâncias de \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,001$  e \*\*\* $P < 0,0001$ .

## 2.10 Critérios de Inclusão e Exclusão

Para escolha das cebolas, foram utilizados como critérios de inclusão : os bulbos de cebolas da espécie *Allium cepa* que apresentaram ( $2n=16$ ; diâmetro: 20 a 30 mm e peso: 5 a 10 g), com catafilos externos brancos, mesmas origens, não germinados e saudáveis. E foram excluídas as cebolas que não apresentaram essas características.

Para escolha e inclusão das raízes, foi levado em consideração seu estado de conservação, coloração características e as colhidas nos dias das análises. foi excluído qualquer outra parte da planta como: folha, caule ou flores; aparência estranha ou não com presença de objetos estranhos ou não.

### 3 | RESULTADOS

Grupo	Índice mitótico (células em divisão/1000)	Aberrações Cromossômicas					Células micronucleadas	Comprimento da raiz (cm)
		Pontes Anafásicas	Fragmentos Cromossômicos	Atrasos Anafásicos	Cromossomos Soltos	Frequência Total (%) <sup>d</sup>	(MN/1000)	
Controle Negativo <sup>a</sup>	80,90 ± 10,45	0,02 ± 0,04	0,08 ± 0,08	0,04 ± 0,05	0,02 ± 0,04	0,12 ± 0,08	0,02 ± 0,04	0,66 ± 0,25
Controle Positivo <sup>b</sup>	37,00 ± 8,07***	0,02 ± 0,04	0,06 ± 0,05	0,02 ± 0,04	0,48 ± 0,32*	0,96 ± 0,52*	0,48 ± 0,16*	0,32 ± 0,06***
GB 107,5 mg/mL	78,10 ± 3,41	0,00 ± 0,00	0,26 ± 0,36	0,04 ± 0,03	0,13 ± 0,11	0,22 ± 0,14	0,02 ± 0,04	0,60 ± 0,22
GB 215 mg/mL	52,08 ± 6,30***	NO	NO	NO	NO	NO	0,34 ± 0,18*	0,45 ± 0,11***
GB 430 mg/mL	50,15 ± 7,41***	NO	NO	NO	NO	NO	0,19 ± 0,08	0,36 ± 0,03***

Tabela 1. Índice mitótico, aberrações cromossômicas, micronúcleos e comprimento das raízes em espécimes de *Allium cepa* expostos, respectivamente, às concentrações de 430; 215 e 107,5 mg/mL do extrato hidroalcoólico das sementes de *Golgi berry*.

<sup>a</sup> Controle Negativo= água sem cloro; <sup>b</sup> Controle positivo= sulfato de cobre 0,0006 mg/mL; <sup>c</sup> GB= Golgi berry; <sup>d</sup> Incluindo pontes, fragmentos, cromossomos soltos e atrasos; NO = não observado; \* Diferença significativa em relação ao controle negativo ao nível de P<0,05; \*\* P<0,01 e \*\*\* P<0,001 (ANOVA).

### 4 | DISCUSSÃO

*Lycium barbarum* (goji Berry) é utilizado na medicina popular com finalidade terapêutica, sendo consumido na maioria das vezes, sem orientação de um profissional habilitado, o goji berry é utilizado principalmente como suplementos alimentares, chás, ingestão de bagas *in natura* e mais recentemente consumo de comprimidos e capsula para emagrecimento, devido a facilidade de acesso, os consumidores acabam por não levar em conta possíveis riscos que a mesma pode causar, tais como efeitos colaterais leves até toxicidade, mutagenicidade, citotoxicidade e genotoxicidade.

Diante disso, realizou-se o teste *Allium cepa* com o extrato etanólico do *Lycium barbarum*, na concentrações de 430, 215 e 107,5 mg/mL, além do controle positivo sulfato de cobre 0,0006 mg/mL e controle negativo água sem cloro, para cada concentração haviam 5 organismos teste.

Como pode ser observado na Tabela 1 o controle positivo foi estatisticamente diferente do controle negativo em relação ao índice mitótico, comprovando que houve toxicidade do controle positivo. O IM constitui um parâmetro importante para a avaliação da toxicidade celular de diversas substâncias, onde a citotoxicidade de determinado agente químico pode ser determinada pelo aumento ou pela diminuição do IM. A redução significativa do IM em relação ao controle negativo pode indicar alterações, derivadas da ação química do agente sobre o crescimento e desenvolvimento do

organismo exposto (Hoshina, 2002). De acordo com Turkoglu (2008), a diminuição do IM pode ser devida a uma inibição da síntese do DNA ou a um bloqueio da Fase G<sub>2</sub> do ciclo celular, impedindo que a célula entre em divisão celular

No teste realizado a análise do tamanho das raízes dos bulbos expostos foi condizente com a inibição do IM, o que vem a constatar que o crescimento das raízes sofre influencia direta da inibição do IM. Desta forma, tais parâmetros sugerem indícios de toxicidade e citotoxicidade celular para o controle positivo (sulfato de cobre 0,0006 mg/mL) e para as doses de 215 e 430 mg/mL o que indica que tais doses interferem no processo de síntese do DNA.

Para a dose de 107,5 mg/mL, não foi observado toxicidade, pois não apresentou alterações significativas no comprimento das raízes, não se mostrou citotóxica por que não houve alterações no índice mitótico.

Os resultados encontrados para as diferentes Aberrações Cromossômicas (AC) estão expressos na Tabela 1. Nas análises, foram consideradas como AC: cromossomos soltos e fragmentos cromossômicos em todas as fases do ciclo celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase), além de pontes e atrasos anafásicos. Pontes de cromossomo ou conexões intercromátides são formadas por fibras de cromatina que unem cromátides irmãs na metáfase e as mantém juntas até a anáfase ou telófase. (Liu et al., 1996). Cromossomo em atraso são resultantes de uma falha no deslocamento para um dos pólos da célula. Cromossomos soltos podem ser resultado de cromossomos inteiros, com origem aneugênica, que permaneceram como retardatários. Fragmentos podem ser oriundos da ação de agentes químicos que induzem quebras cromossômicas (clastogênicos) e sua interferência nos cromossomos está associada a quebras na molécula de DNA. (Turkoglu, 2008).

O teste revelou diferenças estatísticas das concentrações de 215 e 430 mg/mL em relação ao controle negativo, demonstrando inibição do índice mitótico e do crescimento das raízes. Nessas concentrações não foi possível a análise da frequência de aberrações cromossômicas, uma vez que elas foram extremamente tóxicas e citotóxicas, de forma a inibir o ciclo celular e impossibilitar a ocorrência de ACs, ou seja em todos os parâmetros avaliados foi evidenciado diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, sendo considerado essa concentrações genotóxicas, tóxicas e citotóxicas e mutagênicas.

A análise da frequência de aberrações mitóticas tem se destacado como marcador de danos ao material genético mais utilizado em *A. cepa*. A presença dessas alterações celulares não significa obrigatoriamente a ocorrência de danos permanentes na célula, uma vez que podem ser alvo de sistemas enzimáticos que garantem a integridade do genoma da célula. Já os micronúcleos, que também são alterações que ocorrem na composição cromossômica da célula, são posteriores à ação dos mecanismos de proteção do genoma celular e têm, portanto, caráter irreversível (Leme e Marin-Morales, 2009 e Ma et al., 1995).

A formação de micronúcleos é extensivamente usada em epidemiologia

molecular como um biomarcador de danos nos cromossomos, instabilidade genética e eventualmente risco de câncer. A ocorrência dos micronúcleos representa uma resposta integrada de instabilidade de cromossomos, fenótipos e alterações celulares causadas podem defeitos genéticos e ou exposição exógena a agentes genotóxicos, refletindo inúmeras alterações cromossômicas importantes para a carcinogênese. (Fenech, 2000 e Fenech, 2006).

Ainda em relação as aberrações cromossômicas na dose de 107,5 mg/mL não houve diferença estatísticas dos cromossomos soltos e frequência total não tendo um indicando de genotoxicidade, a não formação de micronúcleos confirmou que não se tratava de uma concentração com caráter mutagênico.

Dessa forma, o sistema de teste *Allium cepa* revelou citotoxicidade para as doses de 215 e 430 mg/mL ( $P < 0,0001$ ), onde a inibição do IM foi tão evidente que impossibilitou a visualização de ACs, e mutagênicidade. Para a dose de 107,5 mg/mL não observou-se aumento nas frequências de ACs e MNs, ou seja, em nenhum dos parâmetros avaliados a concentração de 107,5 mg/mL apresentou diferença estatística em relação ao controle negativo.

Deste modo fica evidente que, quanto maior a dosagem utilizada do extrato, mais efeitos tóxicos o organismo sofre, sendo assim o *Lycium barbarum* pode trazer efeitos indesejáveis quando utilizado de forma inadequada, ou seja em altas dosagem e sem auxílio de um profissional de saúde habilitado.

Por tudo isso, verifica-se que é necessário estudos complementares, como estudos não clínicos de segurança são eles estudos de toxicidade de dose única (Aguda), toxicidade de doses repetidas, toxicidade reprodutiva, tolerância local e carcinogenicidade além de estudos de interesse na avaliação da segurança toxicocinética (Administração, Distribuição, Metabolismo e Excreção – ADME) no sentido de confirmação dos resultados e elucidação dos possíveis mecanismos geradores dos danos.

## 5 | CONCLUSÃO

De acordo com os resultados pode se constatar que o *Lycium barbarum* (goji berry) em concentrações elevadas como as de 215 e 430 mg/mL apresentam genotoxicidade, toxicidade, citotoxicidade e mutagênicas evidente. Porém na dose de 107,5 mg/mL não apresenta toxicidade. Nessas condições, verifica-se que o Goji Berry só demonstra toxicidade em altas concentrações, porém alguns estudos complementares tornam-se viáveis, no sentido de confirmação dos resultados e elucidação dos possíveis causadores dos danos.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, V. *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não

específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.

BAGATINI, D.M.; *et al.* Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy** 17(3): 444-447 Jul./Set. 2007

BAGATINI, M.D. *et al.* 2009. Cytotoxic effects of infusions (tea) of *Solidago microglossa* DC. (Asteraceae) on the cell cycle of *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**.19(2B): 632-636, Abr./Jun. 2009.

BELCAVELLO, L. Citotoxicidade e danos ao DNA induzidos pelo extrato de *Zornia diphylla*, uma planta medicinal. **Natureza on line** 10 (3): 140-145.

BERTANZA, G.E.; PEDRAZZANI, R. The influence of different disinfectants on mutagenicity and toxicity of urban wastewater. **Water Research**, Londres, v. 34, n.17, p. 4261-4269, 2000.

BONASSI S, A. *et al.* An increased micro-nucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans, **Carcinogenesis**. 2007, vol. 28, pp. 625–631.

BUCKLIN B., *et al.* Pharmacokinetics and dynamic studies of intrathecal, epidural and intravenous dexmedetomidine. **Anesthesiology**, 1991, vol. 75, n. 3, pp. 662.

CALIXTO, J.B. IN YUNES, R.A. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Argos.Chapecó, p.297-315, 2001

CAVAZIM, P. F.; FREITAS, G. **As propriedades antioxidativas do goji Berry no auxílio à melhora do centro de acuidade visual, com abordagem em tratamentos da retinopatia diabética**. Revista UNINGÁ Review, vol.20,n.2, p.55-60, 2014.

COSTA, R.M.A; MENK, C.F.M. Biomonitoramento de Mutagênese Ambiental. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento** 12: 24-26, 2000

FERREIRA, G. F.; *et al.* Avaliação de mutagenicidade e antimutagenicidade de diferentes frações de *Pterogyne nitens* (Leguminosae), utilizando ensaio de micronúcleo em *Tradescantia pallida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Brazilian Journal of Pharmacognosy 19(1A): 61-67, Jan./Mar. 2009.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 2000. Vol.455. n.1-2. pp.81-95.

FESKEJÖ, G. **The Allium test as standard in environmental monitoring**. Hereditas 102, 99-112, 1985.

FISKESJÖ, G. Allium test I: A 2-3 day plant test for toxicity assessment by measuring the mean root growth of onions (*Allium cepa* L.). **Environmental Toxicology and Water Quality**. Nova lorque, v. 8, n. 4, p. 461–470, 1993.

HOSHINA, M.M. Avaliação da possível contaminação das águas do Ribeirão Claro - município de Rio Claro, pertencente à bacia do rio Corumbataí, por meio de testes de mutagenicidade em *Allium cepa*, Trabalho de conclusão (Bacharel e Licenciatura - Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2002, 52 p.

IGANACI, J.R.V. *et al.* Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo sobre a germinação e índice mitótico de *Allium cepa* L. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.73, n.1, p.79-82, jan./mar., 2006

KOVALCHUK, O. *et al.* The *Allium cepa* chromosome aberration test reliably measures genotoxicity of soils of inhabited areas in the Ukraine contaminated by the Chernobyl accident. **Mutat. Res.** 415,

47–57. 1998.

LEITE, H.P.; SARNI, R.S. Radicais livres, antioxidantes e nutrição. *Rev. Bras. Nutr. Clín.*, v.18, n.2, p.60-65, 2003

LIMA, E.O.; *et al.* *Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae): atividade antimicrobiana de seu óleo essencial.

MARTINS, G. S. *et al.* Toxicidade do Goji Berry (*Lycium barbarum*). *Revista UNINGÁ*. v. 20, n.1, p.87-91, 2014.

NETO, M. P. L. Avaliação tóxica, citotóxica, genotóxica e mutagênica do composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil) – imidazolidina-2,4-diona em células eucarióticas. **UFPI**, Teresina, 2011.

SILVA, F.S.; ANTUNES, R. M. P.; CATÃO, R. M. R. Avaliação da Atividade Antibacteriana de Extratos de *Annona muricata* L. (Annonaceae). *Revista de Biologia e Farmácia*, v. 06, n. 2, p. 27-36, 2011.

## AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO RASTREIO DA TOXOPLASMOSE DURANTE A GESTAÇÃO EM RORAIMA

### **Jéssyca Magalhães de Matos**

Universidade Federal de Roraima, Curso de  
Medicina  
Boa Vista – Roraima

### **Wagner do Carmo Costa**

Governo do Estado de Roraima, Vice-  
governadoria  
Boa Vista – Roraima

### **Ana Iara Costa Ferreira**

Universidade Federal de Roraima, Curso de  
Medicina  
Boa Vista – Roraima

### **Fabiana Nakashima**

Universidade Federal de Roraima, Curso de  
Medicina  
Boa Vista – Roraima

### **Leila Braga Ribeiro**

Universidade Federal de Roraima, Curso de  
Medicina  
Boa Vista – Roraima

### **José Geraldo Ticianeli**

Universidade Federal de Roraima, Curso de  
Medicina  
Boa Vista – Roraima

### **Camila Sampaio Florença Santana**

Universidade Federal de Roraima, Curso de  
Medicina  
Boa Vista – Roraima

### **Allaelson dos Santos de Morais**

Universidade Federal de Roraima, Curso de  
Medicina

Boa Vista – Roraima

### **Gabriela Moraes Gomes**

Universidade Federal de Roraima, Curso de  
Medicina  
Boa Vista – Roraima

### **Fernanda Zambonin**

Universidade Federal de Roraima, Programa de  
Pós-graduação em Ciências da Saúde  
Boa Vista – Roraima

### **Bianca Jorge Sequeira**

Universidade Federal de Roraima, Curso de  
Medicina e Programa de Pós-graduação em  
Ciências da Saúde  
Boa Vista – Roraima

**RESUMO:** Este estudo objetiva avaliar o rastreamento para toxoplasmose em gestantes atendidas no Hospital Materno Infantil Nossa Senhora de Nazareth no período de dezembro de 2018 a janeiro de 2019. Trata-se de um estudo transversal, descritivo, de caráter quantitativo, realizado através da avaliação do cartão de pré-natal de 300 puérperas, que tiveram seu parto realizado no Hospital Materno Infantil Nossa Senhora de Nazareth (HMINSN), entre julho de 2018 e janeiro de 2019. As análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas Microsoft Excel e EpiInfo 7®. Os resultados apontam que 95% das participantes realizou acompanhamento pré-natal, sendo

79% brasileiras, 18,7% venezuelanas e 2,3% nascidas na Guiana Inglesa. Quanto ao número de consultas, 66,3% realizou 6 ou mais consultas, 28,4% realizou entre 3 e 5 e 5,3% apenas 1 ou 2 consultas. Acerca da realização da sorologia para pesquisa de toxoplasmose durante o pré-natal, 74,7% a realizou, enquanto 25,3% das mulheres não realizou tal diagnóstico. Ao levar em consideração também as mulheres sem pré-natal esse valor sobe para 29%. Quanto aos resultados, 62,4% era IgM não reagente e IgG reagente para toxoplasmose e 37,6% era IgM e IgG não reagentes e entre elas somente 46,2% receberam informações sobre a susceptibilidade. Houve associação entre nacionalidade e realização do pré-natal, entre nacionalidade e realização da sorologia para toxoplasmose e entre local de realização do pré-natal e a realização da sorologia para toxoplasmose. Conclui-se que a qualidade do rastreamento da toxoplasmose, durante a gestação, para a amostra analisada é ruim, podendo provocar graves sequelas para o conceito.

**PALAVRAS-CHAVE:** Toxoplasmose; Pré-natal; Rastreamento

**ABSTRACT:** This study aim is to evaluate the screening for toxoplasmosis in pregnant women attended at the Hospital Materno Infantil Nossa Senhora de Nazareth from December 2018 to January 2019. This is a cross-sectional, descriptive, quantitative study conducted through the evaluation of the card of prenatal care of 300 puerperal women who had their delivery performed at the Hospital Materno Infantil Nossa Senhora de Nazareth (HMINSN) between July 2018 and January 2019. Statistical analyzes were performed using the Microsoft Excel and EpiInfo 7® programs. The results indicate that 95% of the participants performed prenatal care, of which 79% were Brazilian, 18.7% Venezuelan and 2.3% were born in English Guiana. Regarding the number of consultations, 66.3% held 6 or more consultations, 28.4% held between 3 and 5 and 5.3% only 1 or 2 consultations. Regarding the serology for toxoplasmosis screening during prenatal care, 74.7% performed it, while 25.3% of the women did not perform such a diagnosis. When taking into consideration also the women without prenatal this value rises to 29%. Regarding the results, 62.4% were non-reactive IgM and IgG reagent for toxoplasmosis and 37.6% were non-reactive IgM and IgG and among them only 46.2% received information on susceptibility. There was an association between nationality and prenatal accomplishment, between nationality and the accomplishment of serology for toxoplasmosis and between place of prenatal accomplishment and the accomplishment of serology for toxoplasmosis. It is concluded that the quality of the toxoplasmosis screening during pregnancy for the analyzed sample is poor and can lead to severe sequelae for the concept.

**KEYWORDS:** Toxoplasmosis; Prenatal; Tracking

## 1 | INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). As 3 principais vias de transmissão são a ingestão de carnes cruas ou mal cozidas

contaminadas com cistos do parasita, contato com fezes de gato infectado (hospedeiro primário) e transmissão vertical. A toxoplasmose possui distribuição geográfica mundial e alta prevalência sorológica. Nos Estados Unidos, 15% das mulheres em idade fértil (15 a 44 anos) estão infectadas com *T. gondii*, com a incidência da toxoplasmose congênita estimada em 400 a 4000 casos por ano (PAQUET; YUDIN, 2018). No Brasil, 50 a 80% das gestantes e mulheres em idade fértil já foram contaminadas e 4 a 5% correm risco de se infectar (MITSUKA-BREGANÓ; LOPES-MORI; NAVARRO, 2010; BRASIL, 2011; FALLAHI et al., 2017).

Noventa por cento das infecções são assintomáticas, todavia, podem manifestar-se como formas clínicas graves, tal como ocorre na forma congênita, que resulta de uma infecção primária durante a gestação. A parasitemia aguda por *T. gondii* durante a gravidez leva ao risco de transmissão vertical e acometimento fetal. Os danos estão relacionados com a virulência da cepa do parasita, a capacidade da resposta imune da mãe e o período gestacional em que a mulher se encontra, tendo maior frequência e menor gravidade da doença com o aumento da idade gestacional (FALLAHI et al., 2017; PAQUET; YUDIN, 2018).

Entre os agravos anatômicos e funcionais decorrentes da toxoplasmose congênita, podem ser descritos morte fetal, abortamento, restrição do crescimento intrauterino, prematuridade e/ou manifestações clínicas e sequelas como coriorretinite, hidrocefalia, calcificações intracranianas, déficit auditivo, convulsões, epilepsia, fluido cefalorraquidiano anormal, abaulamento da fontanela, nistagmo, microcefalia, microftalmia, pneumonite, hepatoesplenomegalia, erupção cutânea, restrição do crescimento e retardo mental (BRASIL, 2012; MONTENEGRO; REZENDE FILHO, 2013; FILHO et al., 2017; MALDONADO; READ, 2017; KHAN; KHAN, 2018).

O Ministério da Saúde do Brasil recomenda, principalmente em lugares onde a prevalência da doença é elevada, a realização da triagem sorológica durante o pré-natal, baseada quase que essencialmente na detecção de anticorpos de classe IgG e IgM. A sorologia deve ser realizada no primeiro trimestre de gestação e ser repetida no decorrer da gravidez ou complementada com outros exames conforme a necessidade e de acordo com os resultados posteriores. O objetivo central do rastreamento é a identificação de grávidas suscetíveis à contaminação para acompanhamento e prevenção (BRASIL, 2011; BRASIL, 2012; CAPOBIANGO et al., 2016).

Considerando o tema um problema de saúde pública e a escassez de pesquisas regionais, este estudo pretende avaliar a forma e a eficácia do rastreio da toxoplasmose entre as gestantes e quantificar a prevalência e susceptibilidade à doença baseada no atendimento da única maternidade pública do estado de Roraima. Também é válido avaliar o impacto da crescente imigração venezuelana na composição de tal perfil epidemiológico.

## 2 | METODOLOGIA

Trata-se de um estudo transversal, descritivo, de caráter quantitativo, realizado através da avaliação do cartão de pré-natal de 300 puérperas, maiores de 18 anos, que tiveram seu parto realizado no Hospital Materno Infantil Nossa Senhora de Nazareth (HMINSN), instituição componente do Sistema Único de Saúde (SUS), localizada na cidade de Boa Vista, capital do estado de Roraima. O recrutamento das participantes da pesquisa e a coleta de dados foram realizados no período de julho de 2018 e janeiro de 2019, na ala do puerpério (Ala das Rosas) do HMINSN.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas Microsoft Excel e EpilInfo 7®, fixando-se o nível de 5% para a rejeição da hipótese de nulidade. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Roraima e todas as participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

## 3 | RESULTADOS

Do universo amostral de 300 puérperas participantes do estudo, 285 delas realizou o acompanhamento pré-natal, o que corresponde a 95% do total amostral, participando de no mínimo uma consulta, enquanto 15 mulheres não realizaram nenhuma consulta ou exame pré-natal (5%). Já com relação a nacionalidade, 237 (79%) eram brasileiras, seguido de 56 (18,7%) venezuelanas e 7 (2,3%) nascidas na Guiana Inglesa.

No tocante ao período de início do pré-natal (Figura 1), 203 (71,2%) participantes relataram ter iniciado entre a primeira e a décima terceira semana de gestação, 73 (25,6%) entre a décima quarta e a vigésima sexta semana e por fim 9 puérperas afirmaram ter iniciado o acompanhamento pré-natal somente entre a vigésima sétima e a quadragésima semana de gestação (3,2%).

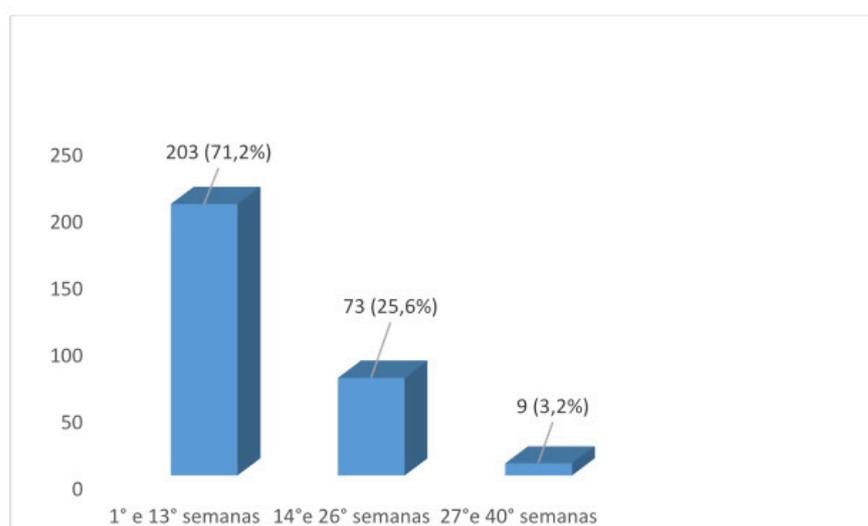


Figura 1. Período de início do pré-natal das puérperas que tiveram o parto realizado no Hospital Materno Infantil Nossa Senhora de Nazareth/ SUS-Roraima.

Dentre as 285 participantes do estudo que afirmaram ter realizado acompanhamento pré-natal, já que 15 participantes não se submeteram a nenhuma consulta durante a gestação, a maioria delas (189/66,3%) informou ter realizado seis ou mais consultas durante a gravidez, seguidas de 81 (28,4%) que realizaram entre três e cinco consultas e 15 (5,3%) que relataram ter sido submetidas a apenas uma ou duas consultas durante toda a gestação (Figura 2).

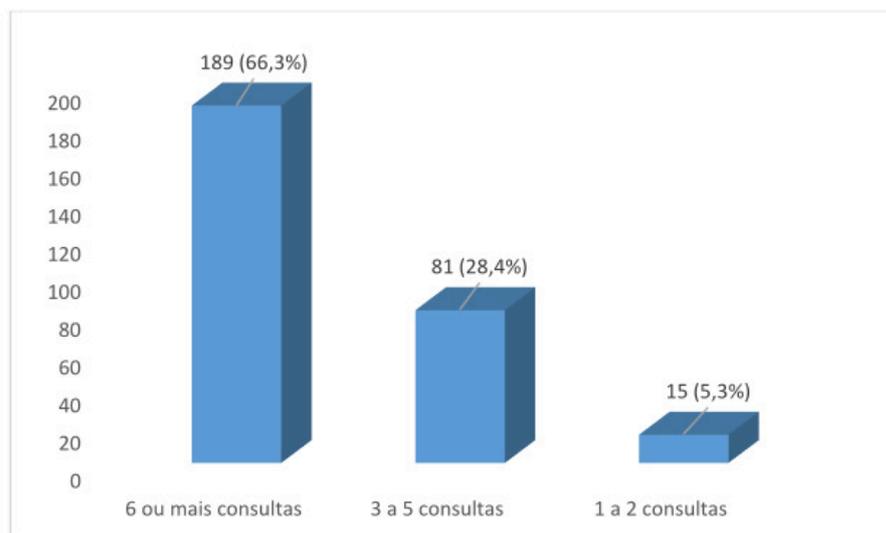


Figura 2. Número de consultas de pré-natal realizadas pelas puérperas que tiveram o parto realizado no Hospital Materno Infantil Nossa Senhora de Nazareth/ SUS-Roraima.

Com relação ao local de realização do acompanhamento pré-natal, 263 (92,3%) participantes realizaram todo seu pré-natal na rede pública de saúde, sendo atendidas nas Unidades Básicas de Saúde, enquanto 19 (6,7%) participantes foram atendidas em instituições particulares de saúde e 3 (1%) em outros tipos de instituições não especificadas.

No que se refere a realização da sorologia para pesquisa de toxoplasmose durante o pré-natal, foi evidenciado neste estudo que dentre as 285 participantes que tiveram acompanhamento pré-natal, 213 (74,7%) realizaram a sorologia, enquanto 72 (25,3%) não realizaram tal diagnóstico (Figura 3). Ao levar em consideração o total de participantes da pesquisa (300), incluindo as 15 mulheres que não tiveram nenhum acompanhamento pré-natal, observa-se que 87 participantes não realizaram sorologia para toxoplasmose, o que corresponde a 29% do universo amostral.

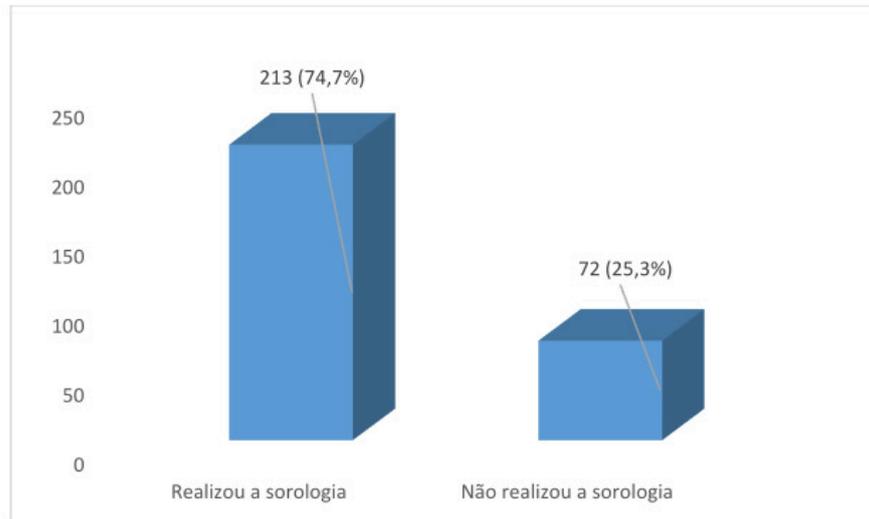


Figura 3. Número de puérperas que tiveram o parto realizado no Hospital Materno Infantil Nossa Senhora de Nazareth/ SUS-Roraima que realizaram ou não sorologia para toxoplasmose durante a gestação

Dentre as 72 participantes que receberam acompanhamento pré-natal, mas não realizaram a sorologia para toxoplasmose, quando questionadas sobre o motivo da não realização de tal exame, 20 (27,8%) delas afirmaram não ter realizado porque nenhum profissional de saúde o solicitou, 32 (44,4%) alegaram dificuldade de acesso ao local de realização do exame, enquanto 20 (27,8%) delas afirmaram não ter tido interesse em realizar a sorologia, apesar da mesma ter sido solicitada por um profissional de saúde durante o pré-natal (Figura 4).

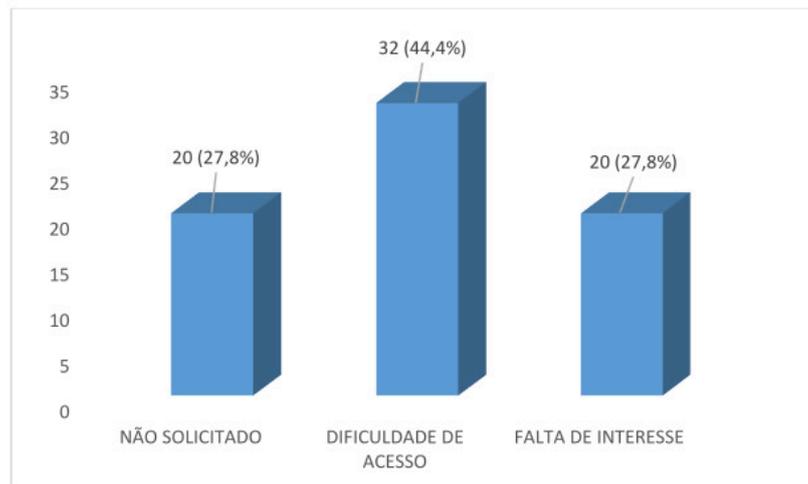


Figura 4. Motivos da não realização da sorologia para toxoplasmose das puérperas que tiveram o parto realizado no Hospital Materno Infantil Nossa Senhora de Nazareth/ SUS-Roraima

Das 213 participantes que realizaram a sorologia para toxoplasmose a maioria (113/53,1%) realizou entre a primeira e a décima terceira semana de gestação, seguidas de 84 (39,4%) que realizaram entre a décima quarta e a vigésima sexta semana e 16 (7,5%) entre a vigésima sétima e a quadragésima semana. Dos resultados obtidos a

partir da sorologia, tem-se que 133 (62,4%) participantes eram IgM não reagentes e IgG reagentes para toxoplasmose, enquanto 80 (37,6%) eram IgM e IgG não reagentes, caracterizando-se este último grupo como suscetíveis à infecção por toxoplasmose.

Dentre as 80 puérperas caracterizadas como suscetíveis, a partir do resultado da sorologia para toxoplasmose, 37 (46,2%) receberam informações sobre a patologia, enquanto 43 (53,8%) não receberam nenhum tipo de informação acerca da doença ou de sua prevenção. Ainda relativo ao grupo das participantes consideradas suscetíveis, 16 (20%) repetiram a sorologia para toxoplasmose entre a décima quarta e a vigésima sexta semana de gestação, 21 (26,2%) entre a vigésima sétima e a quadragésima semana e 43 (53,8%) não repetiram a sorologia durante a gestação. Das 37 participantes suscetíveis que repetiram a sorologia, 35 continuaram IgM e IgG não reagentes (94,6%), enquanto 2 (5,4%) tiveram o status alterado para IgM não reagente e IgG reagente. Entretanto, nenhuma destas duas participantes, foi submetida ao teste de avidéz para IgG.

Ao realizar o teste qui-quadrado fixando o nível de 5% para a rejeição da hipótese de nulidade, foi evidenciada associação significativa entre as variáveis nacionalidade e realização do pré-natal ( $p = 0,01$ ), de modo que ser estrangeira (Guianense e Venezuelana) foi considerado um fator associado a não realização de nenhuma consulta pré-natal, entre a nacionalidade e a realização da sorologia para toxoplasmose ( $p = 0,01$ ), já que ser estrangeira também se mostrou um fator associado a não realização da sorologia para a toxoplasmose e por fim, foi evidenciada uma associação estatisticamente significativa entre o local de realização do pré-natal e a realização da sorologia para toxoplasmose ( $p=0,01$ ), já que ter realizado o pré-natal nas Unidades Básicas do SUS se configurou como um fator associado a não realização da sorologia para a toxoplasmose. Convém ressaltar que em relação ao local de realização do pré-natal, foram contabilizadas somente 282 participantes, já que 8 delas não sabia informar onde havia realizado o pré-natal. Estas 8 participantes eram naturais da Guiana Inglesa.

#### 4 | DISCUSSÃO

Os achados deste estudo apontam os reflexos da imigração no perfil das pacientes atendidas na Maternidade referência do estado de Roraima. A porcentagem significativa de venezuelanas (18,7%) no total amostral é coerente com o aumento dessa população no estado, que faz fronteira terrestre com a Venezuela, país que atualmente vivencia uma grave crise política e econômica. Além disso, destaca-se a fragilidade desse grupo em relação ao acesso à assistência pré-natal e a realização de sorologia anti- *T. gondii*, o que condiz com as dificuldades sociais enfrentadas por grande parte desses indivíduos.

Evidenciou-se também neste trabalho a importância e a diferença existentes

entre os aspectos quantitativo e qualitativo da assistência durante a gravidez. Neste contexto, a presente pesquisa aponta que Roraima possui alta taxa de atendimento, com 95% do conjunto amostral recebendo assistência pré-natal e 66,3% do total das participantes realizando 6 ou mais consultas. Entretanto, corrobora os resultados produzidos por Nunes et al. (2016), ao afirmarem que houve aumento da cobertura da atenção pré-natal ao longo dos últimos dez anos em quase todo o Brasil, a despeito da qualidade, haja visto o pré-natal caracterizar-se por elevado nível de inadequação.

Convém citar que 71,2% das participantes relatou ter iniciado o pré-natal no primeiro trimestre de gestação, 25,6% entre a décima quarta e a vigésima sexta semana e por fim 3,2% somente entre a vigésima sétima e a quadragésima semana de gestação. Resultado compatível com estudo realizado no Rio de Janeiro, o qual apontou que 25% das gestantes iniciou o acompanhamento pré-natal tardiamente (DOMINGUES et al., 2012). A literatura aponta que o início precoce (primeiro trimestre) da assistência pré-natal permite o acesso a métodos diagnósticos e terapêuticos para diversas patologias com repercussões graves para a saúde da mulher e do bebê, como a toxoplasmose (MALTA et al., 2010).

Destacam-se como fatores que contribuem para a baixa qualidade da atenção pré-natal no Brasil a não realização de procedimentos básicos recomendados, de orientações e prescrições durante a consulta ou de exames laboratoriais de rotina, como o rastreio da toxoplasmose por sorologia (BRASIL, 2012). Convém ressaltar que durante a análise do cartão de pré-natal das participantes do estudo, evidenciou-se que Roraima segue a mesma tendência do restante do Brasil, ou seja, a baixa qualidade da assistência pré-natal.

No tocante a realização da sorologia anti- *T. gondii*, dentre as participantes que receberam assistência pré-natal, 74,7% a realizou, contrapondo 25,3% que não se submeteu ao exame, mesmo sendo conduzidas por profissionais de saúde. Ao somar-se a este resultado as participantes que não realizaram pré-natal, a porcentagem de mulheres que não realizou a sorologia para toxoplasmose atinge 29% do universo amostral. Esta lacuna na rastreabilidade é preocupante, devido à gravidade da doença para o conceito. Um estudo realizado no Paraná entre os anos 2013 e 2014, encontrou 64 casos ativos de toxoplasmose na gestação (CAPOBIANGO et al., 2016). Já em Minas Gerais, no ano de 2014, foi evidenciado que 0,8% das gestantes pesquisadas estava em fase ativa da doença, enquanto no Maranhão esse percentual foi de 0,9% no mesmo período (CÂMARA; SILVA; CASTRO, 2015).

Desta forma, um bom rastreio, o conhecimento da taxa de gestantes soronegativas e das características epidemiológicas de cada região são muito importantes para planejar programas de prevenção e assistência pré-natal e neonatal da toxoplasmose (ALVES et al., 2009).

O presente estudo evidenciou que 72 participantes que receberam acompanhamento pré-natal, não realizaram a sorologia para toxoplasmose, dentre elas, 44,4% relatou dificuldade de acesso ao local de realização do exame, 27,8% delas

afirmou não ter realizado porque nenhum profissional de saúde o solicitou e 27,8% afirmou falta de interesse em realizar a sorologia, apesar da mesma ter sido solicitada por um profissional de saúde durante o pré-natal. Com relação a dificuldade de acesso aos locais de realização do exame, entre os principais fatores limitantes pode-se citar a distribuição geográfica dos laboratórios, a disponibilidade organizacional das vagas e características individuais como local de moradia, transporte e renda (BRASIL, 2012; NUNES et al., 2016).

Quanto a ausência da solicitação do profissional de saúde para que a gestante realizasse a sorologia para toxoplasmose, isto pode estar relacionado ao baixo conhecimento de muitos profissionais acerca da interpretação dos resultados deste exame. Um estudo realizado no Rio de Janeiro, onde os participantes eram médicos e enfermeiros que atuavam na Atenção Básica, apontou que muitos profissionais não sabiam interpretar os resultados dos testes sorológicos, o que poderia levar a erros de conduta e comprometer a saúde da mãe e do feto. Além disto, apenas um quinto dos profissionais sabia que uma baixa avidéz de IgG poderia auxiliar na confirmação da fase aguda da infecção e somente 66,7% sabiam que os anticorpos anti-*T. gondii* IgM indicam uma infecção recente (DE MOURA et al., 2017). Em outro estudo realizado no estado do Paraná, médicos e enfermeiros também relataram dificuldade em interpretar os resultados sorológicos, principalmente ao diferenciar IgM de IgG (CONTIERO-TONINATO et al., 2014).

A falta de conhecimento de alguns profissionais pode resultar na qualidade ruim da assistência pré-natal, o qual, quando bem conduzido, é um fator essencial na proteção e prevenção à eventos adversos sobre a saúde obstétrica, possibilitando a identificação e o manuseio clínico de intervenções oportunas. Dessa forma, a não realização ou a realização inadequada dessa assistência tem sido relacionada a maiores índices de morbimortalidade materna e infantil (BRASIL, 2006).

Já, com relação a falta de interesse das gestantes acerca da realização da sorologia, apesar da mesma ter sido solicitada por um profissional de saúde durante o pré-natal, motivos como faixa etária, escolaridade e nível socioeconômico devem ser levados em consideração assim como uma possível falha na comunicação entre o profissional de saúde ao enfatizar a importância do diagnóstico da toxoplasmose (LEHMANN; SANTOS; SCAINI, 2016). Entretanto, não foi possível analisar essa possível correlação no presente estudo, haja visto o mesmo não ter envolvido a coleta de dados sociodemográficos.

Assim sendo, a prevenção primária deve ser alicerçada em programas educacionais para grávidas, principalmente as soronegativas, visando motivar a prevenção da infecção materna com acesso a informação (CONTIERO-TONINATO et al., 2014; NUNES et al., 2016). Já a prevenção secundária tem por objetivo a detecção precoce da toxoplasmose por meio de rastreio sorológico para identificar e tratar a infecção aguda durante a gravidez, e para reduzir a transmissão materno-fetal ou sequelas graves em lactentes (BARRIOS et al., 2016; CORTESA et al., 2017).

Na Bélgica, país em que a prevenção tem sido bem aplicada, a soroconversão materna foi reduzida em 60,3%. Na França, a prevalência da toxoplasmose em gestantes foi reduzida após a implementação de programas educativos de controle que foram estrategicamente destinados às mulheres grávidas soronegativas. O Brasil, porém, ainda enfrenta vários desafios na prevenção da toxoplasmose em grávidas soronegativas devido a fatores como a extensão do território, a dificuldade de implementação de programas, além de vários fatores epidemiológicos e diferenças culturais entre as diversas regiões do país (CONTIERO-TONINATO et al., 2014).

Quanto ao resultado da sorologia, em Roraima, 37,6% das participantes foi caracterizada em seu cartão pré-natal, como IgM e IgG não reagentes, definindo esse conjunto como susceptível à infecção. Desse grupo, 53,8% não receberam nenhum tipo de informação acerca da doença ou da prevenção, evidenciando assim uma falha na prevenção primária. Em estudo realizado com grávidas em Minas Gerais, o percentual de suscetibilidade encontrado foi de 54% (NASCIMENTO; PACHECO; DE SOUSA, 2017). Por outro lado, esses resultados são bem mais elevados do que o percentual de suscetibilidade encontrado entre as mulheres italianas, o qual corresponde a 22,1%, provavelmente por tratar-se de um país desenvolvido, onde a população vivencia melhor nível educacional e cenário socioeconômico mais favorável (MERONI; GENCO, 2010).

A toxoplasmose apresenta elevada prevalência sorológica (IgM negativo e IgG reagente). No Brasil estudos demonstram que a soroprevalência dessa doença na população geral varia de 40% a 80%, destacando-se o Mato Grosso do Sul com 91,6%, Pernambuco com soroprevalência de 74,7% e Rio Grande do Norte com 66,3% (FIGUERÓ-FILHO et al., 2005; BARBOSA; HOLANDA; ANDRADE-NETO, 2009). No ano de 2013, a prevalência sorológica para toxoplasmose na cidade de Divinópolis/ Minas Gerais foi de 45% e no ano seguinte baixou para 38% (NASCIMENTO; PACHECO; DE SOUSA, 2017).

Em Roraima, não existem estudos anteriores sobre o tema e a prevalência sorológica encontrada a partir deste estudo se mostrou similar ao esperado na população geral correspondendo a 62,4% da amostra total pesquisada, não havendo identificação de nenhum caso de infecção aguda comprovada ou suspeita (IgM reagente e IgG negativo ou IgM reagente e baixo índice de avidéz do IgG) no período estudado (TOMASONI et al., 2018; OLARIU et al., 2019).

Houve associação estatisticamente significativa entre a nacionalidade, no caso ser estrangeira (Venezuelana e Guianense), e não ter realizado acompanhamento pré-natal e entre ser estrangeira e não ter feito a sorologia para toxoplasmose, fato que expõe a fragilidade e a deficiência que o sistema de saúde venezuelano vivencia atualmente em virtude da grave crise econômica e política que o país atravessa, bem como a precariedade da atenção em saúde na Guiana Inglesa, fazendo com que as grávidas desses países migrem muitas vezes para Roraima para a realização do parto.

Além disto, também houve associação significativa entre ter feito acompanhamento

pré-natal na rede pública de saúde e não ter feito a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*, evidência que aponta que o Sistema Único de Saúde em Roraima, bem como a assistência em saúde dos países vizinhos, Venezuela e Guiana Inglesa, não estão conseguindo oferecer às mulheres um rastreio adequado da toxoplasmose, configurando assim um pré-natal de baixa qualidade.

Na França, um programa de rastreio está em vigor desde 1992, e as mulheres grávidas com sorologia negativa são testadas mensalmente até o parto o que notavelmente diminuiu a soroprevalência de 83% em 1965 para 37% em 2010 (PEYRON et al., 2017). Em Londrina, Paraná, após a implementação de um programa de controle de toxoplasmose congênita, observou-se uma redução de 63% no número de mulheres grávidas infectadas e uma redução de 42% no número de crianças encaminhadas para o serviço de referência (LOPES-MORI et al., 2011; CAPOBIANGO et al., 2014; CAPOBIANGO et al., 2016).

Desta forma, a definição de protocolos resulta em procedimentos de assistência padronizados e maior segurança para a tomada de decisão por parte dos profissionais de saúde. Talvez, a implementação de um protocolo de assistência e rastreio no estado de Roraima, bem como a realização de ações educacionais voltadas para as gestantes, possam atuar como mecanismos de prevenção à toxoplasmose.

## 5 | CONCLUSÃO

Os resultados apontam que o estado de Roraima precisa melhorar a qualidade do acompanhamento pré-natal ofertado quanto ao rastreio da toxoplasmose na gravidez. Além disto, faz-se necessário melhorar a comunicação entre o profissional de saúde e a gestante, de forma que as informações sejam repassadas durante as consultas, objetivando que a grávida entenda os mecanismos de prevenção, bem como a real importância da realização do exame de sorologia para a toxoplasmose durante o período gestacional.

## REFERÊNCIAS

ALVES, J.A.B.; OLIVEIRA, L.A.R.; OLIVEIRA, M.F.B.; ARAÚJO, R.M.; SANTOS, R.C.S.; ABUD, A.C.F. Prevalência de anticorpos anti-toxoplasma gondii em mulheres grávidas. **Rev Enferm UFRJ**, v.17, n. 1, p. 107-110. 2009.

BARBOSA, I.R.; HOLANDA, C.M.C.X.; ANDRADE-NETO, V.F. Toxoplasmosis screening and risk factors amongst pregnant females in Natal, northeastern Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, p. 377-382. 2009.

BARRIOS, P.; MÁZ, M.; BARLOCO, A.L.; SAYAGUÉS, B.; GIACHETTO, G. Infección de transmisión vertical por *Toxoplasma gondii*: seguimiento de los hijos de mujeres con primoinfección em una institución de asistencia médica colectiva; 2010-2015. **Archivos de Pediatría del Uruguay**, v. 87, n.1, p. 20-25. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Pré-natal e puerpério: atenção qualificada e humanizada: manual**

técnico. Brasília: MS, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Atenção à saúde do recém-nascido: guia para os profissionais de saúde**. Brasília: MS, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Gestação de alto risco: manual técnico**. Brasília: MS, 2012.

CÂMARA, J.T.; SILVA, M.G.; CASTRO, A.M. Prevalência de toxoplasmose em gestantes atendidas em dois centros de referência em uma cidade do Nordeste, Brasil. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 37, n. 2, p. 64-70. 2015.

CAPOBIANGO, J.D.; BREGANÓ, R.M.; NAVARRO, I.T.; REZENDE NETO, C.P.; CASELLAE, A.M.B.; MORI, F.M.R.L.; PAGLIARI, S.; INOUE, I.T.; REICHE, E.M.V. Congenital toxoplasmosis in a reference center of Paraná, Southern Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 18, n. 4, p. 364-37. 2014.

CAPOBIANGO, J.D.; MONICA, T.C.; FERREIRA, F.P.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; NAVARRO, I.T.; GARCIA, J.L.; REICHE, E.M. Evaluation of the Western blotting method for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. **J Pediatr (Rio J)**, v. 92, n. 6, p. 616-623. 2016.

CONTIERO-TONINATO, A.P.; CAVALLI, H.O.; MARCHIORO, A.A.; FERREIRA, E.C.; CANIATTI, M.C.C.L.; BREGANÓ, R.M.; NAVARRO, I.; FALAVIGNAGUILHERME, A.L. Toxoplasmosis: an examination of knowledge among health professionals and pregnant women in a municipality of the State of Paraná. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 47, n. 2, p.198-203. 2014.

CORTESA, J.A.; GÓMEZ, J.E.; SILVA, P.I.; ARÉVALOD, L.; RODRIGUEZE, I.A.; ÁLVAREZ, M.I.; BELTRANG, S.; CORRALESH, I.F.; MULLERI, E.A.; RUIZJ, G.; GÓMEZ, P.I. Clinical practice guideline. Integral Care Guidelines for the prevention, early detectation and treatment of pregnancy, childbirth and puerperium complications: Section on toxoplasmosis in pregnancy. *Infectio*, p. 102-116. 2017.

DE MOURA, F.L.; MILLAR, P.R.; FONSECA, A.B.M.; AMENDOEIRA, M.R.R. Congenital toxoplasmosis: perception of knowledge and primary prevention measures among healthcare professionals and pregnant women treated in public healthcare facilities. **Sci Med**, v. 27, n. 1, p. 1-11. 2017.

DOMINGUES, R.M.S.M.; HARTZ, Z.M.A.; DIAS, M.A.B.; LEAL, M.C. Avaliação da adequação da assistência pré-natal na rede SUS do Município do Rio de Janeiro, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 28, n. 3, p. 425-437. 2012.

FALLAHI, S.; ROSTAMI, A.; NOUROLLAHPOUR, S.M.; BEHNIAFAR H.; PAKTINAT, S. An updated literature review on maternal-fetal and reproductive disorders of *Toxoplasma gondii* infection. **J Gynecol Obstet Hum Reprod**, v. 47, n.3, p.133-140. 2017.

FIGUERÓ-FILHO, E.A.; LOPES, A.H.A.; SENEFONTE, F.R.A.; SOUZA JÚNIOR, V.G.; BOTELHO, C.A.; FIGUEIREDO, M.S.; DUARTE, G. Toxoplasmose aguda: estudo da frequência, taxa de transmissão vertical e relação entre os testes diagnósticos materno-fetais em gestantes em estado da Região Centro-Oeste do Brasil. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 27, n. 8, p. 442-449. 2005.

FILHO, C.A.L.; LAGRECA, L.C.C.; JESUS, N.O.; CORVARO, C.P.; FERRARINI, M.A.G.; MONTEIRO, A.I.M.P.; AZEVEDO, M.F. Alterações auditivas em crianças expostas à toxoplasmose durante a gestação. **Rev CEFAC**, v. 19, n. 3, p. 330-339. 2017.

KHAN, K.; KHAN, W. Congenital toxoplasmosis: An overview of the neurological and ocular manifestations. **Parasitol Int**, v. 67, n. 6, p. 715-721. 2018.

LEHMANN, L.M.; SANTOS, P.C.; SCAINI, C.J. Evaluation of Pregnant and Postpartum Women's knowledge about Toxoplasmosis in Rio Grande-RS, Brazil. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 38, n. 11, p.

538-544. 2016.

LOPES-MORI F.M.R.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; CAPOBIANGO, J.D.; INOUE, I.T.; REICHE, E.M.V.; MORIMOTO, H.K.; CASELLA, A.M.B.; BITTENCOURT, L.H.F.B.; FREIRE, R.L.; NAVARRO, I.T. Programs for control of congenital toxoplasmosis. **Rev Assoc Med Bras**, v. 57, n. 5, p. 581-586. 2011.

MALDONADO, Y.A.; READ, J.S., AAP COMMITTEE ON INFECTIOUS DISEASES. Diagnosis, Treatment, and Prevention of Congenital Toxoplasmosis in the United States. **Pediatrics**, v. 139, n. 2. 2017.

MALTA, D.C.; DUARTE, E.C.; ESCALANTE, J.J.; ALMEIDA, M.F.; SARDINHA, L.M.; MACÁRIO, E.M.; MONTEIRO, R.A.; DE MORAIS NETO, O.L. Mortes evitáveis em menores de um ano, Brasil, 1997 a 2006: contribuições para a avaliação de desempenho do Sistema Único de Saúde. **Cad Saúde Pública**, v. 26, p. 481-91. 2010.

MERONI, v.; GENCO, F. Screening for toxoplasmosis during pregnancy: One-year experience in an Italian reference laboratory. **Scientia Medica**, v. 20, n. 1, p. 35-39. 2010.

MITSUKA-BREGANÓ, R.; LOPES-MORI, F.M.R.; NAVARRO, I.T. **Toxoplasmose adquirida na gestação e congênita: vigilância em saúde, diagnóstico, tratamento e condutas**. Londrina: Eduel, 2010.

MONTENEGRO, C.A.; REZENDE FILHO, J. **Rezende, Obstetrícia**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

NASCIMENTO, T.L.; PACHECO, C.M.; DE SOUSA, F.F. Prevalência de *Toxoplasma gondii* em gestantes atendidas pelo Sistema Único de Saúde. **Ciência&Saúde**, v. 10, n. 2, p. 96-107, 2017.

NUNES, J.T.; GOMES, K.R.O.; RODRIGUES, M.T.P.; MASCARENHAS, M.D.M. Qualidade da assistência pré-natal no Brasil: revisão de artigos publicados de 2005 a 2015. **Cad. Saúde Colet**, v. 24, n. 2, p. 252-261. 2016.

OLARIU, T.R.; BLACKBURN, B.G.; PRESS, C.; TALUCOD, J.; REMINGTON, J.S.; MONTOYA, J.G. Role of *Toxoplasma* IgA as part of a Reference Panel for the Diagnosis of Acute Toxoplasmosis During Pregnancy. **J Clin Microbiol**, v. 57, n. 2, p. 1-8. 2019.

PAQUET, C.; YUDIN, M.H. Toxoplasmosis in Pregnancy: Prevention, Screening, and Treatment. **J Obstet Gynaecol**, v. 40, n. 8, p.687-693. 2018.

PEYRON, F.; LEOD, R.M.; AJZENBERG, D.; CONTOPOULOS-LOANNIDIS, D.; KIEFFER, F.; MANDELROT, L.; SIBLEY, L.D.; PELLOUX, H.; VILLENA, I.; WALLON, M.; MONTOYA, J.G. Congenital Toxoplasmosis in France and United States: One Parasite, two diverging approaches. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 2. 2017.

TOMASONI, L.R.; MESSINA, G.; GENCO, F.; SCUDELLER, L.; PRESTIA, M.; SPINONI, V.; BONFANTI, C.; PREFUMO, F.; CASTELLI, F.; MERONI, V. Risk of congenital toxoplasmosis in women with low or indeterminate anti- *Toxoplasma* IgG avidity index in the first trimester of pregnancy: an observational retrospective study. **Clinical Microbiology and Infection**, 2018.

## AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS HEMOCOMPONENTES NO HEMOCENTRO COORDENADOR DE SERGIPE

**Flávia Karen Carvalho Garcia**  
**Fátima de Jesus Santos**  
**Jéssica Araújo Menezes**  
**Larissa Lisboa Rêgo Brito**  
**João Victor Ferreira Santana**  
**Raphael Davisson Lopes Santos**  
**Weber De Santana Teles**

**RESUMO: Introdução:** O controle de qualidade apresenta como finalidade a busca de critérios de segurança nos procedimentos laboratoriais, possibilitando a contínua melhoria nos processos de produção. Dessa forma, nota-se a importância de tal ferramenta nos processos transfusionais, visando suprir as necessidades terapêuticas e garantir a segurança transfusional. **Objetivo:** O presente estudo teve como objetivo avaliar o controle de qualidade dos Concentrados de hemácia, concentrados de plasma fresco e concentrados de plaqueta que foram processados no laboratório de produção e dispensação e analisados no laboratório de controle de qualidade do hemocentro coordenador de Sergipe. **Metodologia:** Tratou-se de uma pesquisa exploratória de caráter longitudinal. Os dados obtidos no laboratório de controle de qualidade foram obtidos através de informações contidas no software (hemovida) no período de janeiro a maio de 2018. Das 100 bolsas de concentrado de hemácias

avaliadas, foram encontradas 15% (15) bolsas que estavam fora dos padrões impostos pelas normas e legislações vigentes. **Resultados:** Diante das inadequações, o maior índice foi referente aos níveis de hematócrito, com 46,6% (7), seguido do teor de hemoglobina e volume, com 33,3% (5) e 13,3% (2), respectivamente. Em relação às avaliações das bolsas de concentrados de plaquetas, das 100 bolsas, 80% (80) encontravam-se dentro dos valores de referência e 20% (20) apresentaram inadequação de acordo com os padrões exigidos pela Anvisa, visto que foram irregularidades acerca da contagem de plaquetas abaixo do valor de referência ( $\geq 5,5 \times 10^{10}$ /unidade). Em relação ao concentrado de plasma fresco constatou-se que das 100 bolsas, todas estavam em conformidade com os parâmetros estabelecidos pela RDC nº 34, de 11 de junho de 2014. **Conclusão:** Concluiu-se que o controle de qualidade apresenta a capacidade de identificar erros nos processos de produção e, através da identificação, buscar melhorias para garantir a eficiência dos procedimentos, garantindo a melhor terapêutica e maior segurança para o receptor.

**PALAVRAS-CHAVE:** Controle De Qualidade; Segurança Transfusional; Banco de Sangue

**ABSTRACT: Introduction:** Quality control has as purpose the pursuit of safety standards in

laboratory procedures, enabling the continuous improvement of production processes. Thus, there is the importance of this tool in transfusion processes to meet the therapeutic needs and ensure transfusion safety. Objective: This study aimed to assess the quality control of red blood cell concentrates, concentrates and fresh plasma platelet concentrates that were processed in the laboratory production and dispensing and analyzed the quality of Sergipe coordinator blood center control laboratory. Methodology: This was an exploratory longitudinal character. The data obtained in the quality control laboratory were obtained from information contained in the software (hemovida) in the period from January to May 2018. Of the 100 assessed red blood cell bags, were found 15% (15) grants that were outside the standards imposed by standards and legislation. Results: Due to the inadequacies, the highest index was related to hematocrit levels, with 46.6% (7), followed by the volume and hemoglobin content, 33.3% (5) and 13.3% (2) respectively. In regard to assessments of platelet concentrates bags, the 100 bags 80% (80) were within the reference values and 20% (20) had inadequate in accordance with the standards required by Anvisa since been irregularities on platelet count below the reference value ( $\geq 5,5 \times 10^{10}$  / unit).

**KEYWORDS:** Quality control; Transfusion safety; Blood bank

## INTRODUÇÃO

A busca pela qualidade leva as instituições de saúde a repensar as suas práticas quanto aos aspectos de segurança, buscando alcançar metas que possibilitem o processo de melhoria contínua<sup>1</sup>. O Controle de Qualidade (CQ) dos hemocomponentes é de fundamental importância para promover a segurança dos processos hemoterápicos, reduzindo ao máximo os riscos sanitários e aumentando o índice de confiabilidade Transfusional<sup>2</sup>.

A resolução da Diretoria Colegiada (RDC) da Agência Nacional da Vigilância Sanitária (ANVISA) nº 34, de 11 de junho de 2014, que dispõe sobre as boas práticas no ciclo do sangue, no artigo 64 informa que todo o serviço de hemoterapia que produza hemocomponentes deve realizar controle de qualidade sistemática, de todos os tipos de hemocomponentes produzidos em laboratório específico de controle de qualidade<sup>2</sup> e a Portaria nº 158, de 04 de fevereiro de 2016 Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos<sup>3</sup>. As normas supracitadas regulamentam os serviços de hemoterapia no Brasil, estabelecendo relação com o fluxo do ciclo do sangue (captação de doadores, coleta, processamento, análises, estocagem, controle de qualidade, distribuição, transfusão do sangue e segurança transfusional).

De acordo com American Association of Blood Bank (AABB) (2014)<sup>4</sup>, o CQ é uma ferramenta capaz de mensurar a qualidade dos serviços produzidos, esses procedimentos estabelecem se os serviços estão dentro das normas e legislações vigentes, ou se é necessário rever as ações. Pela necessidade e complexidade dos serviços de hemoterapia, medidas CQ são frequentemente usadas como padrões

diários para execução de procedimentos.

O manual para CQ de sangue total e hemocomponentes preconiza a padronização de procedimentos, desde a seleção do doador até a transfusão, com o objetivo de alcançar a melhoria da qualidade dos produtos e serviços oferecidos por todos os Serviços de Hemoterapia<sup>5</sup>.

Entretanto para que haja a garantia almejada no ciclo do sangue em Centros Hemoterapicos faz-se necessário que os setores administrativos e laboratoriais possuam um corpo técnico adremente formado, capacitado e habilitado para execução de procedimentos de ensaios, medição, verificação, validação, minimizando os desvios encontrados, descrevendo e documentando todas as atividades, incluindo materiais, insumos, qualificação de equipamentos, manutenção, limpeza, tratamento das não conformidades, participação de Programas de Ensaio e Proficiência (PEP) demonstrando técnica para realização dos testes e garantindo a qualidade dos resultados obtidos<sup>6</sup>.

Os hemocomponentes são produtos obtidos através da centrifugação de uma unidade de sangue total e seus principais componentes são: Concentrado de hemácias (CH); Concentrado de plaquetas (CP); Plasma fresco congelado (PFC); Crioprecipitado<sup>7</sup>.

Quanto ao controle de qualidade dos CH das bolsas de sangue consiste na inspeção visual, e avaliação da alteração de cor, grau de hemólise e testes microbiológicos, presença de coágulos, presença de vazamento e medida de volume, entretanto a análise de critério de aceitação visual deve ser estabelecido pelo serviço de hemoterapia<sup>7</sup>.

Quanto ao PF é a parte líquida do sangue que é constituído basicamente de água, 7% de proteínas (albumina, globulinas, fatores de coagulação e outras), 2% de carboidratos e lipídios. Obtêm-se após o procedimento de centrifugação de uma bolsa de sangue total ou através de separadores celulares automatizados, pela técnica de aférese. Por manter constantes suas propriedades quando conservado em condições ideais, apresenta grande importância para a medicina transfusional, na reposição de fatores de coagulação deficientes<sup>8</sup>.

Para avaliação sistemática do controle de qualidade do Plasma Fresco Congelado (PFC), todas as bolsas devem seguir pelo protocolo de análise pela inspeção visual, pré-congelamento, no entanto as bolsas que apresentarem alterações como: coloração atípica (lipemia, icterícia, hemólise), presença de fibrina, presença de hemácias, presença de vazamento devem ser descartadas<sup>7</sup>.

Em relação ao CP é uma suspensão de plaquetas em plasma, preparado mediante dupla centrifugação de uma unidade de sangue total ou pela técnica de plaquetaférese, para que estejam em condições de uso o CP necessita estar dispostas no homogeneizador de plaquetas, tendo mais eficiência à temperatura ambiente (20 a 24°C), o que aumenta as chances de proliferação bacteriana<sup>9</sup>.

Para assegurar a garantia da qualidade das bolsas de CP e atender seus critérios

de aceitação de acordo com as normas e legislações vigentes é necessária a realização da inspeção visual analisando os seguintes parâmetros: lipemia, alteração de cor, presença de grumos, presença de vazamento, medida de volume, determinação do número de plaquetas, determinação do número de leucócitos, determinação de pH, inspeção visual do swirling, teste microbiológico<sup>7</sup>.

Quanto ao Crioprecipitado: é a parte insolúvel do plasma, obtido através do método de congelamento rápido, descongelamento e centrifugação do plasma. O Plasma sobrenadante é removido, deixando-se na bolsa a proteína precipitada (10 a 20 ml). Esse material é novamente congelado a até - 18 ° C. É rico em fator VIII: c (atividade pró-coagulante), Fator VIII: Vwf (Fator von Willebrand), Fibrinogênio, Fator XIII e Fibronectina.

O presente estudo teve como objetivo avaliar o controle de qualidade dos CH, CPF, CP que foram processados no laboratório de produção e dispensação e analisados no laboratório de controle de qualidade do Hemocentro Coordenador de Sergipe no período de janeiro a maio de 2018.

## **METODOLOGIA**

Tratou-se de uma pesquisa exploratória de caráter longitudinal a partir de informações obtidas no Hemocentro Coordenador de Sergipe, os dados obtidos no laboratório de controle de qualidade através de informações contidas no software HEMOVIDA no período de janeiro a maio de 2018. O protocolo estabelecido para a realização dos procedimentos de controle foi obtido através da PORTARIA N° 158, de 04 de fevereiro de 2016 do Ministério da Saúde na Seção V, Do Controle de Qualidade dos Componentes Sanguíneos. Os dados foram tabulados pelo programa IBM SPSS Statistics 22 e distribuídos em gráficos.

O procedimento de controle de qualidade dos (CH) foi utilizado através do tipo de bolsa SAG-M, totalizando 100 (100%) unidades. Os dados produzidos foram tabulados no IBM SPSS Statistics 22.0, no Centro de Hemoterapia de Sergipe – HEMOSE. Foi seguido o protocolo de controle de qualidade de CH da Portaria n° 158, de 04 de fevereiro de 2016 do Ministério da Saúde na Seção V, Artigo 116, § 1º Do Controle de Qualidade dos Componentes Sanguíneos<sup>3</sup> obtendo-se 20 bolsas por mês, avaliando: volume, teor de hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), grau de hemólise e testes microbiológicos. Os métodos para obtenção dos resultados da Hb e do Ht ocorreram através de uma metodologia automatizada, com o equipamento ABX Pentra XL 80, utilizando os reagentes Lysebio, Minoclor, Diluente e Cleaner, todos pertencentes à marca ABX. Em relação ao grau de hemólise, foi realizada a técnica visual na amostra no tubo. Quanto o exame microbiológico, foi incubada uma amostra de sangue entre 35 a 37°, acrescentando o Hemocul I e II da Laborclin, o volume foi obtido seguindo a orientação da fórmula  $D = M/V$ , onde M: massa da bolsa, D: densidade da bolsa (dado pelo Manual para CQdo sangue total e hemocomponentes) e V: Volume da bolsa.

Para o controle de qualidade do PFC foram utilizadas 100 bolsas, nas quais foram avaliados requisitos como volume, hemácias residuais, leucócitos residuais e plaquetas residuais. A contagem dos resíduos de hemácias foi realizada através de uma metodologia visual, utilizando a câmara de Neubauer, realizando uma diluição de 1:2 entre o plasma e o reagente líquido de Hayem. No que se refere à contagem de leucócitos residuais, esta foi realizada visualmente, através da câmara de Nageotte, aplicando uma diluição de 1:5 entre o plasma e o reagente Líquido de Turk. No que diz respeito à contagem de plaquetas residuais, utilizou-se uma metodologia visual, por meio da câmara de Neubauer, empregando uma diluição de 1:20 entre oxalato de amônio e o plasma.

Em relação ao controle de qualidade das CP foram pesquisadas 100 bolsas, nos quais foram avaliados requisitos como volume, contagem de plaquetas, leucócitos residuais, pH e testes microbiológicos. A contagem de plaquetas foi realizada através de uma metodologia automatizada, por meio do equipamento ABX Pentra XL 80, utilizando os reagentes Lysebio, Minoclor, Diluente e Cleaner, todos pertencentes à marca ABX. No que se refere à dosagem de pH, esta foi realizada através de um pHmetro; já para obtenção dos leucócitos residuais foi realizada contagem manual através da câmara de Nageotte, utilizando o reagente Líquido de Turk da marca RENYLab. Quanto ao exame microbiológico, foi incubada uma amostra de plaqueta entre 35°C a 37°C, acrescentando o Hemocul I e II da Laborclin.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Concentrado de Hemácias

Das 100 bolsas de CH avaliadas, 85% (85) estavam cumprindo os padrões estabelecidos pela ANVISA, enquanto 15% (15) estavam com alguma inadequação (Figura 1).

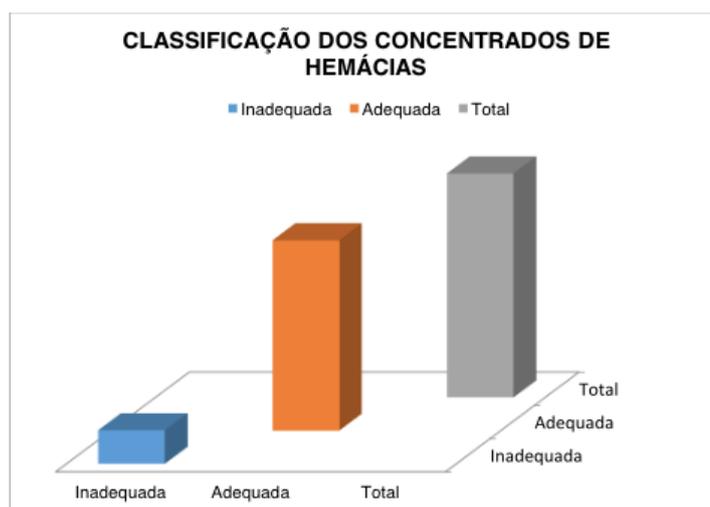


Figura 1: Classificação das bolsas conforme os padrões exigidos pela ANVISA, analisadas no Hemocentro Coordenador De Sergipe – HEMOSE no período de janeiro a maio de 2018.

Em relação à adequação das bolsas de CH aos resultados, mostraram a mais frequente referiu-se aos níveis de hematócrito, responsável por 46,6% (7) das inadequações, acompanhado pelo teor de hemoglobina com 33,3% (5), volume com 13,3% (2) e grau de hemólise com 6,6% (1) (Figura 2). No entanto, as não conformidades apresentadas dos níveis de Ht todos foram relacionadas aos índices inferiores a 50%. As inadequações do volume variaram entre menor que 220 ml e maior que 420 ml. Em relação a hemólise, apenas uma bolsa apresentou um grau de hemólise leve (1+). Contudo, vale ressaltar que de todas as bolsas analisadas, nenhuma apresentou alterações nos exames microbiológicos.

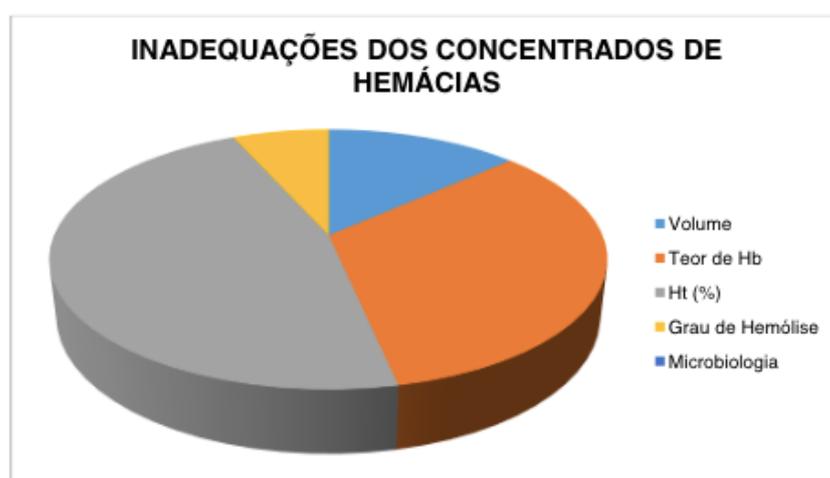


Figura 2. Prevalência das inadequações nos concentrados de hemácias analisados no Hemocentro Coordenador de Sergipe.

Observa-se nos resultados que o hematócrito foi a principal causa das inadequações nas bolsas analisadas, devido aos seus índices inferiores ou superiores aos parâmetros normais estabelecidos pela ANVISA. Essas alterações podem ser oriundas devido a fatores da homogeneização incorreta por parte dos profissionais que realizam a tarefa de produção ou por uma descalibração das máquinas responsáveis pela separação do CH do restante dos componentes sanguíneos<sup>10</sup>. Os valores do hematócrito são influenciados também pela quantidade dos glóbulos vermelhos no sangue ou pela quantidade de líquido sanguíneo<sup>11</sup>.

Ademais, o volume sanguíneo apresentou-se como outra forma de inadequação, responsável por 13,3% das inadequações, fato não ocorrido no estudo de Tomczak et al., (2010)<sup>12</sup>, quando realizou a análise de qualidade em amostras no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR), indicando que todas as bolsas estão com o volume adequado, de acordo com as normas da época.

Além disso, a outra forma de inadequação, o grau de hemólise, pode estar relacionado fortemente com o decorrer dos dias que os concentrados estão sendo

armazenados<sup>12</sup>.

O HEMOSE, nos primeiros 5 meses do ano de 2018, apresentou um risco potencial, nas proporções de controle, de nível médio-baixo, visto que 85% dos concentrados de hemácias estavam adequados em todos os parâmetros. O nível de risco foi considerado médio-baixo, com base nos cálculos do Método de Avaliação de Risco Potencial de Serviços de Hemoterapia (MARPSH), encontrada em estudos de anos anteriores nos serviços hemoterápicos<sup>13,14</sup>, porém, apesar de satisfatórios, faz-se necessário a aplicação de técnicas modernas ou melhorias nos serviços qualificatórios para aumentar os índices de qualidade e decair o risco de uma transfusão desagradável.

### Concentrados de Plaquetas

Das 100 bolsas registradas pelo laboratório de Controle de Qualidade, 80% (80) encontravam-se adequadas e 20% (20) apresentaram algum tipo de inadequação de acordo com os padrões exigidos pela ANVISA (Figura 3).

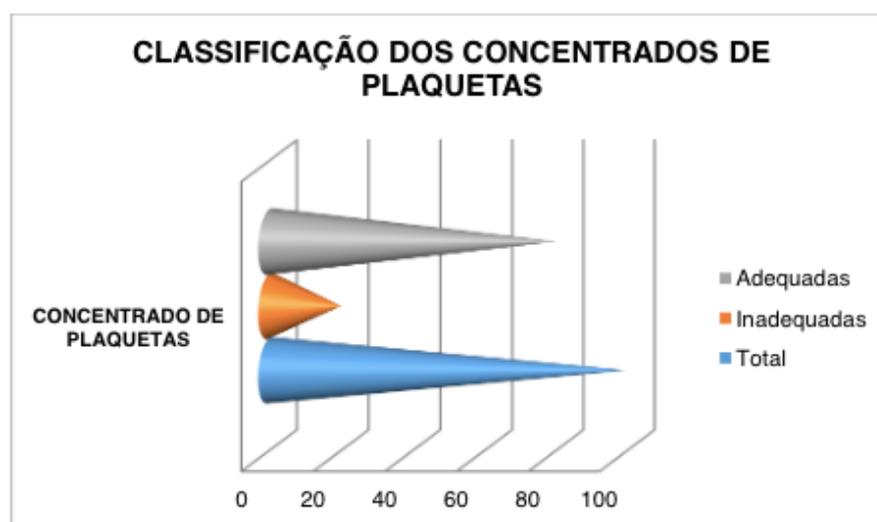


Figura 3: Classificação dos concentrados de plaquetas conforme os padrões exigidos pela ANVISA.

Dentre as irregularidades, foi observado que somente a quantidade de plaquetas estava fora dos padrões recomendados pela ANVISA, a qual possui valor de referência de  $\geq 5,5 \times 10^{10}$  unidades, demonstrando que nenhuma bolsa de concentrado de plaquetas apresentou dosagem de pH, hemácias residuais, leucócitos residuais e volume irregulares e presença de microrganismos nos testes microbiológicos (Figura 4).

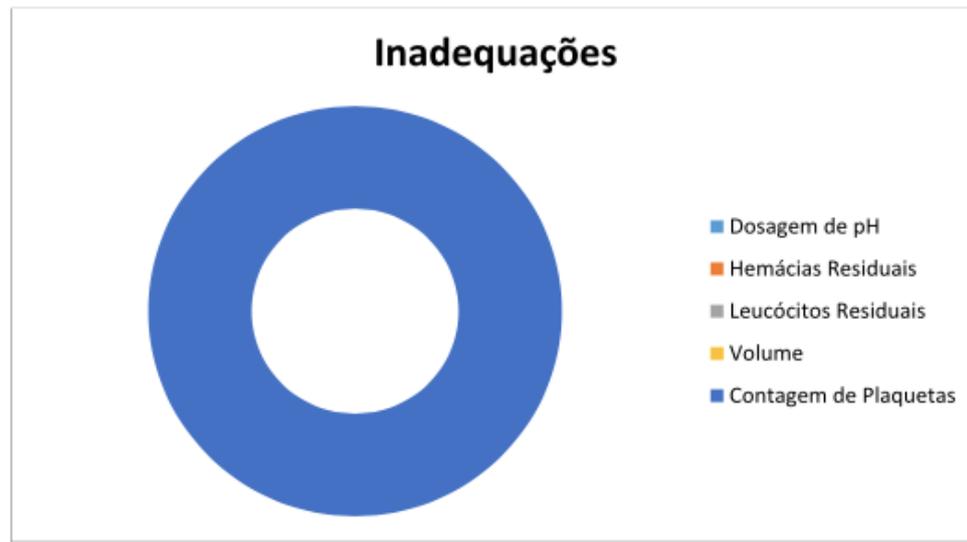


Figura 4. Prevalência das inadequações nos concentrados de plaquetas analisados no Hemocentro Coordenador de Sergipe.

O presente estudo evidencia que o pH se constatou dentro dos valores de referências estipulados pela Anvisa, porém, estudos como o de Tostes et al., (2008)<sup>15</sup> mostra que a alteração do pH pode influenciar na queda dos valores da agregação plaquetária, os quais são adequados para uma boa preservação do concentrado de plaquetas. Porém, apesar de não haver interferência no pH, 100% das inadequações dos concentrados de plaquetas foram acerca da quantidade de plaquetas estarem abaixo dos valores aceitáveis, podendo, conseqüentemente, provocar alterações quantitativas na agregação plaquetária.

A quantidade de inadequação dos concentrados de plaquetas foi de 20% (20), sendo apenas a contagem do conteúdo plaquetário. Tal prevalência fica evidente no estudo de Alves (2015)<sup>16</sup>, em que os níveis do conteúdo plaquetário foram abaixo do esperado, sendo uma das principais causas para inadequação desses hemocomponente. Além do mais, a outra não conformidade fica em torno do volume abaixo, sendo contra o volume ideal aceito por Buchignani (1998)<sup>17</sup>, tendo como problemática a disfuncionalidade correta da centrífuga.

Também foi observado que não houve contaminação bacteriana nas amostras do presente grupo, apresentando diferença quando comparado ao estudo de Teixeira et al., (2011)<sup>18</sup>, no qual observou o crescimento de bactérias (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus warneri*), o que condiz que o presente estudo apresentou uma eficácia de 100% nos procedimentos manuais, não havendo contaminação nos processos de coleta, produção e análise dos concentrados de plaquetas.

### Concentrados de Plasma Fresco

Com base nos dados obtidos, constatou-se que das 100 bolsas, todas estavam em conformidade com os parâmetros estabelecidos pela RDC nº 34, de 11 de junho

de 2014<sup>2</sup>, totalizando um índice de 100% de conformidade (Figura 5 e 6).

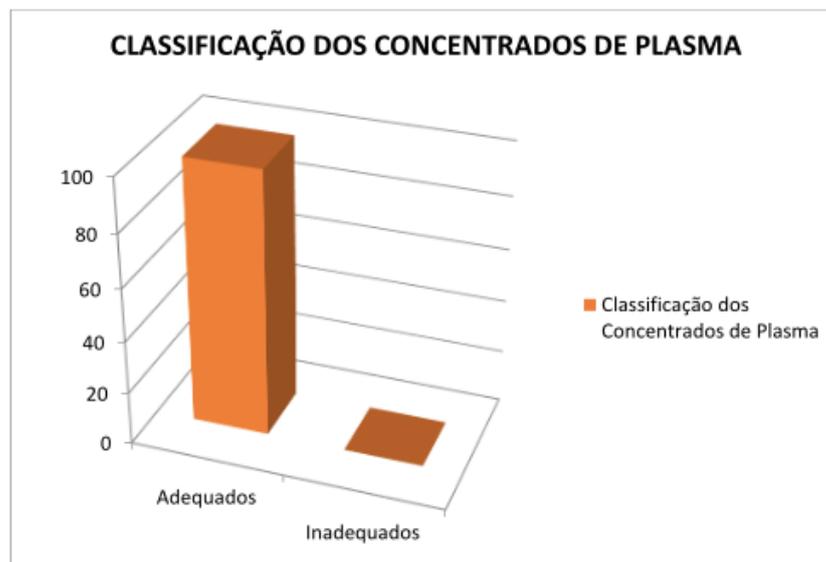


Figura 5. Classificação dos concentrados de plasma fresco seguindo os padrões estabelecidos pela ANVISA.

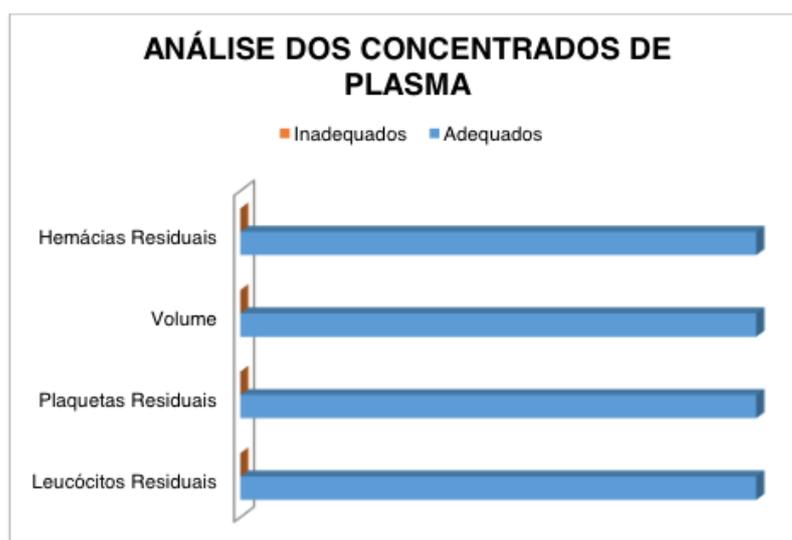


Figura 6. Análise das conformidades dos concentrados de plasma fresco avaliados segundo os critérios estabelecidos pela ANVISA.

A produção do plasma é relevante para o banco de sangue, devido à sua importância no âmbito biológico, visto que, a partir do concentrado de plasma são retiradas e separadas proteínas específicas, sendo necessária assegurar o quantitativo de resíduos de hemácias, leucócitos e plaquetas<sup>19,20</sup>.

Geralmente, o processo de descarte dos concentrados de plasma fresco está relacionado com a coloração anormal do hemocomponente, também como a lipemia e ao volume considerado fora dos parâmetros aceitáveis<sup>21</sup>. Dentre os analisados, nenhum apresentou estes critérios alterados. Além do mais, Moura (2013)<sup>21</sup> ainda salienta que há uma dependência nos parâmetros visuais para serem avaliados. Assim os parâmetros do CPF são ainda mais rigorosos e, somado ao prazo de validade de

1 (um) ano e ao estoque maior do que o restante dos hemocomponentes, explica o alto índice de descarte. Entretanto, os resultados observados no presente estudo mostraram uma contradição, visto que não houve nenhuma inadequação acerca dos CPF, apresentando um nível de 100% de adequações.

De acordo com Junqueira (2005)<sup>22</sup>, com o aumento das demandas e procedimentos nos Centros de Hemoterapia, faz-se necessário que os gestores e técnicos dos bancos de sangue em território brasileiro busquem por melhoria através dos serviços e procedimentos operacionais e administrativos que regulem as ações afins de que os usuários estejam resguardados quanto as possíveis não conformidades que podem aparecer nos processos. Dessa forma, faz-se evidente a necessidade de buscar sempre aperfeiçoar os procedimentos, servindo funcionalmente o controle de qualidade para fins de verificar onde está o erro no processo e indicar onde devemos promover mudanças e/ou melhorias.

## CONCLUSÃO

Conclui-se que a ferramenta de controle de qualidade trata-se de um importante instrumento de verificação da eficiência dos processos de produção dos hemocomponentes, garantindo, a partir dele, um melhor produto final e uma maior eficiência na terapêutica indicada. Dessa forma, faz-se vigente a relevância das condutas, as quais, a partir dos dados analisados, pode-se buscar melhoria em pontos chaves do processo. O presente estudo vislumbra um controle de qualidade eficaz, indicando um processo satisfatório no Hemocentro estudado, visando, ainda, a necessidade de melhora em alguns pontos para que os procedimentos hemoterápicos possam ser otimizados, garantindo maior confiabilidade na transfusão.

Ao finalizarmos este estudo, acreditamos que ele possa contribuir para os profissionais da área de saúde, de modo que eles possam se valer dos resultados obtidos nos últimos anos de pesquisa para corrigir possíveis equívocos. Como também, esperamos que esta pesquisa colabore para os estudantes que se interessam pela temática em questão, despertando o interesse para o aprofundamento de novas pesquisas na área. Além do mais, buscamos também oferecer o conhecimento acerca da funcionalidade do controle de qualidade, gerando a informação da sua importância para quaisquer instituições que trabalhem com saúde ou com serviços sociais.

## REFERÊNCIAS

World Health Organization. Quality Management Project for Blood Transfusion Services. 2013 [citado em 02 de maio de 2018]. Disponível em: <[http://www.who.int/bloodproducts/quality\\_safety/en/QMP\\_info\\_sheet.pdf](http://www.who.int/bloodproducts/quality_safety/en/QMP_info_sheet.pdf)>.

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 34, de 11 de junho de 2014. Dispõe sobre as Boas Práticas no Ciclo do Sangue. 2014.

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 158, de 4 de fevereiro de 2016. Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. 2016.

American Association of Blood Bank. Technical Manual. 2014; 18: 931.

Sakuma A, Ottoboni MAP, Sierra PC. Manual para CQdo sangue total e hemocomponentes. Rede de Serviços Tecnológicos para Sangue e Hemoderivados. RedSang-SIBRATEC. São Paulo, 2011.

ABNT NBR ISO 9001. Sistemas de gestão da qualidade – Requisitos. 2000 [citado em 02 de maio de 2018]. Disponível em: <<http://www.standardconsultoria.com/f/files/ced37e4b0cf7f91b80e9ca61ceefe5862036611357.pdf>>

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Guia para o uso de hemocomponentes. 2015; 2: 15-26.

Liumbruno G, Bennardello F, Lattanzio A, Piccoli P, Rossetti G. Recommendations for the transfusion of plasma and platelets. *Blood Transfus.* 2009; 7: 132-50.

Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK, Cahalan M, Stock MC, Ortega R. *Clinical anesthesia.* Lippincott Williams & Wilkins 2013; 7: 419-28.

Seifried E, Mueller MM. Development of transfusion medicine in Europe. A challenge for physicians, scientists and politicians. *Extended abstracts* 2007; 30-3.

Silva FXC, Oliveira P. Descoberta de Conhecimento em Dádivas de Sangue. Dissertação de mestrado. Instituto Superior de Engenharia do Porto. 2015.

Tomczak ACTQ, Grilo KTM, Castro JM, Machado AMB, Leonart MSS, Nascimento AJ. Estudo de métodos laboratoriais para o controle de qualidade de unidades transfusionais eritrocitárias no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (Hemepar), Brasil. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 2010; 32(3): 209-14.

Júnior JBS, Rattner D, Martins RCA. Controle de riscos potenciais em serviços de hemoterapia no Brasil: uma abordagem para autoridades reguladoras. *Rev. Panam. Salud Pública* 2016a; 40(1).

Júnior JBS, Rattner D. A vigilância sanitária no controle de riscos potenciais em serviços de hemoterapia no Brasil. *Saúde debate* 2016b; 40(109).

Tostes MAV, Junior ST, Pereira GA, Soares S, Souza HM. Influência da coleta, da produção e da estocagem na qualidade dos concentrados de plaquetas. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 2008; 30(5): 367-73.

Alves FVT, Carvalho MDV. Avaliação da produção de concentrados de plaquetas após a estocagem overnight do sangue total. *Revista de Hemoterapia – Artigos científicos de conclusão de curso de pós-graduação lato sensu em Hemoterapia* 2015; 142-9.

Buchignani MR, Deffune E, Mastranjo GC, Pardini MIMM, Padovani CR, Machado PEA. Controle de qualidade de concentrados de plaquetas (CP). *Revista Brasileira de Análises Clínicas* 1998; 30(3): 137-40.

Teixeira MP, Simões MLMS, Cortes VF, Grillo IAM, Barbosa IAO, Nogueira CM. *Revista de Enfermagem do Centro Oeste Mineiro* 2011; 1(3). 377-85.

Fernandes MACF. Manual de Transfusão Sanguínea. Agência Transfusional – Hospital Universitário Lauro Wanderley. 2015.

Gomez EW. Controle de Qualidade em Hemoterapia. Perfil de Resultados – Proficiência Clínica. 2014.

Moura EL. Identificação dos fatores de descarte de bolsas na produção de hemocomponentes no hemocentro coordenador da rede HEMEPAR. Curitiba. 2013. Projeto Técnico. MBA em Gestão da Qualidade. Universidade Federal do Paraná, 2013.

Junqueira PC, Rosenblit J, Hamerschlak N. História da Hemoterapia no Brasil. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia 2005; 27: 201-7.

## AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ANEMIAS EM EXAMES HEMATOLÓGICOS DE UMA POPULAÇÃO ATENDIDA POR PROJETO SOCIAL E SUA CORRELAÇÃO COM VALORES DE REFERÊNCIA

**Gleice dos Anjos Santos**

**Athos de Barros Vieira**

**Jonas Alves Paiva**

**Maria Helena Rodrigues De Mendonça**

**RESUMO: Introdução:** O eritrograma permite o diagnóstico e acompanhamento das anemias e auxílio terapêutico, avaliando especificamente a série vermelha, por parâmetros estabelecidos.

**Objetivo:** Avaliar o perfil do eritrograma verificando a frequência e alterações morfológicas das anemias, seguindo três valores de referências. **Métodos:** Foram selecionados todos os hemogramas realizados em projetos sociais e processados no laboratório escola da Faculdade Integrada Brasil Amazônia (FIBRA) em Belém-PA no ano de 2017. Considerando como critério de inclusão: pacientes do município de Ananindeua-PA, de sete meses a 82 anos de idade, sexo feminino e masculino atendidos em projeto social no ano de 2017.

**Resultados:** Dos 616 hemogramas analisados, 420 foram do sexo feminino e 196 do sexo masculino, com ampla faixa etária. De acordo com os valores de referência da Organização Mundial de Saúde (2011), do PNCQ (2015) e Failace, 2015, foram encontradas as respectivas frequências de anemias: 9,7%; 9,5% e 8,6% nos pacientes investigados, considerando o valor de hemoglobina abaixo do ponto de corte

definido pelos valores de referências adotados. Observou-se a maior frequência de anemia no sexo feminino na faixa etária de 21 a 64 anos. Quanto ao tipo morfológico à anemia normocítica normocrômica foi a anemia mais recorrente nesse estudo. **Conclusão:** Foi evidenciado na população amostral, pacientes com anemia, que devem ser investigados com mais precisão por diagnósticos específicos. Pois, os graus de severidades e alterações morfológicas encontradas sugerem diversos tipos de anemias, que podem causar sérios comprometimentos das funções orgânicas dos indivíduos, contribuindo para um problema de saúde pública de grande magnitude.

**PALAVRAS-CHAVE:** Anemia; Eritrócitos; Hemoglobina

**ABSTRACT: Introduction:** The erythrogram allows the diagnosis and monitoring of anemia and therapeutic aid, specifically assessing the red series, established parameters. **Objective:** To evaluate the erythrogram profile by checking the frequency and morphological changes of anemia, following three values references.

**Methods:** We selected all the blood tests carried out in social projects and processed in the laboratory school Faculdade Integrada Brasil Amazônia (FIBRA) in Belém - PA in the year 2017. Considering how inclusion criteria: patients' municipality of Ananindeua - PA,

seven months the 82-year-old female and male seen at social project in the year 2017. **Results:** of the 616 blood tests analyzed, 420 were females and 196 males, with wide age range. According to the reference values of the World Health Organization (2011), the PNCQ (2015) and Failace, 2015, found their frequency of anemia: 9.7%; 9.5% and 8.6% in patients investigated considering the hemoglobin value below the cut point defined by the reference values adopted. There was a higher incidence of anemia among women aged 21-64 years. As for the morphological type of normochromic normocytic anemia was the most recurrent anemia in this study. **Conclusion:** It was shown in the sample population, patients with anemia, which should be investigated more accurately for specific diagnoses. For the degrees of severity and morphological changes found suggest various types of anemia, which can cause serious impairment of bodily functions of individuals, contributing to a major public health problem.

**KEYWORDS:** Anemia; Erythrocytes; Hemoglobin

## INTRODUÇÃO

A anemia é definida como síndrome caracterizada por diminuição de massa eritrocitária total, compromete pessoas de todas as idades, sejam crianças, adultos ou idosos. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), um terço da população mundial é anêmico, ou seja, aproximadamente dois bilhões de pessoas acometidas, tornando-a uma problemática da saúde pública a nível mundial, ela também define as anemias como a condição na qual o conteúdo de hemoglobina no sangue está abaixo do normal como resultado da carência de um ou mais nutrientes essenciais, seja qual for a causa dessa deficiência (OMS, 2017)

Como as enfermidades interferem na qualidade de vida da população. O estudo da prevalência de anemias torna-se importante, já que o estado anêmico tem consequências ao portador que podem ser resumidas na modificação dos processos fisiológicos resultantes de sua ação normal, de tornar o transporte deficitário de oxigênio pela redução da hemoglobina e diminuir as atividades metabólicas de todas as células induzindo disfunções orgânicas generalizadas (NAOUM, 2015).

Para identificação de um quadro anêmico, o conhecimento dos parâmetros hematológicos é imprescindível na análise do estado de saúde, compreendendo que não há unanimidade sobre valores apontados como normais e seus limites na literatura, por existir variações fisiológicas e influências de natureza variadas como sexo, idade, raça, condições socioeconômicas, altitudes, localização geográfica e tipo de clima, interferindo diretamente nos mesmos. Dessa forma o uso do hemograma e seus parâmetros de análise são indispensáveis como indicador das alterações características e classificatórias das anemias (NAOUM, 2015; HOFFBRAND & MOSS, 2013).

O uso destes índices hematimétricos tem enorme importância para racionalizar a abordagem diagnóstica e contornar a problemática de altos custos em diagnósticos

diferenciais como das anemias. Neste contexto, avaliar o perfil das anemias através do eritrograma em exame hematológico correlacionando com valores de referências de níveis mundiais e nacional é o objetivo do presente trabalho, analisando alterações quantitativas no perfil hematimétrico pelos parâmetros tais como hemoglobina, VCM, HCM e CHCM (SANTOS *et al*, 2016).

## MATERIAL E MÉTODOS

A execução deste estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Faculdade Integrada Brasil Amazônia sob o CAAE: 87482218.6.0000.8187 e o número de parecer 2.636.171. Foi resguardado o sigilo em torno da identidade dos pacientes.

O estudo consistiu na análise de 616 eritogramas sem diagnóstico prévio para anemia. A coleta de dados foi realizada por meio da seleção dos hemogramas de pacientes atendidos no projeto social “Ataque total”, realizado em ações comunitárias no município de Ananindeua-Pa, as amostras de sangue foram processadas no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade Integrada Brasil Amazônia (FIBRA).

A coleta de dados obedeceu aos critérios de inclusão: Hemogramas de pacientes de ambos os sexos e de todas as idades realizados no ano de 2017. Dos exames que contemplaram os critérios de inclusão citados, foram consideradas variáveis como: idade, sexo, contagem de eritrócitos, hemoglobina sérica, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e amplitude da distribuição dos eritrócitos (RDW). Os critérios de exclusão serão todos os eritogramas que não sejam do ano de 2017 ou que não pertençam ao projeto Ataque Total.

Os dados foram organizados com auxílio do programa Microsoft Excel versão 2007 e a análise foi realizada no software estatístico BioEstat 5.0 (AYRES *et al*, 2007), as variáveis categóricas foram expressas em frequência (n) e percentual (%) e variáveis não categóricas foram expressas por média e desvio padrão, utilizando teste de análise estatística descritiva, teste de correlação de Pearson e teste Qui-quadrado.

Foram adotados três valores de referência para caracterização das alterações nos índices eritrocitários: Organização Mundial de Saúde, Programa Nacional de Controle e Qualidade (PNCQ) e Hemograma manual de interpretação, Failace 2015.

## RESULTADOS

Foram avaliados os 616 eritogramas pelos valores de referências adotados, sendo 420 do sexo feminino e 196 do sexo masculino, com idade mínima de sete meses e máxima de 82 anos (Figura 1).

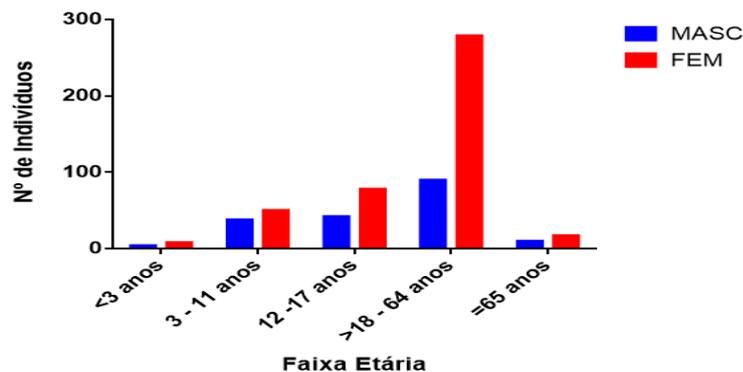


Figura 1 – Demonstra o número de pacientes avaliados de acordo com o sexo e faixa etária para valores de referência de hemoglobina.

Fonte: Própria, 2018.

De acordo, com os valores de referencia da OMS, foram encontrados 60 (9,7%) pacientes com anemia, sendo 53 do sexo feminino e 7 do sexo masculino. Entretanto, para os valores de referencia do PNCQ, foram encontrados 59 (9,5%) pacientes anêmicos, sendo 51 do sexo feminino e 8 do sexo masculino, já segundo Failace, 2015 foi encontrado 53 (8,6%) pacientes com anemia, sendo 35 do sexo feminino e 18 do sexo masculino (Figura 2).

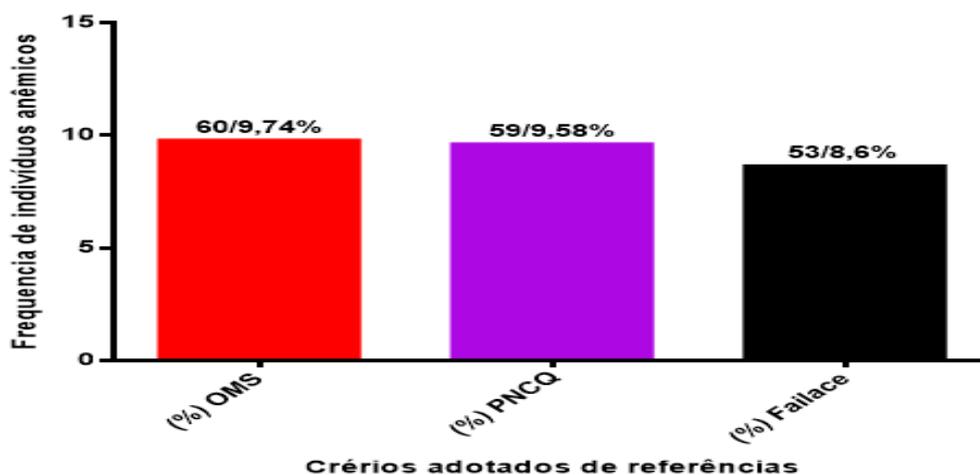


Figura 2 – Demonstra a frequência de pacientes anêmicos de acordo com os critérios da OMS, PNCQ e o Manual de Interpretação do Hemograma de Failace, 2015.

Fonte: Própria, 2018.

Contudo, quando avaliamos segundo a faixa etária para os nossos achados, verificamos que a maioria dos pacientes estava na faixa etária de 17 - 64 anos, entretanto, devemos observar que houve uma diferença entre o perfil anêmico encontrado na OMS e PNCQ ao encontrado por Failace, 2015 (Tabela 1). Também foi possível avaliar que o sexo feminino apresentou uma maior frequência nas anemias encontradas, com porcentagens do total de casos de: 88,3% das anemias pelos valores da OMS; 86,4% das pelo PNCQ e 66% dos casos de anemia detectadas por Failace

(2015). Entretanto, o sexo masculino apresentou 11,7%, 13,6% e 44% dos casos de anemias para OMS, PNCQ e Failace 2015 respectivamente.

Idade	OMS		PNCQ		FAILACE	
	Feminino	Masculino	Feminino	Masculino	Feminino	Masculino
0 – 4	–	–	1	–	–	–
5 – 8	–	–	–	–	–	1
9 – 12	2	1	2	–	2	9
13 – 16	5	–	5	2	2	2
17 – 20	6	1	6	1	6	1
21 – 64	37	5	37	5	24	5
>65	3	–	–	–	1	–

Tabela 1. Apresenta a distribuição dos pacientes com perfil anêmico por acordo com a OMS, PNCQ e Failace com relação ao sexo e a faixa etária de classificação.

Fonte: Própria, 2018.

Foi realizado uma classificação da anemia por grau de severidade estabelecida pela OMS segundo o nível de hemoglobina (Hb): anemia branda (Hb entre 11,0 g/dL – 11,9 g/dL), anemia moderada (Hb entre 8,0 g/dL – 10,9 g/dL) e anemia severa (Hb < 7,0 g/dL). Os resultados para esta classificação demonstram que OMS apresenta uma maior sensibilidade na detecção de anemias moderadas do que o PNCQ e Failace, 2015, não havendo diferença estatística entre as classificações ( $X^2 = >0,05$ ) (Figura 3).

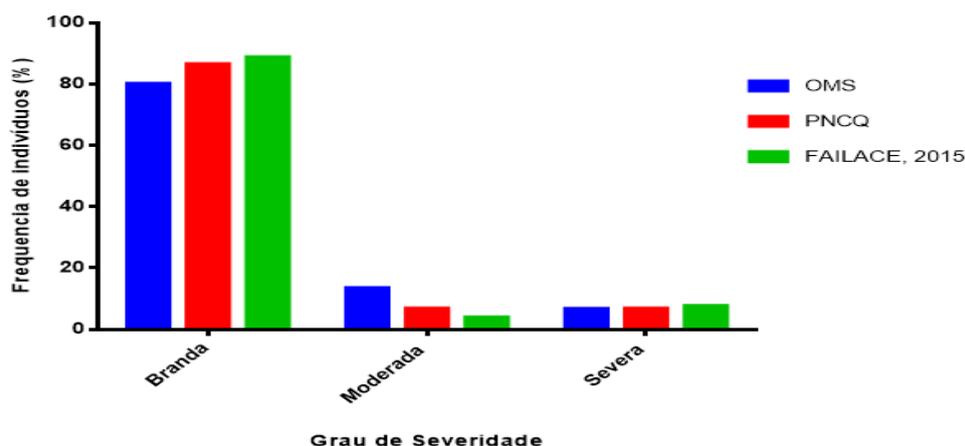


Figura 3. Demonstra a frequência do grau de severidade para os pacientes classificados com anemia segundo os três valores de referência comparados.

Fonte: Própria, 2018.

Foram analisadas as médias e desvios-padrões para os valores dos parâmetros do eritrograma, de acordo com os critérios avaliados. Foi observado que os valores de

VCMs, hematócritos e HCM apresentaram uma maior dispersão de dados referente a média encontrada para os pacientes anêmicos, tanto no sexo feminino, como no masculino (Tabela 2).

<b>OMS</b>						
<b>Sexo</b>	Hemácias (milhões/mm <sup>3</sup> ) – média (DP)	Hemoglobina (g/dL) – média (DP)	Hematócrito (%) – média (DP)	VCM (fL) – média (DP)	HCM (pg) – média (DP)	CHCM (%) – média (DP)
<b>Feminino (n=53)</b>	4,25 (±0,6)	10,9 (±1,3)	34,2 (±4,74)	81,6 (±8,18)	25,8 (±3,0)	31,9 (±2,1)
<b>Masculino (n=7)</b>	4,63 (±0,8)	12,3 (±0,4)	39,3 (±2,8)	86,5 (±11,45)	27,2 (±3,6)	31,5 (±1,7)
<b>PNCQ</b>						
<b>Sexo</b>	Hemácias (milhões/mm <sup>3</sup> ) – média (DP)	Hemoglobina (g/dL) – média (DP)	Hematócrito (%) – média (DP)	VCM (fL) – média (DP)	HCM (pg) – média (DP)	CHCM (%) – média (DP)
<b>Feminino (n=51)</b>	4,2 (±0,6)	10,8 (±1,3)	34,1 (±4,8)	81,8 (±8,0)	26 (±3,0)	32 (±2,1)
<b>Masculino (n=8)</b>	4,6 (±0,7)	12,4 (±0,3)	39,8 (±1,7)	87 (±10,8)	27,1 (±3,35)	31,1 (±1,3)
<b>FAILACE</b>						
<b>Sexo</b>	Hemácias (milhões/mm <sup>3</sup> ) – média (DP)	Hemoglobina (g/dL) – média (DP)	Hematócrito (%) – média (DP)	VCM (fL) – média (DP)	HCM (pg) – média (DP)	CHCM (%) – média (DP)
<b>Feminino (n=35)</b>	4,0 (±0,5)	10,5 (±1,5)	33,1 (±5,3)	82,0 (±7,8)	25,8 (±3,1)	31,8 (±2,4)
<b>Masculino (n=18)</b>	4,5 (±0,5)	12,2 (±0,3)	38,4 (±1,9)	85,9 (±7,4)	27,4 (±2,4)	31,8 (±1,3)

Tabela 2. Apresenta os valores médios e desvios-padrões (DP) por parâmetros dos totais de indivíduos anêmicos encontrados por cada valor de referência e divididos em sexo feminino e masculino.

Fonte: Própria, 2018.

A tabela 3 apresenta os perfis morfológicos resultantes da associação da baixa concentração de hemoglobina com os índices hematimétricos para avaliar as possíveis alterações caracterizadas pelas variações do VCM, HCM e CHCM. Também apresentada a frequência para cada resultado da associação da anemia com a alterações dos índices hematimétricos. De acordo com os valores de referência da OMS, encontramos sete perfis anêmicos, entretanto para o PNCQ foi observado seis e somente três para o Failace, 2015 (Tabela 3).

VR	Parâmetros	N	%
<b>OMS</b>	Anemia + normo (VCM) + normo (HCM) + normo (CHCM)	23	38,3
	Anemia + normo (VCM) + normo (HCM) + hipo (CHCM)	10	16,6
	Anemia + normo (VCM) + hipo (HCM) + hipo (CHCM)	05	8,3
	Anemia + normo (VCM) + hipo (HCM) + normo (CHCM)	01	1,6
	Anemia + micro (VCM) + normo (HCM) + normo (CHCM)	01	1,6
	Anemia + micro (VCM) + hipo (HCM) + normo (CHCM)	07	11,6
	Anemia + micro (VCM) + hipo (HCM) + hipo (CHCM)	13	21,6
<b>PNCQ</b>	Anemia + normo (VCM) + normo (HCM) + normo (CHCM)	27	45,7
	Anemia + normo (VCM) + normo (HCM) + hipo (CHCM)	11	18,6
	Anemia + normo (VCM) + hipo (HCM) + normo (CHCM)	01	1,7
	Anemia + normo (VCM) + hipo (HCM) + hipo (CHCM)	05	8,4
	Anemia + micro (VCM) + normo (HCM) + normo (CHCM)	02	3,3
	Anemia + micro (VCM) + hipo (HCM) + normo (CHCM)	13	22,0
<b>FAILACE, 2015</b>	Anemia + normo (VCM) + normo (HCM) + normo (CHCM)	40	75,4
	Anemia + micro (VCM) + hipo (HCM) + normo (CHCM)	10	18,8
	Anemia + micro (VCM) + hipo (HCM) + hipo (CHCM)	03	5,6

Tabela 3. Apresenta a frequência dos casos de anemia encontrados e as alterações morfológicas observadas ao associar o nível de hemoglobina com os índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM) para cada valor de referência (VR).

Fonte: Própria, 2018.

Foi realizado o teste de correlação Pearson para verificar os valores dos coeficientes de correlação entre as variáveis hematológicas de todos os pacientes anêmicos encontrados segundo os achados baseados nos três valores de referências utilizados, esse teste irá informar quais variáveis apresentaram fortes correlações aceitáveis para determinação de anemia nesse estudo. Assim, as correlações mais altas foram percebidas entre as variáveis: hemoglobina e hematócrito ( $r=0,912$ ;  $r=0,915$  e  $r=0,927$ ) e VCM e HCM ( $r=0,827$ ;  $r=0,822$  e  $r=0,759$ ). As correlações dos números de hemácias e hematócritos com o VCM, HCM e CHCM nos respectivos resultados apresentaram valores baixos e negativos (Tabela 4).

Parâmetro	OMS					
	Hemácias (milhões/mm <sup>3</sup> )	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (%)
<b>Hemácias (milhões/mm<sup>3</sup>)</b>	#	0,637	0,715	-0,380	-0,588	-0,498
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	0,637	#	0,912	0,359	-0,588	-0,498
<b>Hematócrito (%)</b>	0,715	0,912	#	0,323	0,018	-0,553
<b>VCM (fL)</b>	-0,380	0,359	0,323	#	0,827	0,026

<b>HCM (pg)</b>	-0,588	0,219	0,018	0,827	#	0,503
<b>CHCM (%)</b>	-0,498	-0,211	-0,553	0,026	0,503	#
<b>PNCQ</b>						
<b>Parâmetro</b>	Hemácias (milhões/mm <sup>3</sup> )	Hemoglobina (g/ dL)	Hematócrito (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (%)
<b>Hemácias (milhões/ mm<sup>3</sup>)</b>	#	0,644	0,722	-0,339	-0,564	-0,512
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	0,644	#	0,915	-0,339	0,238	-0,223
<b>Hematócrito (%)</b>	0,722	0,915	#	0,354	0,040	-0,557
<b>VCM (fL)</b>	-0,339	0,389	0,354	#	0,822	0,015
<b>HCM (pg)</b>	-0,564	0,238	0,040	0,822	#	0,500
<b>CHCM (%)</b>	-0,512	-0,223	-0,557	0,015	0,500	#
<b>FAILACE</b>						
<b>Parâmetro</b>	Hemácias (milhões/mm <sup>3</sup> )	Hemoglobina (g/ dL)	Hematócrito (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (%)
<b>Hemácias (milhões/ mm<sup>3</sup>)</b>	#	0,707	0,827	-0,072	-0,478	-0,658
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	0,707	#	0,927	0,554	0,268	-0,256
<b>Hematócrito (%)</b>	0,827	0,927	#	0,435	0,010	-0,571
<b>VCM (fL)</b>	-0,072	0,554	0,435	#	0,759	0,137
<b>HCM (pg)</b>	-0,478	0,268	0,010	0,759	#	0,641
<b>CHCM (%)</b>	-0,658	-0,256	-0,571	0,137	0,641	#

Tabela 4. Demonstra o coeficiente de correlação de Pearson (valores de r) entre variáveis hematológicas e seus valores encontrados segundo análise com os respectivos valores de referencia.

Fonte: Própria, 2018.

## DISCUSSÃO

Os três valores de referência adotados para as análises possuem grande aplicação em diagnósticos clínicos e estudos de perfis de anemia em diversos grupos de pessoas. Os valores de referência para hemograma determinados pela OMS, são adotados mundialmente para ajudar nas decisões sobre ações para diagnosticar, prevenir e controlar as anemias nutricionais. Além disso, é usado como base na elaboração de programa de detecção e controle de anemia em nível nacional e regional em diversos países (OMS, 2011). Logo, o valor de referência normal para hemograma apresentado pelo PNCQ no Brasil tem utilidade técnica que visa ajudar os laboratórios buscando padronização e qualidade nos diagnósticos através do hemograma (ANVISA, 2004). Enquanto que o valor de referência determinado por Failace (2015) é adotado em diversos estudos no Brasil, tendo sua base de determinação e análises feitas em população de Porto Alegre-RS.

A determinação de intervalos de referência para hemoglobina em uma determinada população é necessária, uma vez que classificação laboratorial da anemia está fundamentada no uso da hemoglobina como parâmetro para o diagnóstico de anemia (HOFFBRAND & MOSS, 2013). Segundo Menezes *et al.* (2010) a eficiência para diagnosticar uma população com prevalência elevada de anemia constitui na observação mais acurada dos demais índices hematimétricos, entretanto deve-se fazer uma padronização nos pontos de corte utilizados na prática laboratorial, assim, contribuindo na investigação das anemias. Outro ponto importante, é que os autores consideraram os índices hematimétricos para verificar as características morfológicas alteradas ou normais na anemia pela morfologia das hemácias.

As frequências de anemias nas faixas etárias encontradas nesse estudo são baixas, ao se comparar com as encontradas por Marques *et al.* (2016) em Portugal, utilizando os valores de referência da OMS (2017), entretanto, seus achados foram em faixa etárias específicas, com prevalência de anemia em 19,8% população de indivíduos de 18 - 80 anos. Contudo, a Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde (PNDS) de 2006 no Brasil encontrou prevalência de 20,9% entre crianças menores de 5 anos e 29,4% nas mulheres em idade férteis sendo esses dois grupos relatados na literatura como os mais afetados pela anemia (BRASIL, 2009). Maiores prevalências para crianças até 5 anos foram verificadas por Jordão, Bernardi & Filho (2009) em um estudo de metanálise de prevalências de anemia no Brasil, onde encontrou prevalência mediana de 53%, já Neves *et al.* (2005) encontraram prevalência de 55,1% de anemia na mesma faixa etária. Entretanto, Sousa *et al.* (2015) verificaram uma prevalência de 12,5% de anemia em idosos. Apesar de nossos achados não terem uma expressividade na frequência, porém são relevantes para demonstrar um perfil anêmico não identificado pelo laboratório.

A faixa etária dos pacientes anêmicos encontrados nas frequências do estudo abrangeu crianças, adultos e idosos de ambos os sexos, evidenciando a percepção de anemia em vários grupos de pessoas com a possibilidade de serem causadas por diversos fatores, como: fisiológicos, fatores nutricionais, fatores patológicos (CANÇADO & CHIATTONE, 2010). O sexo feminino apresentou maior recorrência de anemia encontradas (Tabela 1), a maior frequência foi em idade fértil e menopausadas (> 45 anos), fazendo com que os resultados sustentem a afirmação de mulheres serem um grupo de risco para anemia, pois, fisiologicamente já apresentam uma baixa reserva de ferro em decorrência de fatores biológicos e que podem ser agravados com condições patológicas (RODRIGUES & JORGE, 2010).

O sexo masculino apresenta uma reserva de ferro maior que as mulheres, porém ainda se verificam quadros de anemias entre eles. Nossos resultados demonstram perfis de anemia no sexo masculino, entretanto, Failace (2015) apresentou um maior percentual de indivíduos anêmicos que os outros pontos de cortes utilizados nesse trabalho (Tabela 1). A baixa percepção de idosos com anemia nessas frequências não quer dizer não haver prevalências consideráveis nesse grupo, uma vez que são

considerados grupo de risco para o estabelecimento de anemia pela associação do processo de envelhecimento com condições patológicas estabelecidas (CLIQUE, 2010).

As frequências encontradas nesse trabalho pelo uso da concentração da hemoglobina não apresentaram uma diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre si, tendo os resultados próximos, o que sugere não haver uma diferença discrepante no ponto de corte para hemoglobina em cada um dos três valores de referências adotados. Segundo a OMS os níveis de hemoglobina são determinantes para a classificação das anemias, o que demonstra que esse parâmetro é fundamental para o diagnóstico epidemiológico da anemia, corroborando com os nossos achados (OMS, 2017).

A classificação por grau de severidade permitiu inferir uma alta frequência de anemia branda em relação à moderada e severa, porém, os três graus de severidade apresentaram grande significado clínico para os indivíduos desse estudo, já que os mesmos não tiveram diagnóstico laboratorial sugestivo. Pois, na anemia branda, apesar da discreta redução da concentração de hemoglobina, observou-se hipocromia por CHCM, isso indica que o estoque de ferro circulante está comprometido, devido ao aumento na demanda da eritropoiese. As anemias moderada e severa apesar de representarem a minoria no total de anemias encontradas nesse estudo, apresentam grande importância, pois, além das acentuadas reduções na concentração de hemoglobina, apresentaram redução tanto no VCM, HCM e CHCM, o que resulta em hemácias microcíticas e hipocrômicas evidenciando comprometimento ainda maior do estoque de ferro no organismo do paciente (NAOUM, 2015; HOFFBRAND & MOSS, 2013).

Dentro dos casos de anemia diagnosticados, as características morfológicas dos eritrócitos determinadas pelo VCM, HCM e CHCM demonstraram que OMS apresentou mais perfis anêmicos que os demais valores estudados (tabela 4). Entretanto, a OMS teve mais casos de hipocromia por análise de HCM e CHCM (29,9%), em relação ao PNCQ (8,4%) e Failace (5,6%) (ANVISA, 2004; FAILACE, 2015). A hipocromia ocorre quando há deficiente síntese de hemoglobina pelo comprometimento da eritropoiese, processo de formação dos eritrócitos resultando em células de menor diâmetro e insaturação hemoglobínica dos eritrócitos (OMS, 2011).

A determinação de hipocromia nas anemias é um assunto que apresenta conflito na literatura, os dois parâmetros adotados para tal classificação são a HCM e CHCM. Failace (2015) considera que hipocromia e hiperchromia devem ser definidas pela baixa ou aumento da concentração de hemoglobina nos eritrócitos e não na quantidade de hemoglobina, já que a mesma depende do volume dos eritrócitos. Porém os dois parâmetros são úteis na verificação de hipocromia indicativa da redução de reservas de ferro no organismo (HOFFBRAND & MOSS, 2013, FAILACE, 2015).

A observação de tais alterações morfológicas se fez necessária para verificar os padrões existentes entre as anemias, salientando a necessidade de se investigar mais a fundo os quadros de anemias encontrados, pois, anemia normocítica normocrômica

inclui anemia aplásticas, anemia de doença crônica, anemia secundária à insuficiência renal crônica e anemias hemolíticas. O perfil de anemia microcítica hipocrômica abrange anemia por deficiência de ferro, anemia siderobástica, talassemia e anemia de doença crônica; todas apresentam sérios riscos para a população além do comprometimento de transporte de oxigênio. Porém seriam necessários exames mais específicos para confirmação do tipo de anemia específico (ALEGRE, 2009; HOFFBRAND & MOSS, 2013, FAILACE, 2015).

Os resultados de correlação do presente estudo concordam com o estudo de Menezes *et al.* (MENEZES, 2010) que encontrou forte correlação entre hematócrito e hemoglobina, e VCM e HCM, concluindo serem aceitáveis em estudo de determinação da anemia. Ressaltando a preconização do uso da hemoglobina como parâmetro inicial para diagnóstico de anemia pela OMS, uma vez que o número de hemácias e hematócritos podem se apresentarem normais ou alterados em determinados casos de anemia não sendo confiáveis observá-los sem considerar a concentração de hemoglobina (HOFFBRAND & MOSS, 2013, FAILACE, 2015; OMS, 2017). Tal fato pode ser observado neste estudo, onde se percebeu baixos níveis de hemoglobina, hemácias e hematócrito simultaneamente, nos casos de anemias graves. Nas anemias de severidade leve e moderada observou-se apenas a redução do nível de hemoglobina com alguns valores de hemácias e hematócrito próximos aos valores mínimos de referência.

Dessa forma, ressaltam-se as recomendações da OMS de averiguar os casos de anemia não usando apenas as concentrações de hemoglobina de forma isolada, mas associando aos demais parâmetros hematológicos disponíveis (OMS, 2017; OMS, 2011).

## CONCLUSÃO

A anemia é uma condição hematológica de sérios riscos em faixas etárias definidas para ambos os sexos, a literatura esclarece que as mulheres e crianças são os grupos de pessoas que apresentam maior risco para desenvolver anemia. No presente estudo foi evidenciada uma população amostral com anemia, que deve ser investigada com mais precisão por diagnósticos específicos. Pois, os graus de severidades e alterações morfológicas encontradas sugerem diversos tipos de anemias, que podem causar sérios comprometimentos das funções orgânicas dos indivíduos, contribuindo para um problema de saúde pública de grande magnitude.

O trabalho sugere a necessidade de um valor de referência estabelecido segundo as características biológicas, nutricionais, regionais e socioeconômicas da população local, para se averiguar as alterações nos valores hematológicos. A OMS sugere uma padronização com um número amostral significativo da população de interesse, contribuindo assim para uma implantação de um sistema de investigação específico

para a região norte.

## CONFLITOS DE INTERESSE

Não há conflito de interesses.

## SUPORTE FINANCEIRO

Próprio dos autores.

## REFERENCIAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Acreditação: a busca pela qualidade nos serviços de saúde. **Rev Saude Pública**, v. 38, n. 2, p. 335-336, 2004.

ALEGRE, S. M.; CARVALHO, O. M. F. Como diagnosticar e tratar anemias. **Rev Bras Med.**, v. 66, n.8, p. 229-237, 2009.

AYRES, M. et al. **Bioestat 5.0 aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: IDSM, 2007. 364p.

BRASIL. **Dimensões do Processo Reprodutivo e da Saúde da Criança. Ministério da Saúde.** Ministério da Saúde. Centro Brasileiro de Análise e Planejamento: Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher (PNDS-2006). Brasília, 2009.

BRASIL. **Política Nacional de Alimentação e Nutrição (PANAN)**. Ministério da Saúde. Brasília, 2012. p. 84.

CANÇADO, R. D.; CHIATTONE, C. S. Anemia ferropênica no adulto: causas, diagnóstico e tratamento. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 32, n. 3, p. 240-246, 2010.

CLIQUE, M. G. Como diagnosticar e tratar anemia no idoso. **Rev Bras Med.** v. 67, n. 4, p. 89-96, 2010.

FAILACE, R. **Hemograma - Manual De Interpretação**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. **Fundamentos em Hematologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. p.: 24-48.

JORDÃO, R. E.; BERNARDI, J. L. D.; FILHO, A. A. B. Prevalence of iron-deficiency

anemia in Brazil: a systematic review. **Rev Paul Pediatr**, v. 27, n. 1, p. 90-98, 2009.

MARQUES, F. et al. Contextualizando a elevada prevalência de anemia na população portuguesa: percepção, caracterização e preditores: um sub-estudo do EMPIRE. **Revista da sociedade portuguesa de medicina interna**, v. 23, n. 4, 2016.

MENEZES, A. E. B. et al. Validação de índices hematimétricos para o diagnóstico etiológico da anemia ferropriva em crianças de 6 a 23 meses. **Rev enferm UFPE on line**, v. 4, n. 1, p. 749-756, 2010.

NAOUM, P. C. **Anemias – Classificação e diagnóstico diferencial**. Universidade Estadual de Paulista. São Paulo, 2015.

NEVES, M. B.; da SILVA E. M.; de MORAIS, M. B. Prevalence and factors associated with iron deficiency in infants treated at a primary care center in Belém, Pará, Brazil. **Cad Saude Publica**, v. 21, p. 1911-1918, 2005.

Organização Mundial da Saúde (OMS). **Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity**. Vitamin and Mineral Nutrition Information System. Geneva, World Health Organization, 2011. Disponível em: <http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin.pdf>. Acesso em: 28 nov. 2018.

Organização Mundial da Saúde (OMS). **Nutritional anaemias: tools for effective prevention and control**. Geneva: World Health Organization; 2017. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259425/9789241513067-eng.pdf;jsessionid=19C7A1C27BD2561E16F2522B2BF75F20?sequence=1>. Acesso em: 11 fev. 2019.

RODRIGEUS, L. P.; JORGE, S. R. P. F. Deficiência de ferro na mulher adulta. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 32 (supl.2), 2010.

SANTOS, S. L. F. et al. **Utilização dos índices hematimétricos no diagnóstico diferencial de anemias microcíticas**. Centro Universitário Católica de Quixadá, 2016.

SOUSA, N. D. S. et al. Prevalência de anemia e correlação da concentração de hemoglobina com fatores cognitivos em idosos. **Revista Ciência & Saúde Coletiva**, v. 23, n. 3, p. 935-944, 2015.

## AVALIAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ISOLADOS DO COMPLEXO *CANDIDA PARAPSILOSIS* CAUSADORES DE CANDIDEMIA NO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO (HC-FMRP)

### **Márcia Eliana da Silva Ferreira**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP)

Universidade de São Paulo (USP)

Ribeirão Preto – São Paulo

### **Heliara Maria Spina Canela**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP)

Universidade de São Paulo (USP)

Ribeirão Preto – São Paulo

### **Bárbara Cardoso**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP)

Universidade de São Paulo (USP)

Ribeirão Preto – São Paulo

**RESUMO:** *Candida* spp. está entre os principais causadores de infecções no sistema circulatório, com considerável taxa de mortalidade. Embora *C. albicans* seja a espécie mais prevalente, a incidência de *C. parapsilosis* (sensu lato) aumentou significativamente nos últimos 20 anos. Esse complexo compreende as espécies *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis*, que são indistinguíveis fenotipicamente, mas apresentam diferenças na sensibilidade aos antifúngicos e produção de fatores de virulência. Esse estudo analisou fenotípica e genotipicamente 14 amostras pertencentes ao complexo *C. parapsilosis*,

isoladas de hemoculturas de pacientes internados no HC-FMRP. Foram avaliadas a produção de fatores de virulência; capacidade de formação de biofilmes; suscetibilidade a antifúngicos; e variabilidade genética dos isolados. *Candida parapsilosis* foi a espécie prevalente, responsável por 78,6% dos casos, *C. orthopsilosis* foi isolada em 21,4% dos pacientes e nenhum isolado de *C. metapsilosis* foi encontrado. Quanto à produção de fatores de virulência, poucos isolados foram capazes de produzir hemolisina e proteinase e nenhum isolado produziu fosfolipase. Quanto à formação de biofilme, cinco isolados de *C. parapsilosis* e dois isolados de *C. orthopsilosis* apresentaram capacidade de formação de biofilme. Quanto à sensibilidade aos antifúngicos, apenas um isolado de *C. parapsilosis* apresentou suscetibilidade dose-dependente ao fluconazol e a formação de biofilmes diminuiu a sensibilidade dos isolados aos antifúngicos testados. As técnicas de genotipagem apresentaram altos índices de discriminação e produziram resultados conflitantes. Os resultados obtidos são úteis no entendimento do perfil da candidemia causada por esse complexo no hospital estudado e contribuem para o conhecimento disponível sobre essa importante doença.

**PALAVRAS-CHAVE:** Candidemia. Complexo *Candida parapsilosis*. Fatores de virulência. Genotipagem. Candidíase invasiva.

**ABSTRACT:** *Candida* spp. are a relevant cause of bloodstream infections and present high mortality rates. Although *C. albicans* remains the predominant species, the incidence of *C. parapsilosis* (sensu lato) has been rising in the last 20 years. This complex comprises the species *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis*, which are indistinguishable phenotypically but can present differences in antifungal sensitivity and virulence attributes production. This study analyzed 14 bloodstream isolates of *C. parapsilosis* complex from patients of HC-FMRP. The virulence attributes production; biofilms formation; antifungal susceptibility and genetic variability were assessed. *Candida parapsilosis* was the predominant species, accounting for 78.6% of the cases, *C. orthopsilosis* was isolate from 21.4% of the patients and no one *C. metapsilosis* was isolated. Few isolates were able to produce hemolysin and proteinase and no one was able to produce phospholipase. Five isolates of *C. parapsilosis* and two isolates of *C. orthopsilosis* were able to form biofilms. One isolate of *C. parapsilosis* showed dose dependent susceptibility to fluconazol and the biofilm formation decrease the antifungal susceptibility. The genotyping showed high discrimination indexes and showed conflicting results. These results are useful to the understanding of candidemia profile in the studied hospital and contribute to the available knowledge of this important disease.

**KEYWORDS:** Candidemia. *Candida parapsilosis* complex. Virulence factors. Genotyping. Invasive candidiasis.

## 1 | INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, observou-se aumento no número de indivíduos imunocomprometidos, tais como aqueles que fazem uso de imunossupressores para a prevenção de rejeição de transplantes, que apresentam o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) ou que fazem uso de quimio e radioterapia para o tratamento de neoplasias. Essa população é suscetível às doenças fúngicas oportunistas e, conseqüentemente, houve aumento da incidência das mesmas (PEMÁN; QUINDÓS, 2016; VALLABHANENI et al., 2016).

As leveduras do gênero *Candida* são responsáveis pela maioria das doenças fúngicas oportunistas (PEMÁN; QUINDÓS, 2016). Algumas espécies são parte da microbiota humana e podem provocar infecções que variam de superficiais a sistêmicas em casos de imunossupressão, desequilíbrio da microbiota, rompimento de barreiras anatômicas ou mesmo o uso prolongado de antibioticoterapia (SARDI et al., 2013; YAPAR, 2014; PEMÁN; QUINDÓS, 2016).

A candidemia, invasão do sistema circulatório por *Candida* spp., é a principal forma de candidíase invasiva e atinge principalmente pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), nos quais é responsável por aproximadamente 17% das infecções (YAPAR, 2014; GONG et al., 2016). Essa doença pode ter origem endógena ou exógena e pode apresentar altas taxas de mortalidade e prolongar o tempo de hospitalização do paciente, o que resulta em aumento dos gastos (SARDI

et al., 2013; PEMÁN; QUINDÓS, 2016). A candidemia é uma importante infecção nosocomial no mundo todo; entretanto, sua incidência varia de acordo com o país, região, hospital e época, o que ressalta a importância da constante realização de estudos locais (QUINDÓS, 2014).

Apesar de *Candida albicans* ainda ser a espécie predominante em muitos hospitais e centros de saúde, observa-se aumento da incidência de infecções provocadas por *Candida não-albicans*, incluindo as espécies do complexo *Candida parapsilosis* (KATO et al., 2019).

O complexo *Candida parapsilosis* é composto por três espécies indistinguíveis fenotipicamente: *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, e foi descrito, em 2005, por Tavanti e colaboradores.

A espécie *C. parapsilosis* é a mais prevalente do complexo e, em alguns estudos, superou inclusive os episódios provocados por *C. albicans* (CHEN et al., 2010; ŞULAR et al., 2018; SUN et al., 2019). Essa espécie é frequente colonizadora da pele, o que contribui para infecções de origem exógena (PEMÁN; QUINDÓS, 2016). A espécie *C. orthopsilosis* é relacionada à candidemia em neonatos (BLANCO-BLANCO et al., 2014; PEMÁN; QUINDÓS, 2016). Por outro lado, *C. metapsilosis* é raramente isolada em episódios de candidemia (BLANCO-BLANCO et al., 2014; ZICCARDI et al., 2015).

Os fatores de virulência, tais como a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares e a formação de biofilmes, e a suscetibilidade aos antifúngicos são fatores que influenciam no desfecho dos episódios de candidemia e que variam entre as espécies e até entre isolados de uma mesma espécie (DE LUCA et al.; 2012; MUTLU SARIGUZEL et al., 2015; TAY et al., 2011). As técnicas de genotipagem são úteis na análise da variabilidade genética de isolados e são baseadas em diferentes princípios (CHEN et al., 2005; SABINO et al., 2010).

Assim, o objetivo desse estudo foi analisar fenotípica e genotipicamente 14 amostras pertencentes ao complexo *C. parapsilosis*, isoladas de hemoculturas de pacientes internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP). Foram avaliadas a produção de hemolisina, fosfolipase e proteinase; capacidade de formação de biofilmes; suscetibilidade aos antifúngicos anfotericina B, caspofungina, fluconazol e voriconazol; e as características clínicas dos pacientes acometidos. Além disso, foi realizada a genotipagem por *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e *Microsatellite Length Polymorphism* (MLP).

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Isolados

Os isolados utilizados nesse estudo foram obtidos de pacientes internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC – FMRP) e em

sua Unidade de Emergência (UE-HCFMRP), de junho de 2014 a novembro de 2015. Todos os pacientes com candidemia causada por *C. parapsilosis* (sensu lato) foram incluídos no estudo. Um episódio de candidemia foi definido como pelo menos uma hemocultura positiva para *Candida* spp. Somente o primeiro episódio de cada paciente foi considerado.

Durante o período do estudo, foi obtido um total de 14 isolados. As amostras foram mantidas em caldo Sabouraud dextrose (Oxoid, Hampshire, Inglaterra), suplementado com 20% de glicerol (Merck, Darmstadt, Alemanha), em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

A identificação das espécies foi realizada por métodos moleculares, segundo a metodologia desenvolvida por Feng e colaboradores (2014).

## 2.2 Testes de sensibilidade das células planctônicas aos antifúngicos

A sensibilidade aos antifúngicos foi determinada utilizando-se o método de microdiluição em caldo (*Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI, documento M27-A3). A linhagem *C. parapsilosis* ATCC 22019 foi utilizada como controle de qualidade.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada visualmente e definida como a menor concentração capaz de inibir 50% do crescimento para caspofungina, fluconazol e voriconazol e a menor concentração capaz de inibir qualquer crescimento visível para anfotericina B. Os pontos de corte foram determinados pelo documento M27-S4 do CLSI. Como não existem pontos de corte determinados para a anfotericina B, foram utilizados os *epidemiological cutoff value* (ECV) descritos no documento M59 do CLSI. Os ECVs de caspofungina, fluconazol e voriconazol para *C. orthopsilosis* foram os descritos por Pfaller e colaboradores (2011) e como não existem valores de corte ou ECV de anfotericina B para *C. orthopsilosis*, esses isolados não foram classificados.

## 2.3 Produção de proteinase

A pesquisa de proteinase foi realizada de acordo com Mane e colaboradores (2012). Todos os experimentos foram realizados em duplicata. A atividade de proteinase ( $\text{Pr}_z$ ) foi caracterizada pela presença de halo claro, correspondente à degradação de proteínas ao redor da colônia, e calculada pela razão do diâmetro da colônia e o diâmetro do halo. A atividade de proteinase foi considerada negativa quando  $\text{Pr}_z = 1$ , positiva quando  $0,64 < \text{Pr}_z < 0,99$  e fortemente positiva quando  $\text{Pr}_z \leq 0,64$ . As linhagens *C. albicans* ATCC 14053 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente.

## 2.4 Pesquisa de fosfolipase

A pesquisa de fosfolipase foi feita de acordo com Mane e colaboradores (2012). Todos os experimentos foram realizados em duplicata. A atividade de fosfolipase ( $\text{P}_z$ )

foi caracterizada pela presença de halo opaco, correspondente à degradação de fosfolípidos ao redor da colônia, e calculada pela razão do diâmetro da colônia e o diâmetro do halo. A interpretação da  $P_z$  foi igual à de proteinase e foram utilizados os mesmos controles.

## 2.5 Pesquisa de hemolisina

A pesquisa de hemolisina foi realizada de acordo com Luo, Samaranayake e Yau (2001). Todos os experimentos foram realizados em duplicata. A atividade hemolítica ( $H_z$ ) foi caracterizada pela presença de halo de hemólise ao redor da colônia e calculada pela razão do diâmetro da colônia e o diâmetro do halo. A interpretação da  $H_z$  foi igual à de proteinase e foram utilizados os mesmos controles.

## 2.6 Capacidade de formação de biofilmes

A capacidade de formação de biofilmes foi avaliada de acordo com Pierce e colaboradores (2010). Para a quantificação dos biofilmes, foram utilizados dois métodos colorimétricos: o método de estimativa da biomassa total por coloração com cristal violeta, de acordo com Silva e colaboradores (2009); e o método da determinação da atividade metabólica pela redução do sal tetrazólio XTT, de acordo com Pierce e colaboradores (2010). Os testes foram realizados em quatro replicatas e uma coluna sem inóculo foi utilizada como controle negativo e branco. A classificação foi realizada de acordo com Pannanusorn, Fernandez e Römling (2013), a qual utiliza os valores de absorvância da atividade metabólica.

## 2.7 Testes de sensibilidade de biofilmes aos antifúngicos

A sensibilidade dos biofilmes aos antifúngicos foi determinada utilizando-se a metodologia de redução do XTT (PIERCE et al., 2010), em biofilmes maduros (24h). Assim, foi determinada a Concentração Inibitória Mínima de Biofilme (CIMb) para os antifúngicos anfotericina B, caspofungina, fluconazol e voriconazol, definida como a concentração mínima da droga capaz de reduzir a atividade metabólica do biofilme em 50% (CIMb<sub>50</sub>) e em 80% (CIMb<sub>80</sub>), considerando-se o controle de crescimento, sem a presença dos antifúngicos, como 100%. Os testes foram realizados em duplicata.

## 2.8 Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE)

A técnica de PFGE utilizada foi baseada em Miranda e colaboradores (2012), Chen e colaboradores (2005) e Shin e colaboradores (2001).

Resumidamente, as suspensões foram confeccionadas em água estéril e lavadas duas vezes. A seguir, água foi retirada por aspiração e suspensões de concentração equivalente a 1mg de células por microlitro foram confeccionadas em EDTA (50 mM, pH 8), homogeneizadas e 50  $\mu$ L foram transferidos para novos microtubos contendo 150  $\mu$ L de EDTA. A essas suspensões foram adicionados 40  $\mu$ L de liticase e 240  $\mu$ L de

agarose *Seakem gold* (Lonza, Suíça). As soluções foram transferidas para os moldes de bloco de agarose (CHEF DRIII); estes foram incubados em câmara úmida a 4°C durante 15 minutos e, posteriormente, a 37°C durante 2 horas. Após a incubação, os blocos foram transferidos para tubos contendo 1,9 mL de tampão NET (1 mL Tris 1 M pH 7,5; 90 mL EDTA 0,5 M pH 8; 10 mL Laurilsarcosine 10%) e proteinase K (1mg/mL), e incubados de 8 a 16 horas, a 56°C. Após a incubação, os blocos foram lavados 5 vezes com 2 mL de tampão CHEF TE 1x (13 mL EDTA 0,5 M pH 7; 13 mL EDTA 0,5 M pH 8; 6,5 mL Tris 1 M pH 7; 6,5 mL Tris 1 M pH 8; água deionizada q.s.p. 130 mL) durante 15 minutos, sob agitação, à temperatura ambiente. Entre cada lavagem, os blocos foram incubados durante 1 hora em repouso, também à temperatura ambiente.

Para a digestão, cada bloco foi lavado 5 vezes com tampão DNS (10 mL Tris 1 M pH 8; 500 µL MgCl<sub>2</sub>; água deionizada q.s.p. 100 mL) durante 30 minutos sob agitação, à temperatura ambiente. Após as lavagens, os blocos foram transferidos para tubos contendo tampão de digestão e a enzima *Paul* (20 U) e incubados a 37°C, de 8 a 16 horas.

Após a digestão, o tampão foi removido, os blocos foram lavados com TE durante 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação, e aplicados em gel de agarose *Seakem gold* (1% em TBE). A eletroforese em campo pulsado foi realizada no aparelho CHEF DR® III (Bio-Rad, França). O tampão utilizado para a corrida foi TBE 0,5x (0,5 mM EDTA; 50 mM Tris; 50 mM ácido bórico; água deionizada) e as condições foram: 10 s de pulso inicial, 90 s de pulso final, 14°C, 6 V/cm, 120° de ângulo, 29 horas. O marcador de peso molecular utilizado foi *Salmonella* Braenderup H9812 digerida com 30 unidades de *Xba*I, a 37°C, durante 2 horas (HUNTER et al., 2005). O gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) durante 30 minutos, descorado com água destilada durante 1 hora e 30 minutos e documentado em luz ultravioleta.

Os dados foram analisados utilizando-se o *software* BioNumerics 7.6 (AppliedMaths, Bélgica). Cada banda gerada foi identificada de acordo com o tamanho e foi utilizada para a construção do dendrograma de similaridade genética, construído pelo método de *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA).

## **2.9 Microsatellite Length Polymorphism (MLP)**

Os marcadores CP1, CP4 e CP6 foram utilizados para *C. parapsilosis*, de acordo com Sabino e colaboradores (2010). Como foram obtidas somente três linhagens de *C. orthopsilosis* e não existem marcadores de microssatélite descritos para essa espécie, essas linhagens não foram submetidas ao MLP.

Os dados foram analisados utilizando-se o *software* BioNumerics 7.6 (AppliedMaths, Bélgica). Cada pico gerado foi identificado de acordo com o tamanho e marcação utilizada. O tamanho dos fragmentos foi utilizado para a construção do dendrograma de similaridade genética, construído pelo método de UPGMA.

## 2.10 Classificação dos isolados

Os isolados foram classificados como geneticamente idênticos (100% de similaridade), geneticamente relacionados (90 a 99.9% de similaridade) ou geneticamente não relacionados (<89.9% de similaridade) (ABDELJELIL et al., 2011; HEO et al., 2011).

## 2.11 Cálculo do índice de discriminação

O índice de discriminação das técnicas de genotipagem foi calculado utilizando-se o índice de diversidade de Simpson (HUNTER; GASTON, 1988).

## 2.12 Análise dos prontuários

Os prontuários dos pacientes foram analisados em busca de informações como fatores de risco. Para isso, os seguintes dados foram extraídos dos prontuários dos pacientes: sexo, idade, ala hospitalar de admissão, internação na UTI, diagnóstico, tratamento com antibióticos, nutrição parenteral, presença de cateter venoso central, neutropenia, diabetes, doença de base e características clínico-evolutivas da candidemia. Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o software Epi Info™ versão 7 (Centers for Disease Control and Prevention - CDC, EUA) e os testes de  $\chi^2$  e Fisher. Valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## 2.13 Ética

Esse estudo foi aprovado pelos comitês de ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (número CAAE 26123913.9.0000.5403).

## 3 | RESULTADOS

Durante o período do estudo, 14 episódios de candidemia provocada por *C. parapsilosis* (sensu lato) foram identificados, o que corresponde a uma incidência de 0,27 episódios a cada 1000 admissões. Como esperado, *C. parapsilosis* foi a espécie predominante, responsável por 78,6% dos casos, *C. orthopsilosis* foi isolada em 21,4% dos pacientes e nenhum isolado de *C. metapsilosis* foi encontrado.

A média de idade dos pacientes foi de  $32 \pm 26,7$  anos e variou de seis dias a 72 anos. A média de idade dos pacientes acometidos por *C. orthopsilosis* foi menor ( $0,58 \pm 0,32$  anos). A maioria dos pacientes acometidos por *C. parapsilosis* foi admitida em unidades de cirurgia, enquanto todos os pacientes acometidos por *C. orthopsilosis* eram provenientes de UTIs.

A maioria dos pacientes apresentou um ou mais fatores de risco para candidemia, sendo que os fatores de risco mais comuns foram antibioticoterapia e acesso venoso

central. Não houve relação entre os fatores de risco e o desfecho da candidemia ( $P>0,05$ ). Todos os pacientes apresentaram doenças de base, sendo que as doenças gastrointestinais, tais como apendicite, foram as mais comuns. Nos pacientes acometidos por *C. orthopsilosis*, as doenças genéticas e malformações congênitas foram as mais frequentes.

A taxa de mortalidade total foi de 35,7%, sendo que *C. parapsilosis* apresentou uma taxa de 36,4% e *C. orthopsilosis*, 33,3%. Não houve diferença significativa entre as espécies ( $P=0,92$ ). A distribuição das espécies e as características dos pacientes estão resumidas na Tabela 1.

Características dos pacientes	Espécies		
	<i>C. parapsilosis</i> n=11	<i>C. orthopsilosis</i> n=3	Todas n=14
<b>Sexo n (%)</b>			
Feminino	5 (45,5)	2 (66,7)	7 (50)
Masculino	6 (54,5)	1 (33,3)	7 (50)
Média de idade em anos (DP)	40 (24,8)	0,58 (0,32)	32 (26,7)
Taxa de mortalidade total# (%)	36,4	33,3	35,7
<b>Unidades hospitalares n (%)</b>			
Unidades médicas	3 (27,3)	0	3 (21,4)
Unidades de cirurgia	5 (45,4)	0	5 (35,7)
UTIs*	3 (27,3)	3 (100)	6 (42,9)
<b>Fatores de risco n (%)</b>			
Antibioticoterapia	10 (90,9)	3 (100)	13 (92,9)
Acesso venoso central	8 (72,7)	3 (100)	11 (78,6)
Cirurgia	7 (63,6)	2 (66,7)	9 (64,3)
Neutropenia	2 (18,2)	0	2 (14,3)
Nutrição parenteral	6 (54,5)	2 (66,7)	8 (57,4)
Sonda vesical	5 (45,4)	2 (66,7)	7 (50)
<b>Doenças de base n (%)</b>			
Câncer sólido	2 (18,2)	0	2 (14,3)
Prematuridade	0	1 (33,3)	1 (7,1)
Neoplasia hematológica	1 (9,1)	0	1 (7,1)
Doenças cardíacas	1 (9,1)	0	1 (7,1)
Doenças gastrointestinais	4 (36,4)	0	4 (28,6)
Doenças pulmonares	0	1 (33,3)	1 (7,1)
Doenças vasculares	1 (9,1)	0	1 (7,1)
Trauma	2 (18,2)	0	2 (14,3)
Doenças genéticas / Malformação congênita	1 (9,1)	2 (66,7)	3 (21,4)
Doenças renais	1 (9,1)	0	1 (7,1)
Diabetes Mellitus	2 (18,2)	0	2 (14,3)

Tabela 1. Unidades hospitalares, fatores de risco, doenças de base e características dos pacientes acometidos por candidemia causada por *C. parapsilosis* (sensu lato) no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto no período entre junho de 2014 e novembro de 2015. \*Unidade de terapia intensiva. # A mortalidade da candidemia foi calculada 14 dias após o diagnóstico.

Quanto à sensibilidade aos antifúngicos, apenas um isolado de *C. parapsilosis* apresentou suscetibilidade dose-dependente ao fluconazol. Os demais isolados foram suscetíveis aos antifúngicos testados. Os resultados dos testes de sensibilidade estão resumidos na Tabela 2.

Espécie	Antifúngico	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )			
		Intervalo	CIM média* $\pm$ DP	CIM 50	CIM 90
<i>C. parapsilosis</i> n=11	Anfotericina B	0,25 – 1	0,64 $\pm$ 0.3	0,5	1
	Caspofungina	0,25 – 1	0,50 $\pm$ 0.24	0,5	1
	Fluconazol	0,25 – 4	0,53 $\pm$ 1.2	0,5	2
	Voriconazol	0,0313 – 0.0625	0,03 $\pm$ 0.01	0,0313	0,0625
<i>C. orthopsilosis</i> n=3	Anfotericina B	0,5 – 1	0,63 $\pm$ 0.29	0,5	1
	Caspofungina	0,125 – 0.25	0,20 $\pm$ 0.07	0,25	0,25
	Fluconazol	0,5	0,5 $\pm$ 0	0,5	0,5
	Voriconazol	0,0313	0,0313 $\pm$ 0	0,0313	0,0313

Tabela 2. CIM, intervalo e média, de isolados de *C. parapsilosis* (sensu lato) frente aos antifúngicos anfotericina B, caspofungina, fluconazol e voriconazol. \*Média geométrica

Quanto à produção de fatores de virulência, somente dois isolados de *C. parapsilosis* e dois de *C. orthopsilosis* foram capazes de produzir hemolisina; três isolados de *C. parapsilosis* e um de *C. orthopsilosis* foram capazes de produzir proteinase e nenhum isolado produziu fosfolipase. A produção dos fatores de virulência pode ser visualizada na Figura 1.

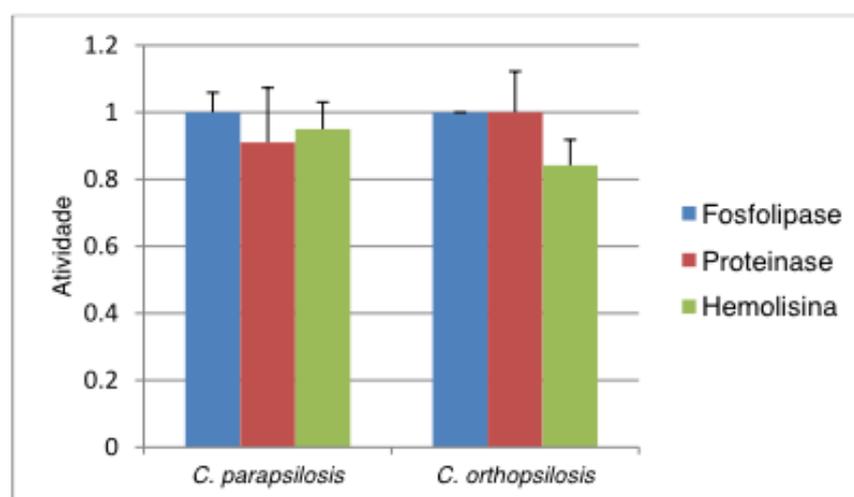


Figura 1 - Atividade das enzimas hidrolíticas extracelulares dos isolados de *C. parapsilosis* (sensu lato) obtidos de pacientes internados no Hospital das Clínicas da FMRP – USP. Fonte: o autor.

Quanto à formação de biofilme, cinco isolados de *C. parapsilosis* e dois isolados de *C. orthopsilosis* apresentaram capacidade de formação de biofilme em placas de

poliestireno, em 24h. Os valores de absorvância da atividade metabólica foram de 0,0021 a 0,0619; e os valores correspondentes à biomassa dos biofilmes foram de 0,0220 a 0,7925.

Após a formação de biofilme, a sensibilidade aos antifúngicos foi reduzida, e em muitos casos os isolados se tornaram resistentes. Os resultados estão descritos na tabela 3.

Espécie	Antifúngico	CIMb ( $\mu\text{g/mL}$ )	
		Intervalo CIMb 50	Intervalo CIMb 80
<i>C. parapsilosis</i> n=5	Anfotericina B	0,5 - 128	4 - 128
	Caspofungina	0,5 - 8	2 - 128
	Fluconazol	32- 2018	64 - >2018
	Voriconazol	0,5 - > 512	1 - > 512
<i>C. orthopsilosis</i> n=2	Anfotericina B	1 - 8	8 - 32
	Caspofungina	0,25 - 2	0,5 - 128
	Fluconazol	32 - 128	64 - 1024
	Voriconazol	32 - 128	128

Tabela 3. Intervalo de CIMb para isolados de *C. parapsilosis* (sensu lato) aos antifúngicos anfotericina B, caspofungina, fluconazol e voriconazol.

Agenotipagem por PFGE gerou 17 PFGE-tipos, com um Índice de Discriminação de 1,0. Um limite de similaridade de 75% dividiu os isolados em três grupos, correspondentes às três espécies do complexo. Dois grupos de isolados de *C. parapsilosis* e um grupo de isolados de *C. orthopsilosis* foram considerados geneticamente relacionados: PFGE-A (isolados 5 e 6), PFGE-B (isolados 3, 8, 10, 11, 14) e PFGE-C (isolados 12 e 13) (Figura 2). Os isolados do grupo PFGE-A foram isolados no mesmo mês, de pacientes do sexo feminino que apresentaram antibioticoterapia e cirurgia como fatores de risco. Os isolados do grupo PFGE-B foram isolados de pacientes que fizeram uso de acesso venoso central. Já os isolados do grupo PFGE-C foram isolados de pacientes do sexo feminino, internadas em UTIs (em unidades diferentes), que fizeram uso de antibioticoterapia, acesso venoso central e nutrição parenteral e apresentaram um desfecho positivo para o episódio de candidemia.

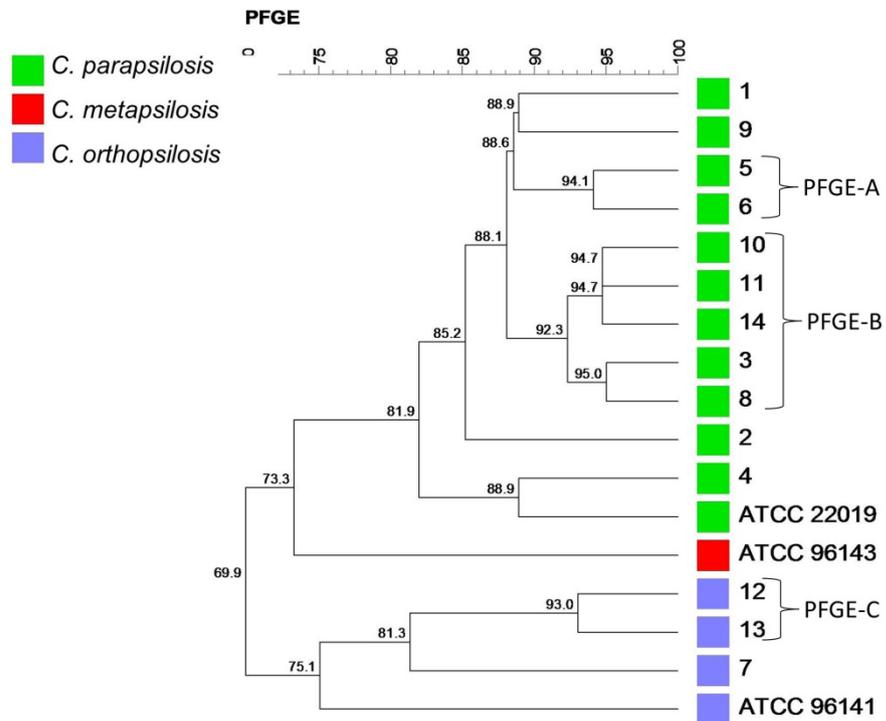


Figura 2 – Dendrograma de similaridade genética gerado a partir do perfil de bandas, obtido pela técnica de PFGE, para os 14 isolados de *C. parapsilosis* (sensu lato) estudados. Fonte: o autor

Os resultados de MLP não indicaram isolados geneticamente idênticos ou relacionados (Figura 3). O índice de discriminação dessa técnica foi 1.

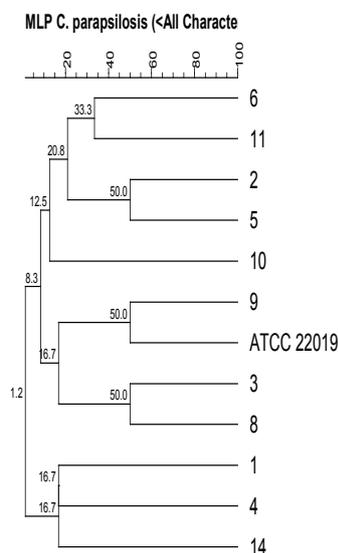


Figura 3 - Dendrograma de similaridade genética, gerado a partir do polimorfismo de microssatélites, para os 11 isolados de *C. parapsilosis* estudados. Fonte: o autor

## 4 | DISCUSSÃO

A candidemia é uma doença importante no mundo todo e é associada a altas taxas de mortalidade, prolongamento do tempo de hospitalização e altos custos

hospitalares (SARDI et al., 2013; PEMÁN; QUINDÓS, 2016). As infecções provocadas por *C. parapsilosis*, tornaram-se mais frequentes nos últimos anos e superaram aquelas provocadas por *C. albicans* em alguns locais (ŞULAR et al., 2018; KATO et al., 2019; SUN et al., 2019). As práticas hospitalares, bem como o perfil dos pacientes atendidos, influenciam na incidência de candidemia, o que torna os estudos locais fundamentais (YAPAR, 2014; VALLABHANENI et al., 2016).

Como esperado, a incidência de *C. parapsilosis* foi maior do que de *C. orthopsilosis*. Ainda, não houve candidemia provocada por *C. metapsilosis*. O mesmo foi observado por Blanco-Blanco e colaboradores (2014) e Taj-Aldeen e colaboradores (2014). Entretanto, Chen e colaboradores (2010) relataram incidência semelhante entre *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis*. No estudo de Tsai e colaboradores (2018), em um hospital pediátrico, a incidência de *C. metapsilosis* foi maior que de *C. orthopsilosis*.

A média de idade dos pacientes acometidos por *C. orthopsilosis* foi menor que um ano e, apesar do número reduzido de isolados, esse resultado é semelhante a estudos anteriores (BLANCO-BLANCO et al., 2014, TAJ-ALDEEN et al., 2014). Já os pacientes acometidos por *C. parapsilosis* apresentaram média de idade superior, 32 anos. Sun e colaboradores (2019) observaram uma média de idade de 55,5 anos em pacientes com câncer acometidos por candidemia por *C. parapsilosis*. Entretanto, no estudo de Şular e colaboradores (2018), a incidência de *C. parapsilosis* foi maior entre os pacientes pediátricos.

Os fatores de risco são comuns em pacientes com candidemia e, no presente estudo, a maioria dos pacientes apresentou um ou mais desses fatores. No estudo de Sun e colaboradores (2019), neutropenia e uso de nutrição parenteral foram relacionados como fatores de risco para o desenvolvimento de candidemia por *C. parapsilosis* e a presença de neoplasias hematológicas também foi relacionada com episódios de candidemia provocados por essa espécie. A relação entre uso de nutrição parenteral e o desenvolvimento de candidemia por *C. parapsilosis* já foi reconhecido em vários estudos: essa espécie apresenta facilidade de desenvolvimento em soluções para nutrição parenteral (BLANCO-BLANCO et al., 2014). No presente estudo, mais da metade dos pacientes acometidos por *C. parapsilosis* fizeram uso de nutrição parenteral, entretanto, somente um paciente apresentava neoplasia hematológica como doença de base. Quanto aos pacientes acometidos por *C. orthopsilosis*, dois terços fizeram uso de nutrição parenteral. No estudo de Blanco-Blanco e colaboradores (2014), todos os pacientes acometidos por *C. orthopsilosis* fizeram uso desse tipo de nutrição; entretanto, menos da metade dos pacientes acometidos por *C. parapsilosis* apresentaram esse fator de risco.

A taxa de mortalidade total não apresentou diferença significativa entre as duas espécies e foi de 35,7%. A espécie *C. parapsilosis* já foi relacionada a menores taxas de mortalidade quando comparadas a outras espécies envolvidas em episódios de candidemia (KATO et al., 2019). A taxa de mortalidade obtida para *C. orthopsilosis* foi igual à obtida no estudo de Tsai e colaboradores (2018).

A suscetibilidade aos antifúngicos é essencial para o sucesso do tratamento. No presente estudo, apenas um isolado de *C. parapsilosis* apresentou suscetibilidade dose-dependente ao fluconazol. No estudo de Sun e colaboradores (2019), todos os isolados dessa espécie apresentaram-se suscetíveis aos antifúngicos testados. Alguns estudos com *C. parapsilosis* reportaram diminuição da atividade dos antifúngicos azólicos frente a essa espécie (PERLIN; SHOR; ZHAO, 2015; SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLÖRL, 2015). Tsai e colaboradores (2018) observaram boa atividade de anfotericina B, caspofungina e voriconazol frente aos isolados de *C. orthopsilosis*, entretanto, um isolado dessa espécie apresentou sensibilidade reduzida ao itraconazol.

A produção de fatores de virulência é parte importante do processo de infecção. No presente estudo, poucos isolados foram capazes de produzir hemolisina e proteinase e nenhum foi capaz de produzir fosfolipase. A produção desses fatores é bem estabelecida em *C. albicans*, que é relatada em vários estudos como a principal produtora dos mesmos (TAY et al., 2011; DE LUCA et al.; 2012; MUTLU SARIGUZEL et al., 2015).

Acredita-se que a maioria das infecções causadas por *Candida* spp. envolva a formação de biofilme na superfície de tecidos e em implantes médicos (ROSATO et al., 2016). No presente estudo, 50% dos isolados foram classificados como formadores de biofilme. Os resultados da atividade metabólica de biofilmes de *C. parapsilosis* (*latu sensu*) podem ser difíceis de discutir devido à alta variabilidade intrínseca, e o fato de que a atividade metabólica não reflete necessariamente a quantidade de biomassa (BRILHANTE et al., 2019). Quando em biofilmes, a maioria dos isolados clínicos foi resistente aos antifúngicos testados, considerando-se os valores de pontos de corte determinados pelo CLSI para células planctônicas, já que não há, até o momento, valores estabelecidos para biofilmes fúngicos.

As técnicas de genotipagem são utilizadas para a elucidação de rotas de transmissão, bem como para avaliar a variabilidade genética dos isolados. No presente estudo, as técnicas de PFGE e MLP geraram resultados conflitantes: enquanto a técnica de PFGE gerou grupos de isolados geneticamente relacionados, a técnica de MLP resultou em alta variabilidade genética. Enquanto alguns relataram menor variabilidade genética entre isolados de *C. parapsilosis*, outros encontraram maior variabilidade entre isolados dessa espécie (CHEN et al., 2010; MIRANDA et al., 2012; Da SILVA RUIZ et al., 2013; BARBEDO et al., 2015; MAGOBO et al., 2017). Esses resultados divergentes mostram a importância de se utilizar técnicas baseadas em diferentes princípios para avaliar a variabilidade genética dos isolados.

## 5 | CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo mostram que a espécie *Candida parapsilosis* é a mais frequente do complexo em episódios de candidemia no hospital estudado.

Entretanto, estudos contínuos são necessários para monitorar e investigar a epidemiologia e sensibilidade das espécies do complexo *Candida parapsilosis*, uma vez que as mesmas são fenotipicamente indistinguíveis e podem ser erroneamente identificadas. Ainda, o uso de diferentes técnicas é importante quando a variabilidade genética dos isolados for pesquisada. Finalmente, apesar de muitos dos resultados obtidos serem semelhantes aos de outros estudos, diferenças foram encontradas, confirmando que estudos locais são essenciais para o desenvolvimento de estratégias que contribuam para a diminuição da incidência dessa doença, bem como técnicas de manejo para a mesma.

## 6 | AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-2013/23485-0 e 2014/10628-0) pelo suporte financeiro, à Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS) pela cessão da linhagem *C. metapsilosis* INCQS 40329 (ATCC 96143), ao Professor Doutor Roberto Martinez e à farmacêutica Lúcia Vitali pela cessão dos isolados clínicos, e à Professora Doutora Juliana Pfrimer Falcão e à Doutora Miliane Rodrigues Frazão pelo auxílio na realização das técnicas de genotipagem.

## REFERENCIAS

- ABDELJELIL, J. et al. Molecular typing of *Candida albicans* isolates from patients and health care workers in a neonatal intensive care unit. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 5, p. 1235-1249, 2011.
- BARBEDO, L. S. et al. Different scenarios for *Candida parapsilosis* fungaemia reveal high numbers of mixed *C. parapsilosis* and *Candida orthopsilosis* infections. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. Pt 1, p. 7-17, 2015.
- BLANCO-BLANCO, M. T. et al. *Candida orthopsilosis* fungemias in a Spanish tertiary care hospital: incidence, epidemiology and antifungal susceptibility. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 31, n. 2, p. 145-148, 2014.
- BRILHANTE, R. S. N et al. Exposure of *Candida parapsilosis* complex to agricultural azoles : An overview of the role of environmental determinants for the development of resistance. **Science of the Total Environment**, v. 650, n. Pt 1, p. 1231-1238, 2019.
- CHEN, K. W et al. Comparison of four molecular typing methods to assess genetic relatedness of *Candida albicans* clinical isolates in Taiwan. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, n. Pt 3, p. 249-258, 2005.
- CHEN, Y. C. et al. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis* sensu stricto, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in Taiwan. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 68, n. 3, p. 284-292, 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**. Approved Standard M27-A3. Wayne: CLSI, 2008.

\_\_\_\_\_. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Forth Informational Supplement.** CLSI document M27-S4. Wayne: CLSI, 2012.

\_\_\_\_\_. **Epidemiological Cutoff Values for Antifungal Susceptibility Testing.** CLSI document M59. Wayne: CLSI, 2016.

DA SILVA RUIZ, L. et al. Outbreak of fungemia caused by *Candida parapsilosis* in a neonatal intensive care unit: molecular investigation through microsatellite analysis. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 30, n. 2, p. 112-115, 2013.

DE LUCA, C. et al. Candidemia: species involved, virulence factors and antimycotic susceptibility. **New Microbiologica**, v. 35, n. 4, p. 459-468, 2012.

FENG, X. et al. Identification and differentiation of *Candida parapsilosis* complex species by use of exon-primed intron-crossing PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1758-1761, 2014.

GONG, X. et al. Invasive candidiasis in intensive care units in China: Risk factors and prognoses of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* infections. **American Journal of Infection Control**, v. 44, n. 5, p. e59-63, 2016.

HEO, S. M. et al. Genetic relationships between *Candida albicans* strains isolated from dental plaque, trachea, and bronchoalveolar lavage fluid from mechanically ventilated intensive care unit patients. **Journal of Oral Microbiology**, v. 3, 2011.

HUNTER, P. R.; GASTON, M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 11, p. 2465-2466, 1988.

KATO, H. et al. Mortality and risk factor analysis for *Candida* blood stream infection: A multicenter study. **Journal of Infection and Chemotherapy**, 2019.

LUO, G.; SAMARANAYAKE, L. P.; YAU, J. Y. *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 8, p. 2971-2974, 2001.

MAGOBO, R. E. et al. Detection of neonatal unit clusters of *Candida parapsilosis* fungaemia by microsatellite genotyping: Results from laboratory-based sentinel surveillance, South Africa, 2009-2010. **Mycoses**, v. 60, n. 5, p. 320-327, 2017.

MANE, A. et al. Increased expression of virulence attributes in oral *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-positive individuals. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. Pt 2, p. 285-290, 2012.

MIRANDA, L. et al. *Candida parapsilosis* candidaemia in a neonatal unit over 7 years: a case series study. **BMJ Open**, v. 2, n. 4, 2012.

MUTLU SARIGUZEL, F. et al. Investigation of the relationship between virulence factors and genotype of *Candida* spp. isolated from blood cultures. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 8, p. 857-864, 2015.

PANNANUSORN, S.; FERNANDEZ, V.; RÖMLING, U. Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of *Candia* species causing bloodstream infection. **Mycoses**, v. 56, p. 264-272, 2013.

PEMÁN, J.; QUINDÓS, G. Current aspects of invasive diseases caused by *Candida* and other yeast fungi. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 33, n. 3, p. 133-139, 2016.

PERLIN, D. S.; SHOR, E.; ZHAO, Y. Update on Antifungal Drug Resistance. **Current Clinical Microbiology Reports**, v. 2, n. 2, p. 84-95, 2015.

PFALLER, M. A. et al. Triazole and echinocandin MIC distributions with epidemiological cutoff values for differentiation of wild-type strains from non-wild-type strains of six uncommon species of *Candida*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 11, p. 3800-3804, 2011.

PIERCE, C. G. et al. A 96 well microtiter plate-based method for monitoring formation and antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. **Journal of Visualized Experiments**, v. 44, p. e.2287, 2010.

QUINDÓS, G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 31, p. 42-48, 2014.

ROSATO, A. et al. In vitro interactions between anidulafingina and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on biofilms of *Candida* spp. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 24, v. 5, p. 1002-1005, 2016.

SABINO, R. et al. New Polymorphic Microsatellite Markers Able to Distinguish among *Candida parapsilosis* Sensu Stricto Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 1677-1682, 2010.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS-FLÖRL, C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v. 58, Suppl 2, p. 2-13, 2015.

SARDI, J. C. O. et al. A Mini Review of *Candida* Species in Hospital Infection: Epidemiology, Virulence Factor and Drugs Resistance and Prophylaxis. **Tropical Medicine & Surgery**, v. 1, n. 5, p. 141, 2013.

SHIN, J. H. et al. Electrophoretic karyotype analysis of sequential *Candida parapsilosis* isolates from patients with persistent or recurrent fungemia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 1258-1263, 2001.

SILVA, S. et al. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. **Medical Mycology**, v. 47, n. 7, p. 681-689, 2009.

ŞULAR, F. L. et al. Invasive Fungal Infection in Romania: Changing Incidence and Epidemiology During Six Years of Surveillance in a Tertiary Hospital. **Mycopathologia**, v. 183, n. 6, p. 967-972, 2018.

SUN, M. et al. Increase in *Candida parapsilosis* Candidemia in Cancer Patients. **Mediterranean Journal of Hematology and Infection Disease**, v. 11, n. 1, p. e2019012, 2019.

TAJ-ALDEEN, S. J. et al. Epidemiology of candidemia in Qatar, the Middle East: performance of MALDI-TOF MS for the identification of *Candida* species, species distribution, outcome, and susceptibility pattern. **Infection**, v. 42, n. 2, p. 393-404, 2014.

TAVANTI, A. et al. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 284-292, 2005.

TAY, S. T. et al. Proteinase, phospholipase, biofilm forming abilities and antifungal susceptibilities of Malaysian *Candida* isolates from blood cultures. **Medical Mycology**, v. 49, n. 5, p. 556-560, 2011.

TSAI, M. H. et al. Candidemia due to uncommon *Candida* species in children: new threat and impacts on outcomes. **Scientific Reports**, v. 8, p. 15239, 2018.

VALLABHANENI, S. et al. The Global Burden of Fungal Diseases. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 1-11, 2016.

YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 10, p. 95-105, 2014.

ZICCARDI, M. et al. *Candida parapsilosis* (sensu lato) isolated from hospitals located in the Southeast of Brazil: Species distribution, antifungal susceptibility and virulence attributes. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 305, n. 8, p. 848-859, 2015.

## BIORREMEDIAÇÃO DE MANGUEZAL CONTAMINADO COM PETRÓLEO COM OBTENÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM BIOPOLÍMEROS E PEPTÍDIOS CRISTALIZADOS

### Odete Gonçalves

Universidade Federal da Bahia, Departamento de Ciências da Biointeração, Instituto de Ciências da Saúde UFBA. SS-BA.

### Paulo Fernando de Almeida

Universidade Federal da Bahia, Departamento de Ciências da Biointeração, Instituto de Ciências da Saúde, UFBA. SS-BA.

### Cristina Maria A. L. T. M. H. Quintella

Universidade federal da Bahia, Departamento de Físico/Química, Instituto de Química. Universidade Federal da Bahia, UFBA. SS-BA.

### Ana Maria Álvares Tavares da Mata

Instituto Politécnico de Setúbal. Escola Superior de Tecnologia de Setúbal, IPS/Portugal

**RESUMO:** Nesse trabalho relata-se o processo biotecnológico de biorremediação de manguezal impactado com petróleo, através de consórcio microbiano, com produção de bioativos utilizando coprodutos de biocombustível, fungos *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp. Esses compostos nutrem as células fúngicas, permitem seu crescimento e geração de bioativos. Fez-se a semeadura do consórcio para repique em 10 Placas Petri. Após 3 meses ocorreu nestes a síntese dos bioativos cristalizados. Paralelamente foi realizado um consórcio microbiano de biorremediação por 67 dias, em tanque/aquário obtendo-se a

produção de biopolímeros protéicos. Foi feito a desinfecção em autoclave para posterior análise, observando-se as interações e reações orgânicas oxidativas, redutivas e hidrolíticas. O biopolímero seco em estufa foi analisado para orgânicos em Infravermelho (FT-IR), Fluorescência Molecular e Difractometria de Raios-X, Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV/EDS para elementos inorgânicos. Obteve-se para FT-IR as bandas CO,  $1.665\text{ cm}^{-1}$  típico de amida I; C-N,  $1560\text{ cm}^{-1}$  à amida II, em  $1235\text{ cm}^{-1}$  típico para amida III (derivadas de ácido carboxílico). Foram realizados os testes de investigação de proteína e antimicrobiano com reagente Comassie com aplicação do protocolo de identificação pelo método Bradford, obtendo resultado positivo. Outro teste antimicrobiano PCA com solução Tampão Tris, para bactéria *Escherichia coli*, obteve-se positivo para amostra 4 e 7. Feita a padronização da técnica de produção das moléculas de amida cristalizada, para aplicação biotecnológica industrial e fármacos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biorremediação. Biopolímero. Consórcio microbiano. Antimicrobiano. Fungos.

**ABSTRACT:** This work reports the biotechnological process of bioremediation of mangrove impacted with oil, through a microbial consortium, with the production of bioactives

using co-products of biofuel, fungi *Aspergillus* spp and *Penicillium* spp. These compounds nourish the fungal cells, allow their growth and bioactive generation. The consortium was sown to peal in 10 Petri dishes. After 3 months, the synthesis of the crystallized bioactives occurred. In parallel, a microbial consortium of bioremediation was carried out for 67 days, in a tank / aquarium obtaining the production of protein biopolymers. The autoclave was disinfected for further analysis, observing the oxidative, reductive and hydrolytic interactions and organic reactions. The greenhouse dried biopolymer was analyzed for organic in Infrared (FT-IR), Molecular Fluorescence and X-ray Diffraction, Scanning Electron Microscopy - SEM/EDS for inorganic elements. The CO bands were obtained for FT-IR, 1.665 cm<sup>-1</sup> typical of amide I; C-N, 1560 cm<sup>-1</sup> to amide II, in typical 1235 cm<sup>-1</sup> for amide III (derived from carboxylic acid). The protein and antimicrobial tests were carried out with Comassie reagent with application of the Bradford method, obtaining a positive result. Another PCA antimicrobial test with Tris Buffer solution for *Escherichia coli* bacterium was positive for sample 4 and 7. Standardized the production technique of crystallized amide molecules for industrial biotechnological application and drugs.

**KEYWORDS:** Bioremediation. Biopolymer. Microbial consortium. Antimicrobial. Fungi.

## 1 | INTRODUÇÃO

É conhecido da literatura técnica especializada que os manguezais são ecossistemas costeiros abrigados que ocorrem no encontro das águas dos rios com água do mar, sendo assim sujeitos ao regime das marés. Eles se desenvolvem em regiões de alta temperatura e precipitação em terrenos apropriados. No entanto, sua vegetação não é rica em diversidade, sendo composta por árvores e arbustos pertencentes a famílias que apresentam grande tolerância a águas salgadas e salobras. Ecossistemas de manguezal são grandemente sensíveis a distúrbios antrópicos como a contaminação por petróleo ou por outros produtos tóxicos, que podem causar danos a toda a biota, exercendo impacto por longo prazo.

Neste sentido, pode-se afirmar que a biorremediação é uma técnica que se mostra promissora para a recuperação de manguezais contaminados por hidrocarboneto (BENTO et al., 2003; DUA et al., 2002; RAHMAN et al., 2002; Xu, et al.; 2005). A transformação dos hidrocarbonetos pelos microrganismos pode ser facilitada pela produção de enzimas como catalisadores biológicos que controlam as reações bioquímicas, produzindo energia e material para a proliferação de novas células microbianas (UÑA e GARCIA, 1983). Os fungos produzem enzimas extracelulares oxidativas capazes de quebrar compostos policíclicos aromáticos de cadeia longa e transformá-los em compostos assimiláveis ao seu metabolismo (MARIANO, 2006). Estas enzimas hidrolisam ligações peptídicas, liberando peptídeos que são degradados a aminoácidos livres (RODWELL, 2009). A biorremediação através de processos de óxido-redução atinge a degradação e a mineralização de hidrocarbonetos policíclicos

aromáticos e de compostos fenólicos em solo de manguezal impactado com petróleo e outros (BR PI 221109478199, GONÇALVES, O.; QUINTELLA, C. M.; TRIGUI, J. A.; 2011). Isto se verifica quando o processo de transformação das substâncias, inicialmente, em fermentação, emite dispersão de gases (partículas menores). Em seguida, dá-se o efeito das emulsões, passando para a água as partículas solúveis com trocas iônicas e, finalmente, acontece, no substrato, as transformações físico-químicas produzidas pelos microrganismos para metabolismo, assimilação (BR PI1105932-0, QUINTELLA; GONÇALVES, 2011).

Em seus estudos os autores, apontam os fungos endófitos em processos de simbiose como produtores de enzimas hidrolases como fundamental fonte de catalisadores biológicos atualmente com aplicação nas mais diversas indústrias (BAGCHI E BANERJEE (2013), PINHEIRO et al.; 2013). As xilanases como indispensáveis bioconversores de compostos lignocelulósicos que degradam o polissacarídeo linear hidrolisando ligações (Beta)  $\beta$ -(1,4) da molécula de xilana (DELAYE et al., 2013). As enzimas fúngicas como as xilanases estão sendo apontadas como um produto bio sustentável com ampla aplicação devido a especialidade catalítica, estabilidade e alta atividade (GASPAR JÚNIOR, 2014). O que é confirmado recentemente por Elegbede e Lateef (2018) a produção de xilanase por diferentes linhagens de *Aspergillus* spp dentre eles as espécies *Aspergillus niger* L3, *A. fumigatus* SD5A e *A. flavus* SD4A.

O teste de determinação de proteína pelo método de Bradford, (1976) e Teste antimicrobiano (Jornal (anexo) EC 761/2009) são técnicas atualmente muito utilizadas para a determinação de proteínas totais com o apoio auxiliar do corante de “Coomassie brilliant blue” BG-250. São utilizados apontamentos da absorvência em UV-VIS em 595 nm (COMPTON, 1985), com solução Tampão Tris e Azul de Comassie (proteínas e Teste PCA antimicrobiano) se observando ambiente estéril.

Neste trabalho, apresentar-se o processo de biorremediação com produção de biopolímero e cristais residuais com atividade antimicrobiana decorrente da biotransformação de energia vegetal armazenada em células dos fungos que metabolizam os contaminantes e devolvem ao ambiente o residual sintetizado com aplicação em fármacos e medicinais.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente foi investigado a presença de nitrogênio e orgânicos que compõem as proteínas e compostos orgânicos. Importante esclarecer que este trabalho foi desenvolvido de modo similar à patente “Processo microbiológico para captura de voláteis e produção de biopolímero proteico”, depósito UFBA BR PI 1105932-0, 2011. O trabalho foi realizado no Instituto de Ciências da Saúde (ICS/UFBA) Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Microrganismos (LABEM).

**A área de estudo** - No tocante a delimitação do problema, o sedimento

manguezal e a solução salina foram coletados na porção nordeste da Baía de Todos os Santos (BTS), às margens do Rio São Paulo, próximo à estação Pedra Branca, nas coordenadas 12° 44' 26,0" (S) e 38° 31' 53,9", o qual desagua na BTS. Encontrase nestas imediações as instalações da Refinaria Landulfo Alves Mataripe, a qual ao longo das décadas vêm tornando crescente os contaminantes como hidrocarbonetos (HC). Esta área fica situada entre os municípios de Madre de Deus, Candeias e São Francisco do Conde, do sistema Bioma Mata Atlântica no ecossistema manguezal, inserida na Bacia sedimentar do Recôncavo Baiano.

**O processo de biorremediação e a contribuição do consórcio** - Na biorremediação utilizou-se um consórcio de subprodutos de biocombustíveis – glicerina bruta e torta de mamona – empregados como bioestímulo e associados aos fungos *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. Destaca-se, neste caso, o uso da torta de mamona, oriunda da *Ricinus communis*, como uma fonte de energia para os microrganismos heterotróficos, modificando a atividade enzimática. A cisteína é uma metalo-protease que usa um íon metal no seu mecanismo catalítico e hidrolisa as proteínas em aminoácidos, facilitando a sua absorção pelas células, possui um papel despolimerizante (ALVAREZSANCHEZ et al., 2000). Para a quebra das cadeias poliméricas e conseqüentemente a sua bioassimilação, os microrganismos produzem as enzimas proteases as quais catalisam hidrólise de ligações peptídicas (CHANDRA, RUSTGI; 1998; SCOTT, 2000). Os autores afirmam ainda, que outras possivelmente são condicionadas para catalise da hidrólise de ligações éster. Tal processo se realiza entre outros como por exemplo nos PHAs, policíclicos alifáticos (CHANDRA, RUSTGI; 1998).

**Microrganismos caracterização** – As cepas dos fungos foram coletadas de amostras do experimental de reservatório, já acondicionadas em petróleo, e enviadas ao Laboratório de Toxicologia de Farmácia da UFBA para análise de micologia de isolamento e identificação dos fungos. Os microrganismos foram analisados através dos testes microbiológicos por técnicas de micro cultivo em Ágar batata, descrita por Lacaz (2002).

**A semeadura** - A semeadura se procedeu em 10 placas de Petri sendo utilizada como amostras comparativas com as espécies de fungos. Após os procedimentos de quantificação, foram processadas em agitador aquecedor magnético, para obtenção e distribuição das amostras em semeadura com identificadas e inoculação dos fungos, para incubação e crescimento por 7 dias.

**O processo de biorremediação** - O processo de biorremediação foi efetuado em tanque/aquários de campo, contendo 8 provetas no seu interior para armazenagem dessas amostras compostas, consórcio microbiano manguezal. O meio de produção para ensaio possuía a seguinte composição (w/w): 600 g de substrato manguezal contaminado com petróleo exsudado; 24,60 g glicerina bruta; 34,40 g de torta de mamona; e 50 mL água de produção e repiques de cepas dos fungos - *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp. Tiveram acompanhamento durante o período de 8 semanas,

monitorados os parâmetros físico-químicos dos bioestímulo não conservativos semanalmente, para acompanhar a bioaumentação, apontando o comportamento do pH e Eh e influências químicas.

**Produção de bioativos cristalizados residuais** - Os cristais são produzidos com lento aquecimento bioquímico, são sintetizando através das interações e reações orgânicas oxidativas, redutivas e hidrolíticas. O processo de cristalização acontece na superfície das amostras em placas de Petri, totalmente lacrada, após o período de 90 dias da semeadura dos fungos. Período em que se operam as mudanças físico/químicas no consórcio microbiano para biorremediação de manguezal contaminado (PI UFBA nº 1105932-0, 2011). Os cristais residuais são produzidos na parte vegetativa dos fungos, acima dos conídios das vesículas que compõe os conidióforos a partir das hifas filamentosos dos fungos. É sabido que quando os átomos se agrupam formam as moléculas das diversas substâncias cada uma com seus arranjos orbitais e características próprias. Com base no mecanismo clássico de cristalização (MULLIN, J.W., 1961), a formação de núcleos de cristais, essa etapa só ocorre na presença de corpos sólidos; os quais se transformarão em centros de nucleação (nano cristais) (GRUSE, W. A.; STEVENS, D.R., 1942).

**Caracterização dos bioativos por difratometria de raios-X** - É importante destacar o fator tempo na validação de determina os resultados dos cristais residuais. Para isso foi investigado por difratometria de raios-X a semeadura 1 aos 90 dias e a semeadura 2 após 150 dias com evolução.

**Espectrofotometria** - O método permite o monitoramento de tocoferóis, ácido butírico e outros componentes fluorescentes em óleos. Foi utilizado o equipamento Espectrofluorímetro PerkinElmer – Precisão modelo LS 55. Os espectros de emissão fluorescente das amostras foram obtidas detectando a emissão de 300 a 900 nm em intervalos de 0,5 nm enquanto a amostra sofria excitação em comprimento de onda fixos na faixa de 200 a 775 nm.

**Infravermelho (FTIR)** se utilizou o equipamento modelo FRONTIER, PerkinElmer Spectrometer número de série 91411, metodologia de medidas de absorção, acessório reflectância total (ATR), atenuada com um cristal de seleneto de zinco, resolução 4 cm<sup>-1</sup>, trans. 4000 a 650 cm<sup>-1</sup> varredura 16 scans.

**Microscopia eletrônica de varredura**, MEV/EDS foi utilizado o metalizador, marca DENTON VACUUM, modelo DESK V., com precipitação à vácuo, de película micrométrica. As imagens foram obtidas do tipo elétron secundário (SEI) e as análises químicas foram por EDS. Posteriormente, micrografia do produto biopolímero manguezal, na forma seca e gelatinosa com o espectrofotômetro marca JEOL, modelo JSM-6610LV Scanning Microspore.

**Purificação dos bioativos com testes de atividade proteica e antimicrobiana** - Este trabalho foi realizado no Instituto Politécnico de Setúbal (IPS/PO), Programa PDSE Capes 88881.134321/2016-01. Estes foram realizados através de testes de proteína e antimicrobiano, a fim de possibilitar a viabilidade de aplicação nas áreas

biotecnológicas, dentre outras, fármacos, na produção de cosméticos e medicinais.

O método de Bradford, (1976), é uma técnica atualmente muito utilizada para a determinação de proteínas totais com o apoio auxiliar do corante de “Coomassie brilliant blue” BG-250. Para este trabalho inicialmente foi feito o Reagente de Coomassie com a dissolução de 0,1 g de Azul Brilhante de Coomassie G250 em 47,0 g de etanol, adição de 85,0 g de ácido fosfórico e diluição de 1 L com água destilada. Em seguida foi observado o protocolo de identificação de aminoácidos pelo método Bradford, seguindo como pré-estabelecido para positivo como resultado a cor azul, em seguida feita a leitura da absorvência em Espectrofotômetro UV-VIS Evolution 160. Foi utilizado ainda, a solução Tampão Tris, obedecendo ao preparo da solução do Tampão Tris – HCL 0,1 m, pH 7,0 com a aplicação do método. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, emitindo sinais de absorção em 595 nm (COMPTON, 1985).

**Os antimicrobianos** - Os antimicrobianos são substâncias que agem sobre microorganismos inibindo o seu crescimento e proliferação ou mesmo causando a sua destruição, podendo ser estes naturais (antibióticos) ou sintéticas (quimioterápicos) (SÁEZ-LLORENS, 2000). Conforme dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) as, 25% das mortes em todo o mundo e 45% das mortes em todo o mundo são causadas por infecções em países com menos recursos e menos desenvolvidos (WANNMACHER, 2004). Conforme, Banhos et al., (2014), alguns dos seus fungos endofíticos, após estudos, se verificou que apresentavam atividade antimicrobiana. Para eficiência na medicação antimicrobiana, quanto ao patógeno, é necessário a confirmação da suspeita da infecção por meio de culturas positivas para microorganismos isolados e localização provável (MOTA et al., 2010).

### 3 | RESULTADOS

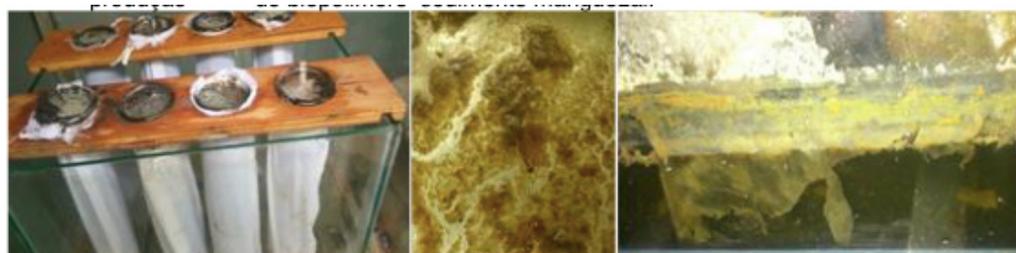
**Investigação (duplicata) de Nitrogênio Análise Elementar – CHNS (em mg/1000 ppm).** Foram obtidos positivo para Manguezal Cristal Residual (M.CR.1) com Nitrogênio 38%, Carbono 9,55, Hidrogênio 1,48 e Enxofre 0,24; para Manguezal Biopolímero Gelatinoso (M.BG.1); foi obtido percentual de Nitrogênio 33%, Carbono 6,11, Hidrogênio 4,51 e Enxofre 0,1 (REQUIMTE, Universidade Nova de Lisboa, Caparica, PT, 2017). Estes resultados orgânicos leva a possibilidade de existência de proteína nas amostras dos produtos.

Foi obtido o perfil granulométrico com centrifugação, o que permitiu um pico mais vertical e elevado com o resultado de  $D(v.05) = 23.30 \mu\text{m}$  para o sedimento manguezal. Foi bom resultado mostrando a fina granulometria do sedimento manguezal argiloso que contribui influenciando na interação dos fluidos.

**Microrganismos caracterização** - No resultado Microbiológico obteve-

se o Reino *Fungi*, do Filo Ascomycota, dos Gêneros *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp e espécies *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*. Este trabalho utiliza os fungos *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp na formulação, consórcio microbiano (CRISTINA M. QUINTELLA; ODETE GONÇALVES; PI BR 1004444-2 A2, 2010). Além disso, foi investigado com testes de toxicologia, se obtendo resultado negativo para Aflatoxinas e nenhum produtor de micotoxinas foi detectado.

**Bioprocesso para a produção do biopolímero** - A fermentação e a formação de emulsão continuavam a ocorrer, obteve-se com 25 dias formação total dos biopolímeros (Figura 1ABC), estes foram reservados de forma natural para caracterização com a identificação de Manguezal Biopolímero Gelatinoso (M.BG). O restante foi recolhido e feito um tratamento e com identificação da amostra biopolímero seco (M.BS). Ambos os biopolímeros foram levados à estufa para secagem à 37°C e aí permaneceram por 5 dias, porém com suas substâncias e compostos originais, sem desnaturar a provável proteína.



**Figura 1A, B e C. A)** Experimental Aquário com 8 provetas em processo de biorremediação; **B)** Biopolímero após retirada da solução salina; **C)** Aquário com produção de biopolímero sedimento manguezal.

Fonte: Imagem elaborada pela autora.

Como forma de biorremediação do sedimento contaminado, resultou pela ação dos fungos, a transformação de substâncias HPAs em moléculas menores e voláteis, lançadas para a solução salina, vindo a reagir com a enzima da proteína vegetal ricina da mamona uma metalo-protease. Portanto, as substâncias degradadas e os voláteis são capturados para a produção de biopolímero. Durante o período experimental foram acompanhados os parâmetros físico/químico do experimental com temperatura externa 33° C, temperatura dentro da estação de tratamento 32° C e temperatura dentro da cubeta 29° C por um período de 67 dias.

**Caracterização do biopolímero por espectrofluorimetria** - Nas análises de fluorescência molecular do biopolímero se obteve os perfis espectrofotométricos compatíveis com proteína devido a absorção ultravioleta detectada em 220 nm devido a ligação peptídica e em 280 nm para os aminoácidos. Mais especificamente na excitação 250-300<sup>h</sup> e na emissão 270-360<sup>h</sup> podendo ser fenilalanina, cisteína, cistina, metionina, triptofano, histidina e tirosina (FIGURA 2A). Sabe-se que o aminoácido glutâmico, proveniente da torta de mamona, é um neurotransmissor inibitório de ácido

no SNC. Possui como derivado o ácido  $\gamma$ -aminobutírico. Assim sendo os resultados também possuem evidências de ácido butanoico com excitação em 193<sup>f</sup> e emissão em 273<sup>f</sup> para fluorescência molecular.

Para o bioativo cristalizado, (Figura 2B) e espectros para interpretação de compostos orgânicos derivados do aminoácido Triptofano (Ácido 2-amino-3-indolpropiónico) na excitação nm 350<sup>h</sup> 380<sup>h</sup> e emissão de 400-500<sup>h</sup> 357<sup>h</sup>. Os espectros de emissão fluorescente detectaram a emissão entre 200 nm a 550 nm enquanto a amostra sofria excitação em comprimento de onda na faixa de 200 nm à 500 nm de emissão. Aminoácido glutâmico é um neurotransmissor inibitório de ácido no SNC. Possui como derivado o ácido  $\gamma$ -aminobutírico. Campbell e Halushka, 1996, afirma que a enzima S-transferase aciona o tripetídio Glutathiona dá-se a transformação bioquímica mantendo apenas a cisteína.

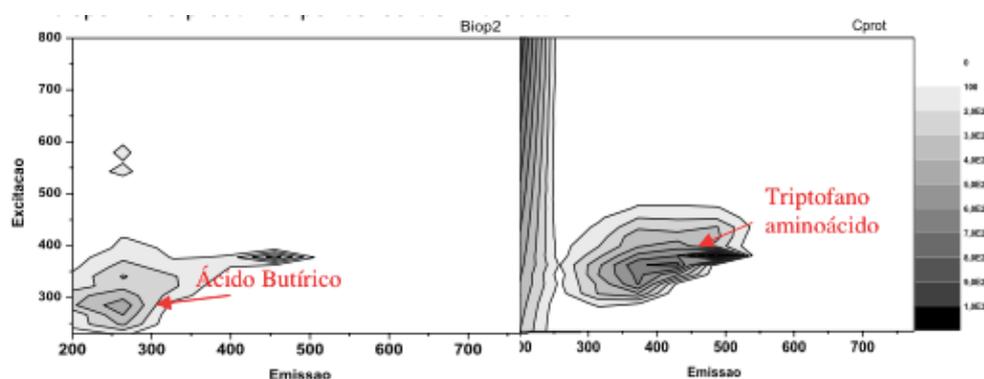


Figura 2: Perfil espectrofotométrico por mapa de fluorescência molecular de biopolímero produzido por consórcio microbiano.

Fonte: arquivo pessoal.

**Caracterização do biopolímero em infravermelho-FTIR** - No biopolímero seco após caracterização orgânica por FTIR, obteve-se os resultados para o biopolímeros 1 e 2 (seco) (Figura 3). Após estudos de identificação se atribui o número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) nas bandas de estiramento de OH na região de 3232  $\text{cm}^{-1}$ ; em 2922  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento  $\text{CH}_2$  assimétrico) atribuída a quantidade de lipídios; em 1634  $\text{cm}^{-1}$ , C=O, referentes a amida I (colágeno); banda 1028  $\text{cm}^{-1}$ , C-O de ésteres e sulfóxido e dos halogênios de Cl, Br.

Ao analisar o bioativo residual do produto microbiológico cristalizado em infravermelho, (Figura 4) obteve-se a origem orgânica do produto, destacando as bandas características de amidas em CO, 1.665  $\text{cm}^{-1}$  típico de amida I; C-N, 1560  $\text{cm}^{-1}$  à amida II, pode-se dizer que em 1637.07518 N, N- substituídas que representam a estrutura secundária da proteína. Segundo Pranoto e colaboradores (2007), a banda amida I é a banda mais interessante para estudos sobre a estrutura secundária de proteínas. apresenta sinais a 1660, 1643 e 1633  $\text{cm}^{-1}$ , correspondendo à banda Amida I (YAKIMETS *et al.*, 2005).

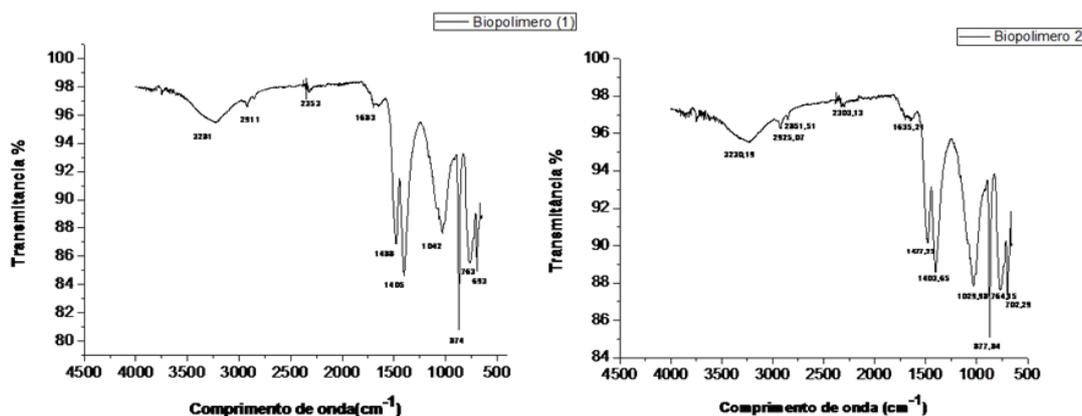


Figura 3– Caracterização de biopolimero seco 1 e 2 manglezais por FTIR.

Fonte: arquivo pessoal

O sinal a  $1660\text{ cm}^{-1}$  é característico da estrutura tripla-hélice e a  $1633\text{ cm}^{-1}$  corresponde à estrutura novelo (YAKIMETS *et al.*, 2005). De  $1700$  a  $1630$ ,  $\text{C}=\text{O}$  de amidas; levando em consideração o gráfico, pode-se identificar os picos que indicam no comprimento de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) de  $3.600$  a  $2.700$ , a absorção de átomos de  $\text{C-H}$ ,  $\text{O-H}$  e  $\text{N-H}$ ; em  $1.400$   $\text{C-Halogenios}$ ,  $\text{C-Cl}$ ,  $\text{C-Br}$ ; em  $1.311$ ,  $\text{SO}_2$ ; - em  $1.347$   $\text{C-O}$  de ácidos carboxílicos; em  $1.037$   $\text{S}=\text{O}$  sulfóxido. Estudos indicam a região da AMIDA II ( $1483\text{-}1595\text{ cm}^{-1}$ ) esta surge na sequência dos modos normais de vibração  $\text{C-N-H}$  e estiramentos  $\text{C-N}$  dos peptídeos, podendo conter ligações peptídicas; mais precisamente em  $1557$  e  $1591\text{ cm}^{-1}$  atribui-se as presenças de olefinas, fenilalanina e tirosina, respectivamente (CASPERS *et al.*, 1998; PENTEADO *et al.*, 2008; TFAYLI *et al.*, 2007); já a banda dos modos vibracionais centrada em  $1440\text{ cm}^{-1}$  refere-se à presença de lipídeos e proteínas e apresentam como função impermeabilizar, prevenindo a perda de água (CASPERS *et al.*, 1998; PENTEADO *et al.*, 2008; TFAYLI *et al.*, 2007).

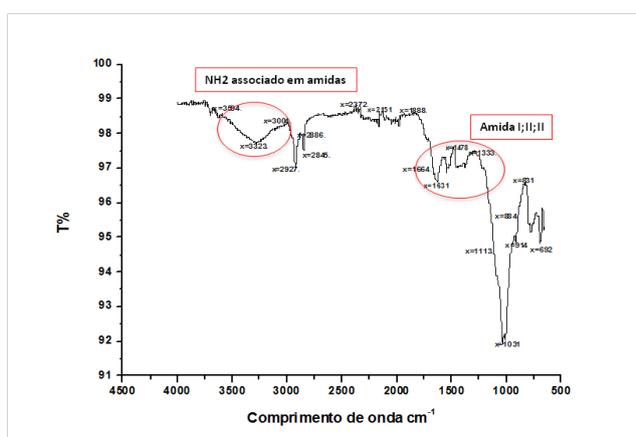


Figura 4– Caracterização de cristal residual manglezal por FTIR

Fonte: arquivo pessoal

## Difratometria de raios-X. Foram caracterizados os bioativos cristais residuais

para inorgânicos por difratometria de raios-X no qual se observou que o fator tempo influência o diâmetro nas estruturas cristalinas com maior forma em tamanho. Através desta análise identificou-se a presença do mineral Halita (NaCl), proveniente da solução salina (água do mar). Entretanto, agregam, em sua composição, outros compostos reativos minerais existentes no manguezal. O espectro mostrou os picos 4.04 H; 3.35 H; 2.86 H; 2.82 H; 1.99 H; 1.62 H, até 90 dias. Após este período picos 4.2 Qz e 3.34 Qz além dos outros já existentes.

**Caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura (EDS)** - Foram caracterizados os biopolímeros e cristais residuais em microscopia eletrônica de varredura MEV/EDS, utilizando as siglas (Bio\_gel), (Bio\_sec), (cristal res 16) com apontamentos de peso total e % atômico dos inorgânicos existentes (Tabela 1). No mapa químico foi obtido a composição, quantificação, distribuição mineral dos elementos cromóforos existentes no biopolímero gelatinoso e seco, e no bioativo cristal residual, destacando Carbono, Oxigênio, Cloro, Sódio, Alumínio, Magnésio, Cálcio, Ferro entre outros.

Na amostra (CR\_16) cristal residual manguezal, se observa uma maior quantidade de carbono inorgânico capturado um percentual de 86.73 Wt%, este resultado contribuiu para uma maior investigação e depósito da “PI BR 10 2014 0192018, Processo de Purificação de Carbono Mineral em Cristal de Halita Sintetizado em Biorremediação de Manguezal com Aplicação em Biotecnologia”.

Isto se atribui a volatilização dos hidrocarbonetos de cadeias menores de 10 carbonos em forma de gás condensados (aprisionados) nos cristais de halita, em processo de biotransformação biogeoquímica e inorgânicos. Em MEV/EDS por BSE, com a composição mineral da amostra Bio\_sec), destacando o oxigênio, o carbono em reação com o ferro, no composto biológico na presença de enxofre.

Amostra	Bio_gel		Bio_sec		Cristal_ Res16		Manguezal
Biorreat	Aquário		Aquário		Placa Petri		Etiqueta
Peso	Wt%	Atômico %	Wt%	Atômico %	Wt%	Atômico %	Padrão
C	11.2	22.34	44.39	58.80	86.73	91.44	C Vit
O	6.1	9.13	29.07	28.91	8.4	6.65	SiO <sub>2</sub>
Na	33.43	34.84	4.16	2.88	0	0	Albite
Mg	1.21	1.19	1.02	0.67	0.62	0.32	MgO
Al	0.23	0.20	0.87	0.51	0.16	0.07	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Si	0.49	0.42	1.10	0.62	0.66	0.30	SiO <sub>2</sub>
S	0	0	1.31	0.65	1.82	0.72	FeS <sub>2</sub>
P	0	0	1.48	0.76	0	0	GaP
Cl	45.62	30.83	6.27	2.82	0.89	0.32	NaCl
K	0.84	0.51	0.67	0.27	0	0	KBr
Ca	0.88	0.52	3.11	1.24	0.21	0.07	Wollastonite
Fe	0	0	6.54	1.86	0.52	0.12	Fe

Amostra	Bio_gel	Bio_sec		Cristal_ Res16		Manguezal	
Biorreat	Aquário	Aquário		Placa Petri		Etiqueta	
Peso	Wt%	Atômico %	Wt%	Atômico %	Wt%	Atômico %	Padrão
Total	100		100		100		

Tabela 1 - Demonstrativo da quantificação elementar em peso de análise em MEV/EDS de biopolímero gelatinoso, biopolímero seco e cristal residual manguezal

Fonte: Própria autoria.

A eletromicrografia/EDS apresenta o biopolímero gelatinoso em 50 $\mu$ m textura intrínseca, destacando hifas de fungos de forma cilíndrica e os elementos inorgânicos (Figura 5A) com evidências da presença de colágeno já citado nas análises de orgânicos em FT-IR. Na Figura 5B MEV/EDS com mapeamento da composição, quantificação, mineral dos elementos cromóforos Cloro, Sódio devido a solução salina mais os elementos Carbono, Oxigênio, Magnésio, Cálcio.

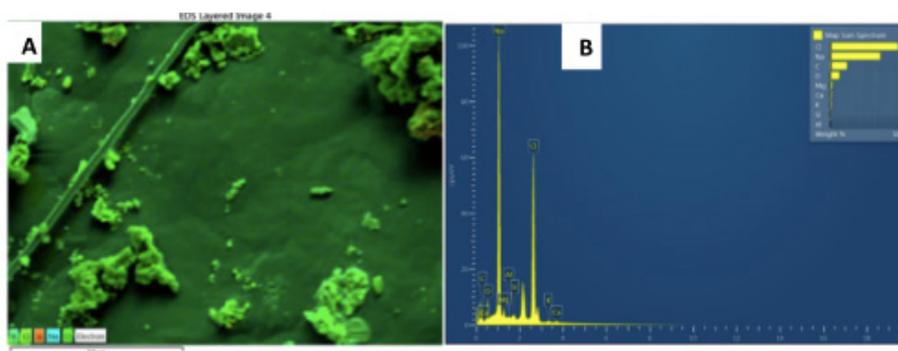


Figura 5A e B. A - Eletromicrografia/EDS com imagem de hifa microbiana no biopolímero gelatinoso em 50 $\mu$ m, indicando as cores dos elementos inorgânicos da parte tecidual do produto. B) Espectro de microscopia eletrônica de varredura/EDS em BSE com a composição mineral do biopolímero gelatinoso manguezal, destacando Cloro e Sódio, seguido de Carbono e Oxigênio.

Autor: Dados da pesquisa.

O radical OH $\cdot$  é citado como altamente oxidante em reações rápidas e inespecíficas com distintos substratos, podendo assim potencialmente reagir com todos os tipos indistintamente de moléculas biológicas (AGUIAR; FERRAZ, 2007; MYLONA; POLIDOROS, 2010). Em investigação a amostra biopolímero seco (Bio\_sec) (Figura 6ABC), apresentou em imagem de eletromicrografia hifas fungicas com abertura cilíndrica, visualizando textura tecida à nível nanométrico.

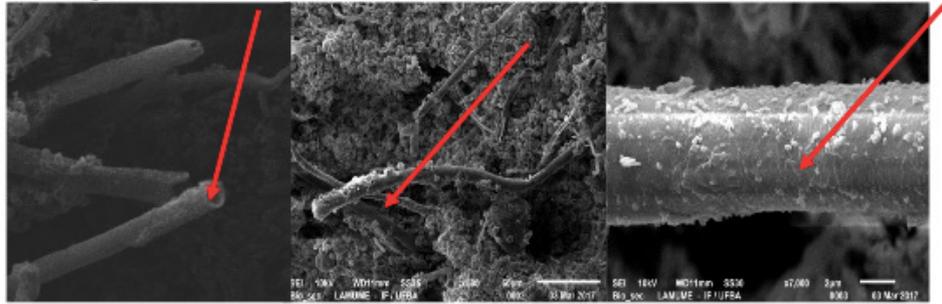


Figura 6BC – A Imagem de eletromicrografia apresenta hifas de fungos no biopolímero com abertura cilíndrica; B Imagem em SEI aumentada em x500 com 50 $\mu$ m; C Eletromicrografia/MEV de hifa com aumento em x7.000 com 2 $\mu$ m produzida pelos fungos.

Fonte: arquivo pessoal, dados da pesquisa.

Tal produto foi visualizado para estudo em SEI imagem de eletromicrografia/EDS, inicialmente em 50 $\mu$ m depois em 2 $\mu$ m garantindo uma boa imagem, mostrou evidência de ser produzido a nível molecular por retenção e aglutinação de partículas. Em um trabalho recente o autor observou em análise de microscopia eletrônica de varredura, por eletromicrografia que a imobilização é um método seguro no qual o micélio fúngico permanece no interior do grânulo totalmente protegido (V.G. ELISEI, et al, 2014).

### Separação e purificação dos bioativos

#### Determinação de proteína pelo método Bradford e Teste antimicrobiano.

Conforme adaptação (Jornal (anexo) EC 761/2009). Neste trabalho o reagente Comassie Azul Brilhante foi utilizado para investigação de teste antimicrobiano e investigação de teste de proteínas das amostras. Inicialmente foi feito um (1) litro de solução Tris (250 mg BSA m 100 mL – solução Mãe).

**Curva de calibração da proteína** - As amostras foram analisadas em espectrofotômetro UV-VIS Evolution 160 na absorvência de 595 nm, na concentração de 0,1, 5, 10, 20, 25 e 50 mg/L, subtraído o valor de absorvência do branco TRIS para cada amostra.

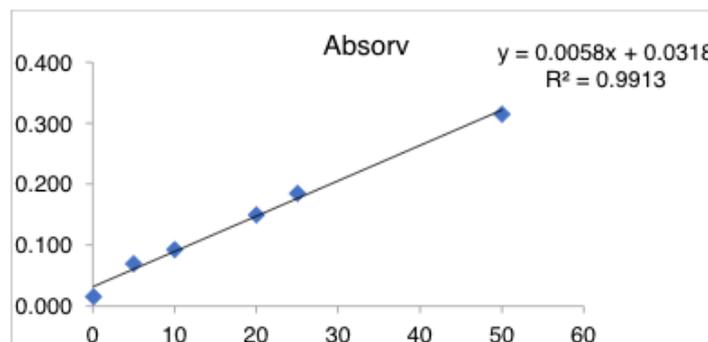


Figura 7. Gráfico curva de calibração com dados de absorvência em 595 nm com cálculo de linha de tendência

Fonte: Própria autoria.

Inicialmente de posse dos dados obtidos na curva de calibração foram processadas as amostras em Absorvência de 595 nm no espectrofotômetro UV-Vis com TRIS e 2,5 mL do Reagente Azul de Comassie e 0,5 mL da amostra (Método Bradford (Jornal (anexo) EC 761/2009) no qual se obteve a concentração proteica de cada amostras. Preparou-se as amostras de 100 mg da amostra para 10 mL de Tris = 10g/L. Foram tomados os apontamentos do pH e Condutividade das amostras para teste de proteína. Obteve-se os apontamentos das amostras para determinação de proteína pelo Método Bradford, absorvência em UV-VIS à 595 nm com reagente Comassie e amostra diluída em Tris. Com os dados obtidos seguiu-se ao cálculo da Equação da Reta dos Padrões  $Y = bx + a$ .

Descrição Amostras	Sigla	Nº amostra	pH	Condutividade
Mang Crist Biorrem	M.CP.1	4	4.48	3.11 mS/cm
Cristal Manguezal 12	M.CR.1	7	5.87	14.83 mS/cm
Membrana seca Biopol	M.BS.1	12	7.92	10.85 mS/cm
Membrana seca 11	M.BS.2	13	9.28	4.37 mS/cm
Biorremed Mang Sec12	M.SB	15	8.35	2.49 mS/cm
Biopol Nat Soluç aquos	M.BG.1	20	8.80	4.09 mS/cm

Tabela 2 - Apontamentos de pH e condutividade das amostras teste proteína Método Bradford

Fonte: Própria autoria.

O cristal manguezal apresenta um pH mais ácido entre 4.48 a 5.87; isto se atribui ao fato de ser um cristal de halita, com maior quantidade de sal NaCl em cada amostra, com boa condutividade em mS/cm. Quanto ao biopolímero manguezal e membrana seca, o pH se apresenta mais básico entre 7.68 a 9.28, com uma condutividade em mS/cm, evidenciando mais condutividade.

**Resultados para determinação da proteína método Bradford** – Dentre elas com apontamentos da Absorvência em UV-VIS em 595 nm se destacaram positivo para proteína pelo método Bradford Azul de Comassie em TRIS as amostras : a amostra 4, M.CR.1 com 1,308 nm o que corresponde a 81mg/L; A amostra M.BS com 1,222 nm corresponde à 64 mg/L, segue a M.BG com 1,114 nm correspondente a 45 mg/L. Considera-se abaixo as 5 mg/L como inclusivo.

**Testes antimicrobianos PCA em placas de Petri** - Após 3 dias as amostras em placas de Petri incubadas na estufa foram analisadas visualmente. Se obteve os resultados para o Teste antimicrobiano PCA purificação dos bioativos com bactéria *Escherichia coli* em placas de Petri, amostra 4 (M.CR1) e amostra 7 (M.CR) e 12 (M.BS) manguezal; as amostras foram analisadas, visualmente e selecionadas para cada grupo conforme crescimento bacteriano. Destacou-se a amostra cristal 7, e amostra biopolímero seco 12, estas de anos anteriores, vindo assim a confirmar a

atividade antimicrobiana dos bioprodutos.

### Resultado do teste antimicrobiano com reagente Comassie análise visual

O inóculo bactéria *E. Coli* na placa de *Petri*, ao ser colocado entre os brancos com o fundo de cartolina preta pode-se visualizar nitidamente que a bactéria foi inibida em seu crescimento com espaços vazios, crescimento de forma não uniforme (Figura 10A e B).

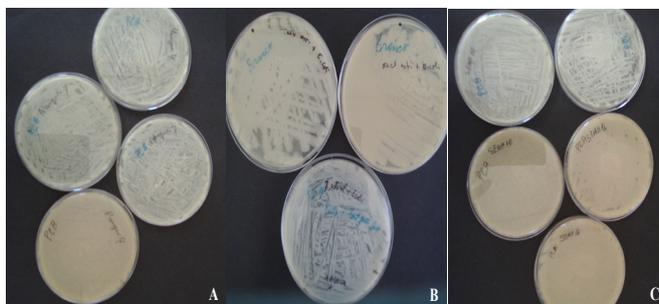


Figura 8 A B) Teste antimicrobiano PCA em placas de Petri com bactéria *Escherichia coli* utilizando o instrumento L método riscado amostra 4 e 7 comparada com branco;

Fonte. Dados da pesquisa

## 4 | DISCUSSÃO

Após caracterização em ambos os produtos, mostrou evidências de uma proteína “amida” que norteia para investigações mais aprofundadas. Está proveniente do processo de hidrólise e captura das substâncias ciclisadas e gasosas na produção de biopolímeros formado por aminoácidos de microorganismos e vegetais com retenção e aglutinação das partículas de óleo. Em Infravermelho, o biopolímero apresenta o pico em  $1634\text{cm}^{-1}$ , C=O, atribuindo-se a possível amida I (colágeno) (YAKIMETS, et al., 2005); na banda  $1028\text{cm}^{-1}$ , C-O, atribui-se a ésteres e sulfóxido e dos halogênios de Cl, Br. Enquanto que o cristal residual apresenta banda C-N,  $1560\text{cm}^{-1}$  atribuída a amida II, esta surge na sequência dos modos normais de vibração C-N-H e estiramentos C-N dos peptídeos, podendo conter ligações peptídicas; atribuem-se as presenças de olefinas, fenilalanina e tirosina, respectivamente (PENTEADO, et al., 2008); Os perfis espectrofotométricos para cristal residual foram de  $\lambda_{\text{exc.}} 193\text{nm}$  e  $\lambda_{\text{emis.}} 273\text{nm}$  para o biopolímero,  $\lambda_{\text{exc.}} 250\text{nm}$  e  $\lambda_{\text{emis.}} 360\text{nm}$  e são compatíveis com proteína, confirmando os estudos químicos. Em análise por MEV o biopolímero concentrou alto índice de carbono inorgânico num percentual que se verifica nas imagens de BSE, em MEV  $86.73\text{ Wt}\%$ ; este resultado contribuiu para o depósito de Propriedade Industrial - PI UFBA- (PI BR 1020140192018).

No teste antimicrobiano PCA, com maior potencial antimicrobiano, foram amostras 4 e 7, cristal residual, são as que contém maior poder de inibição para a bactéria *E. coli*. No teste antimicrobiano com reagente Comassie análise visual, verificou-se em lupa e microscópio, visualizando positivo para o cristal residual. A determinação de proteína

pelo Método Bradford foi positiva para o cristal proteico manguezal (M.CP.1) foi de 81 mg/L; para o biopolímero seco manguezal (M.BS.1) foi de 45 mg/L; manguezal sedimento biorremediado (M.SB) foi de 64 mg/L; manguezal biopolímero gelatinoso (M.BG.1) 45 mg/L, de proteína por litro.

## 5 | CONCLUSÕES

Assim, em um primeiro aspecto, apresenta um produto biopolímero gelatinoso que disponibiliza um tecido microbiológico resistente. No biopolímero seco em infravermelho apresenta a banda  $1634\text{ cm}^{-1}$ , C=O, referente um grupo proteico amida, possivelmente colágeno. Por imagem de eletromicrografia com aumento em  $\times 7.000$ , com  $2\mu\text{m}$  apresenta hifas tecidas intrinsecamente produzida pelos fungos no biopolímero com abertura cilíndrica, podendo ser utilizada na imobilização microbiana para uso em biotecnologia por ser um método seguro. Em um segundo aspecto, viabiliza o processo de transferência de elétrons ferro/enxofre possibilitando a formação de compostos orgânicos entre peptídeos e proteínas produtoras de biomassa. Confere um produto biopolímero emulsificado em solução salina com moléculas e elementos minerais essenciais bioativos orgânicos, como colágenos e glutamato neurotransmissor, antioxidante, os quais se espera direcionar sua aplicação para a área de cosméticos e fármacos. Quanto ao cristal residual demonstrou que através da biorremediação foi possível a purificação de carbono mineral com alto índice de concentração num percentual de 86.73 Wt% por microscopia eletrônica de varredura que contribuiu para o depósito de Propriedade Industrial. O que sugere um estudo de nanotubos de carbono e ou nanopartículas, a nível molecular. Com base nos ensaios descritos, ficou confirmada a presença de atividade antimicrobiana com inibição para a bactéria *Escherichia coli* por teste PCA e com reagente Comassie e aplicação do protocolo de identificação pelo método Bradford. Isto se atribui a presença de óxido de ferro e metalóides no processo bioquímico com a ricina de mamona com seus alérgenos e os agentes microbianos fungos desenvolvendo moléculas antimicrobianas quando em ambiente de estresse para sua defesa. No teste de proteína Método Bradford o êxito foi confirmado, visto o resultado analítico de outras caracterizações, comprovado pelo cristal proteico residual, com concentração de 81 mg/L, positivo. Portanto, se conclui que o processo de biorremediação com a produção de biopolímeros e bioativos cristalizados antimicrobianos cria possibilidade de investimentos mais contundentes para viabilizar aplicação em área da saúde, fármacos e cosméticos contribuindo nos processos biológicos e biotecnológicos.

## 6 | AGRADECIMENTOS

Reconhecemos ao Programa de Recursos Humanos - PRH 49 – Agência

Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis ANP/MCTI, através de bolsas de pesquisa de doutorado. Agradecemos o apoio financeiro da CAPES (Brasil) através do Programa Doutorado Sanduíche no Exterior PDSE 88881.134321 / 2016-01. Instituto de Física UFBA-LAMUME. ESTSstúbal-IPS.

## REFERÊNCIAS

AGUIAR, A.; FERRAZ, A.; **Mecanismo e aplicações da reação de Fenton assistida por compostos fenólicos redutores de ferro**. Química Nova, v. 30, p.623-628, 2007.

ALVAREZ-SANCHEZ, M. E. A. *et al.* **A novel cysteine proteinase (CP65) of Trichomonas vaginalis involved in cytotoxicity**. Microbial pathogenesis, v. 28, p. 193-202, 2000.

BAGCHI, B. e BANERJEE, D. **Diversity of fungal endophytes in Bauhinia vahlii (a lianas) from different regions of Paschim Medinipur district of West Bengal**. IJSET, v. 2, p.748-756, 2013.

BANHOS, E. F.; *et al.* **Endophytic fungi from Myrcia guianensis at the Brazilian Amazon: Distribution and bioactivity**. Brazilian Journal of Microbiology. v. 45. n. 1, p. 153-161. 2014.

BENTO, F.M. *et al.* **Bioremediation of soil contaminated by diesel oil**. Braz. J. Microbiol., n. 34, 65-68, 2003.

BRADFORD, M.M. (1976). **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. Anal Biochem 72:248-54.

CHANDRA, R. RUSTGI, R. Prog. **Polym. Sci.**, v.23, p.1273-1335, 1998.

COMPTON, S.J. and JONES, C.J. (1985). **Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay**. Anal Biochem 151:369-74.

C. M. QUINTELLA; O. GONÇALVES. PI BR 1020140192018 - **Processo de Purificação de Carbono Mineral em Cristal de Halita Sintetizado em Biorremediação de Manguezal com Aplicação em Biotecnologia**. 2014.

C. M. QUINTELLA; O. GONÇALVES. **Processo de obtenção de produto biodegradável para aplicação na remediação de solos, águas e ambientes impactados e método de funcionamento**. BR PI 1004444-2 A2, 03 mar. 2010.

C. M. QUINTELLA; O. GONÇALVES. **Processo Microbiológico para captura de voláteis e produção de biopolímero proteico**. Patente BR PI 1105932-0, 21 out. 2011.

DELAYE L.; GARCÍA-GUZMÁN.; H. E. L MARTIN. **Endophytes versus biotrophic and necrotrophic pathogens-are fungal lifestyles evolutionarily stable traits?** Fungal diversity, v. 60, p 125-135, 2013.

ELEGBEDE, J. A. e LATEEF, A. **Valorization of corn-cob by fungal isolates for production of xylanase in submerged and solid state fermentation media and potential biotechnological applications**. Waste and Biomass Valorization, v.9, n.8, p. 1273-1287, 2018.

ELIZEI, V. G.; *et. al.* **Imobilização de fungos filamentosos com potencial para uso agroindustrial**. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.81, n.2, p.165-172, 2014.

GRUSE, W. A.; STEVES, D. R., **Chemical technology of petroleum**,sNew York, London, McGraw-

Hill book company, inc, 1942.

Jornal Oficial da União Europeia (anexo) EC 761/2009-anexo IV (método equivalente ao OECD TG 201).

LACAZ, C. S. L.; et al. **Tratado de Micologia Médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier. 2002.

MARIANO, A.P., **Avaliação do potencial de biorremediação de solos de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel** [s.n.], p. 162 f., 2006.

MOTA, L. M. et al. **Uso racional de antimicrobianos**. Medicina (Ribeirão Preto), v. 43, n.2, p. 164-172. 2010.

MULLIN, J. W. **Optimização da unidade de cristalização do clorato de sódio Crystallization**; Butterworths; University of London; fourth Edition, 1961.

MYLONA, P.V.; POLIDOROS, A.N. ROS regulation of antioxidant genes. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfi eld: Science Publishers, 2011. Cap.6, p.101-128.

O. GONÇALVES, C. M. QUINTELLA; J. A. TRIGUI, Patente BR PI 1105934-6. **Processo para obtenção de biossensores e biossensores**, 2011.

PRANOTO, Y.; LEE, C. M.; PARK, H. J.; Characterizations of fish gelatin films added with gellan and k-carrageenan. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v.40, n.5, p.766-774, 2007.

PENTEADO, S. C.; et al. **Diagnosis of degenerative lesions of supraspinatus rotator cuff tendons by Fourier Transform-Raman spectroscopy**. **Journal of Biomedical Optics**, v.13, n.1, p.14-18, 2008.

PINHEIRO, E. A. A.; et al. **Antibacterial activity of alkaloids produced by endophytic fungus Aspergillus sp**. EJC08 isolated from medical plant Bauhinia guianensis. **Natural Product Research**, v.27, p.1633-1638, 2013.

RODWELL, V. W.; **Catabolism of Proteins Amino Acid Nitrogen**, Biomedical Importance, 28. 2009.

SÁEZ-LLORENS, X. et al. **Impact of an antibiotic restriction policy on hospital expenditures and bacterial susceptibilities: a lesson from a pediatric institution in a developing country**. **Pediatr Infect Dis J**. v. 19, p. 200-206. 2000.

UÑA, G. V.; GARCÍA, M. J. N.; **Biodegradation of non-ionic dispersants in sea water**, **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**. 18 (5) (1983) 315.

WANNMACHER, L. **Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida? Uso racional de medicamentos: temas selecionados**, Brasília, v. 1, n. 4, mar. 2004.

YAKIMETS, I.; et al. Mechanical properties with respect to water content of gelatin films in glassy state. **Polymer**, v.46, n.26, p.12577-12585, 2005.

XU, R.; et al.; **Bioremediation of oil-contaminated sediments on an inter-tidal shoreline using a slow-release fertilizer and chitosan**. **Marine Pollution Bulletin**, v. 51, p. 1062-1070, 2005.

## BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS OF THE YEAST CELL WALL WITH EMPHASIS ON THE DEVELOPMENT OF FEED ADDITIVES

### **Carina Maricel Pereyra**

Universidad Nacional de Río Cuarto, Facultad de Ciencias Exactas, Físico Químicas y Naturales, Departamento de Microbiología e Inmunología. Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

### **Mariana Angélica Montenegro**

Universidad Nacional de Villa María, Instituto de Ciencias Básicas y Aplicadas, Centro de Investigación y Transferencia. Villa María, Córdoba, Argentina.

### **Lilia René Cavaglieri**

Universidad Nacional de Río Cuarto, Facultad de Ciencias Exactas, Físico Químicas y Naturales, Departamento de Microbiología e Inmunología. Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

**ABSTRACT:** The objective of the chapter was to give a general look at the applications that yeasts can and could have. Some of them are used as supplements in animal feed due to their relatively high content of proteins and amino acids, energy and micronutrients compared to common cereals and oilseed meals. It has been shown that whole cells, cell walls, wall components improve the performance and health of animal growth. Although, there are many researches that evaluate the use of yeasts in the potential development and the benefits for human and animal health. It is necessary to develop biotechnological strategies such as

the one proposed in this chapter. Four strains of yeasts with probiotic properties (*S. boulardii* RC009; *S. cerevisiae* RC012, *S. cerevisiae* VM014 and *K. marxianus* VM004) were tested to be used as adsorbents of AFB<sub>1</sub>. The use of waste from the bioethanol industry was studied as a carbon source to produce biomass and extract the cell wall of the yeasts. The walls were studied using Transmission Electron Microscopy and Fourier Transform Infrared, determining the thickness of the wall and the composition. The quantification of the adsorption of AFB<sub>1</sub> using High Performance Liquid Chromatography was conducted. Increasing the thickness of yeast walls to be used as feed additives and mycotoxin adsorbents is a promising strategy to reduce the exposure to animals (and, consequently, to humans) of mycotoxins, since the capacity of adsorption is due to the interactions between the yeast wall and the mycotoxins.

**KEYWORDS:** biotechnology, mycotoxin adsorbent, yeast wall cell.

### 1 | INTRODUCTION

The yeast is a fungus widely used as a model system in basic and applied fields of life science, medicine, and biotechnology. Their primary roles in many food fermentations such as beers, cider, wines, sake, distilled spirits;

bakery products, cheese, sausages, and other fermented foods have been extensively demonstrated. Moreover, they have been also used for the production of fuel ethanol, single cell protein (SCP), feeds and fodder, industrial enzymes, and small molecular weight metabolites. Yeasts are the main producer of biotechnological products in the world, which exceeds the production, capacity and economic income of any other group of industrial microorganisms. The annual world production of *S. cerevisiae* is over 1 million tons (JOHNSON and ECHAVARRI – ERASUN, 2011) (Table 1).

Species	Industrial fermentations	Biotechnological processes	References
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	Beers, Cachaça, ciders, breads, cocoa, wine, silage, fermented meats	Production of proteins and enzymes (pharmaceuticals protein) Invertase (Food applications) L-lactic acid (Biodegradable plastic and textile fibers) Glycerol, Ethanol Vaccines (Medicine)	AMARAL et al., 2008; TAMANG et al., 2009; HONG and NIELSEN, 2012
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Cachaça,	Heterologous protein	SPENCER et al., 2002
<i>Kluyveromyces lactis</i> and <i>K. marxianus</i>	Fermented milks, chesses, dairy products, coffe	Production of enzymes (Chymosin, Lactase) (Food processing) Heterologous protein L-lactic acid (Biodegradable plastic and textile fibers)	ANTONI et al., 2003; RUBIO TEXEIRA 2006; JOHNSON and ECHAVARRI – ERASUN, 2011
<i>Candida</i> spp.	Fermented milks, dairy products, fermented meats	Production of enzymes (lactase, lipases) (food, pharmaceutical and cosmetic industries)	GUO et al., 2006
<i>Pichia</i> spp.	Silage, cocoa	Riboflavin production Heterologous protein	SIBIRNY and BORETSKY (2009)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Chesses, dairy products, fermented meats	Lipid production Carotenoids, surfactants and flavorants	BREUER and HARMS, 2006
<i>Rhodotorula</i> spp.	Fermented meats and sausages, chesses	Production of enzymes (L-phenylalanine) (Industry pharmaceutical) Lipid production	JOHNSON, 2003; AGEITOS et al., 2011
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> ( <i>Phaffia rhodozyma</i> )	Astaxanthin production (Diet animal feed)	Lipid production Astaxanthin production (pharmaceutical industry)	SCHMIDT et al., 2011

Table 1. Yeasts of biotechnological importance and biotechnological products produced.

On the other hand, different yeast species have also been used as prebiotic and probiotic agents for preventing or treating various intestinal, nutritional, and toxicological disorders intended for human health. In recent years, much attention has been paid to the design of functional foods that contain probiotic microbial strains responsible for health benefits in the host (KUMURA et al. 2004).

The main probiotic yeasts are *Saccharomyces boulardii*, *S. cerevisiae* and *K. marxianus* (VIERA et al., 2013; MCFARLAND, 2017; MACCAFERRI et al., 2011).

Some of the properties that make these yeasts as probiotics are the ability to survive the pass through the gastrointestinal tract, help maintain and restore intestinal biota, the non-pathogenicity and the optimal growth at 37°C. Also, they have the ability to antagonise to microbial pathogens (PATIL et al., 2015).

## 2 | USE OF YEAST IN ANIMAL FEED

For more than 100 years, animals have been fed various forms of yeast and yeast derivatives (STONE, 2006). It has been shown that the use of yeasts provides benefits of animal health and growth performance (GARCIA et al., 2018). Therefore, there are many types of feed additives and feed ingredients that contain yeasts which contribute proteins, vitamins and minerals to the animal diet (Figure 1).

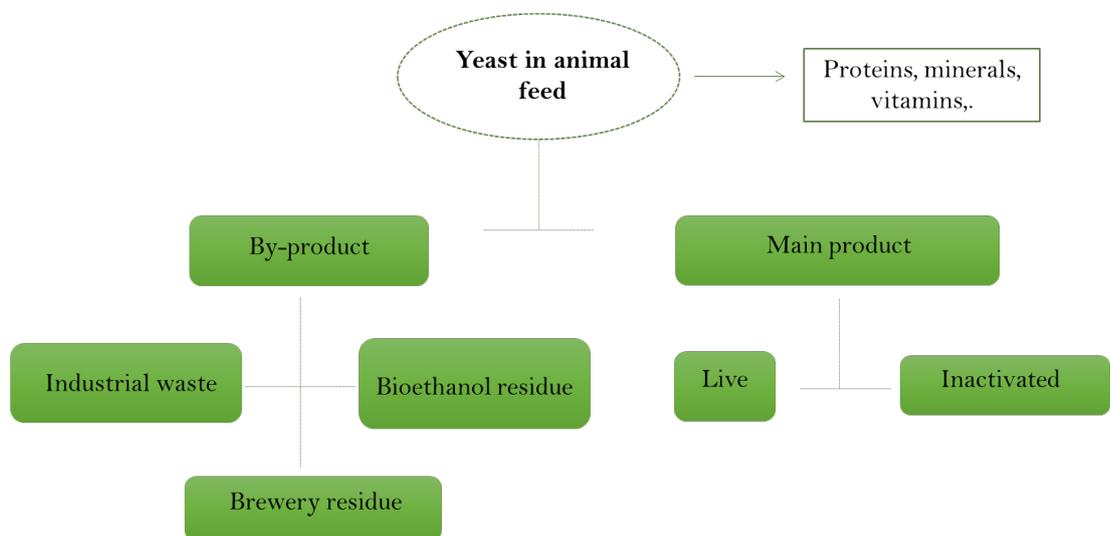


Figure 1. Different contributions of the use of yeasts in animal feed.

Yeast as probiotic and yeast cell wall have been used as adjuncts for animal feeds. The yeast cell wall has been proposed to promote animal growth and health by various mechanisms, including immunomodulation, oxidative status, binding of toxins and pathogens, and interactions with gut constituents. There are several researches that demonstrate the beneficial effects of the live yeast, the yeast walls as well as its components in animal production (Table 2).

Since the prohibition of non-therapeutic use of antibiotics in animal feed by the European Union, the US. The search for new additives that promote growth for animal feed has been increasing in recent years (PATIL et al., 2015).

Species	Cellular part	Benefits	Animal Production	References
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	Whole cell	Probiotic – OTA and ZEN Adsorbent	Pig ( <i>in vitro</i> )	ARMANDO et al., 2012.
	Whole cell	Probiotic – AFB <sub>1</sub> Adsorbent	Broilers ( <i>in vitro</i> )	PIZZOLITO et al., 2012.
	Whole cell	Probiotic - AFB <sub>1</sub> Adsorbent	Bovine ( <i>in vitro</i> )	DOGI et al., 2011.
	YCW	AFB <sub>1</sub> and ZEN adsorbent	Pig ( <i>in vitro</i> )	PEREYRA et al., 2012.
	Yeast based product and yeast inactivated	AFB <sub>1</sub> , ZEN and OTA adsorbent	Animal production ( <i>in vitro</i> )	JOANNIS CASSAN et al., 2011.
	YCW	OTA adsorbent	Animal production ( <i>in vitro</i> )	PROTROWSKA and MASEK, 2015.
	YCW and $\beta$ glucans	AFB <sub>1</sub> , ZEN and OTA adsorbent	Animal production ( <i>in vitro</i> )	YANNIKOURIS et al., 2003; 2004a, 2004b; 2006.
	YCW	Prebiotic - AFB <sub>1</sub> Adsorbent	Broilers ( <i>in vivo</i> )	BAHAMAN NAVIDSHAD et al., 2015; GUANG – DA XUE et al., 2017; LIU et al., 2018.
	WCY - $\beta$ glucans	Prebiotic - Immunostimulant	Shrimp ( <i>in vivo</i> )	SUPHANTHARIA et al., 2003; ACHUPALLAS et al., 2016.
	$\beta$ glucans	Prebiotic - AFB <sub>1</sub> Adsorbent	Broilers, Pig, Bovine calves	MOON et al., 2016; KERKAERT et al., 2018; NASEER, OMER et al., 2018.
MOS - Mannan Rich Fraction (MRF)	Immunostimulant	Pig, poultry, Turkey, calves, Aquaculture	CHE et al., 2012; BARRANCO et al., 2014; CHACHER et al., 2017; ROSEN, 2007; MORRISON et al., 2010; RODRÍGUEZ ESTRADA et al., 2013; TORRECILLAS et al., 2011.	
YCW	AFB <sub>1</sub> Adsorbent	Rainbow trout	IMANI et al., 2017.	
<i>Candida</i> spp.	Whole cell	Stimulates fermentation	Bovine	MARRERO et al., 2015.
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Whole cell	Probiotic	Pig ( <i>in vitro</i> )	DÍAZ VERGARA et al., 2017.
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Whole cell	Probiotic	Broilers ( <i>in vivo</i> )	WANG et al., 2017.
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	hydrolyzed or non-hydrolyzed	Immunostimulant	Piglets ( <i>in vivo</i> )	KEIMER et al., 2018.
<i>Pichia kudriavzevii</i>	Whole cell inactivated	AFB <sub>1</sub> adsorbent	Broilers ( <i>in vivo</i> )	MAGNOLI et al., 2017.
<i>Ogataea polymorpha</i>	Whole cell	Phytase production (utilization of phosphate)		JOHNSON and ECHAVARRI – ERASUN, 2011.

Table 2. Main yeast species used in animal feed and its benefits.

### 3 | THE YEAST AS AN ALTERNATIVE TO PREVENT MYCOTOXICOSIS IN ANIMAL PRODUCTION

Mycotoxins are secondary metabolites produced by different species of toxicogenic fungi, such as *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Alternaria* genera, which under certain environmental conditions contaminate forages, cereals and different foods (KABAK et.al, 2006). These secondary metabolites comprise a group of more than 400 different chemical compounds, which contaminate the crops before and after harvest, being a common problem throughout the world. In domestic animals, such as dairy cattle, pigs and poultry, mycotoxin contamination reduces growth efficiency, decreases feed conversion and reproduction rates, impairs resistance to infectious diseases, reduces the efficacy of vaccination and induces pathological damage to the liver and other organs (ZHU et.al, 2016). Mycotoxins in general can have different biological and pathological effects: they are capable of triggering acute intoxication, and carcinogenic, mutagenic, teratogenic and estrogenic effects (REDDY et al., 2010).

Aflatoxins are mycotoxins produced by some fungi of the genus *Aspergillus* (*A. flavus* and *A. parasiticus* mainly). Aflatoxin B<sub>1</sub> is considered the most potent natural carcinogen classified by IARC as Group 1 (VILA-DONAT et al., 2018). They can contaminate a wide range of crops such as corn, peanuts, rice, cotton seeds and also animal feed (REDDY et al., 2010; DHANASEKARAN et al., 2011). The contamination of food and feed with this mycotoxin represents great economic losses and generates serious problems in public health due to livestock contamination.

Due to the negative effects that mycotoxins can have on animal and human health, numerous strategies have been developed to prevent or resolve the mycotoxins contamination of food and the fungi that produce them. The mycotoxin adsorbents of biological origin are one of the promissory alternatives to prevent mycotoxicosis in animals. They have the ability to sequester mycotoxins by adsorbing them in the cell wall of bacteria, yeasts and conidia of *Aspergillus* sp. (POLONI et al., 2015, PEREYRA et al., 2016, ZHU et al., 2016). These agents allow the elimination of the mycotoxins found in feed through the faeces, preventing the mycotoxicoses (Figure 2).

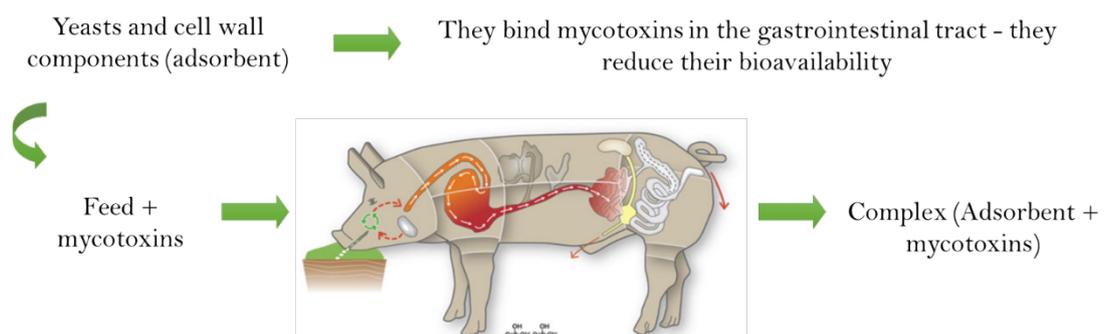


Figure 2. Adsorption of mycotoxins in the gastrointestinal tract using yeast.

## 4 | YEAST CELL WALL STUDIES

The YCW is an elastic structure that provides osmotic and physical protection and determines the shape of the cell and the integrity of the organism during cell growth and division. The wall has a thickness of about 100-200 nm and comprises 15-20% of the dry weight of the cell (Figure 3). It is composed of three main groups of polysaccharides, mannose polymers (mannoproteins - 40% of the dry weight of the cell), glucose polymers (beta glucans - 60%) and polymers of N-acetylglucosamine (chitin - 2%) (KWIATKOWSKI and KWIATKOWSKI, 2012).

An estimated 1200 genes of *S. cerevisiae* affect the composition and organization of the cell (DE GROOT et al., 2001). It is known that the composition of the wall can vary with respect to different growth conditions, including the type of culture, carbon source, temperature, pH and oxygen availability (PEREYRA et al., 2018).

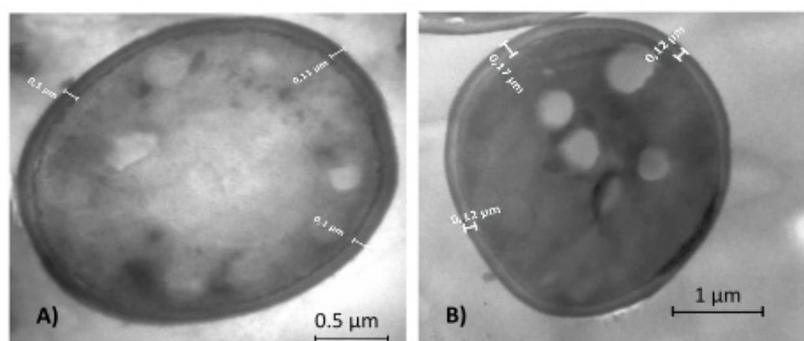


Figure 3. Thickness ( $\mu\text{m}$ ) of the yeast cell wall of A) *Saccharomyces boulardii* RC009, B) *Kluyveromyces marxianus* VM004.

The cell wall of *S. cerevisiae*, is about 70 nm thickness and represent 20% of the whole cell's weight (WALKER, 1999). Several researchers have studied the variation of the cell wall using different carbon sources and growth conditions (NARUEMON et al., 2013; AGUILAR-USCANGA and FRANÇOIS, 2003). Thus, the alteration of cell wall composition and structure induced by the carbon regimen should be expected. In addition, within each yeast species the strains can act differently under the influence of different nutritional, physical and environmental factors (Table 3).

The importance to study the YCW is based on the fact that the capacity of adsorption between the cell wall and several mycotoxins has already been demonstrated; so, the greater the amount of cell wall, the greater the mycotoxin adsorption capacity. It has a significant economic impact because these microorganisms or only the wall could be used as additive in animal feed to reduce the bioavailability of mycotoxins reducing their toxic effects.

Yeast strains	Culture media	Glucosa (g.L <sup>-1</sup> )		Cell wall production		References
				(g L <sup>-1</sup> )	(%)*	
<i>S. boulardii</i> RC009	YPD	20	1.19	29.6		
	DDGse	2.67	0.22	6.98		
<i>S. cerevisiae</i> RC012	YPD	20	1.85	37	PEREYRA et al., 2018	
	DDGse	2.67	0.65	16.2		
<i>S. cerevisiae</i> VM014	YPD	20	0.108	2.22		
	DDGse	2.67	0.761	20.6		
<i>K. marxianus</i> VM004	YPD	20	0.43	8.6	PEREYRA et al., 2017.	
	DDGse	2.67	1.41	33.3		
<i>S. cerevisiae</i>		50		29		
<i>K. marxianus</i> R157		50		29.5	NGUYEN et al. (1998)	
<i>K. marxianus</i> 1586		50		32.5		
<i>D. hansenii</i>		50		32		
<i>S. cerevisiae</i>		50		22.7	FRANCOIS J. (2006)	
<i>S. cerevisiae</i>	YPD	20		25.5	AGUILAR USCANGA and FRANCOIS (2003)	
	YNB	-		21.2		
<i>K. marxianus</i> CCEBI 2011		20	3.22	27	SERRAT DÍAZ et al., 2017	

Table 3. Influence of the culture medium on the production of biomass and cell wall by different yeast species.

YPD: yeast extract – peptone – dextrose broth. DDGse: dried distiller grains with solubles extract. (\*) Percentage of cell wall in relation to the whole cell, based on cell dry weight. YNB: yeast nitrogen base.

## 5 | INFLUENCE OF AGROINDUSTRIAL WASTE ON THE THICKNESS OF THE CELL WALL AND THE ADSORPTION OF AFLATOXIN B<sub>1</sub>

Different substrates have been used for the production of biomass as molasses, starch, cassava, Jerusalem artichoke, whey products, sulphite waste liquor, potato wastes, brewery wastes, and other waste streams from agricultural processes, food processing, and industrial processes (OZYURT and DEVECI 2004).

The most important nutrients for yeasts are carbohydrates that serve for both carbon and energy sources. Mostly hexoses and oligosaccharides, can be fermented by yeasts. The ability of yeasts to metabolize polysaccharides and complex carbohydrates is restricted to relatively few species. Utilization of starch is of particular interest for industrial production of yeast biomass from starchy agricultural wastes (SHARMA et al., 2014).

One of the main waste products of the ethanol production industry is the “Distillers dried grains with solubles” (DDGs) commonly used in animal feed as a low-cost supplement that provides energy and proteins. There is a concentration increasement of approximately three times of components such as proteins, fats, vitamins, minerals and fibers. After the conversion of corn starch into ethanol during fermentation.

FOCHESATO et al. (2018) produced a DDGs extract for the biomass production of *S. cerevisiae* RC016 with probiotic properties to be used in animal feed. They

demonstrated that the use of DDGse promotes a sustainable and ecological way to produce yeast biomass. PEREYRA et al. (2018) used the DDGse and a basic medium such as YPD to evaluate the relationship between YCW thickness and cell diameter by transmission electron microscopy (TEM) to determine the proportion of cell wall present in the strain. The relationship showed an accurate estimation of the content of the cell wall (Table 4). The diameter of the cells was similar with the two culture media and the four yeast strains studied. The use of DDGse increased the thickness of *S. cerevisiae* RC012 and *S. cerevisiae* VM014 cell wall. However, there were no differences between the culture media tested with *S. boulardii* RC009 and *K. marxianus* VM004 strains in relation to the thickness of the wall. In this study, the use of DDGse as a carbon source could replace synthetic media (such as YPD) for the production of biomass giving an added value to the production of cell wall increasing the thickness of the wall used for the mycotoxin adsorption.

Yeast strain	Culture media	Ultrastructural analysis		
		Diameter of whole cell (mm)	Thickness of cell wall (mm)	Cell wall thickness/cell diameter/ (mm)
<i>S. boulardii</i> RC009	YPD	3.84 ± 0.21	0.126 ± 0.018	0.0328
	DDGse	3.05 ± 0.33	0.095 ± 0.013	0.0311
<i>S. cerevisiae</i> RC012	YPD	3.94 ± 0.74	0.130 ± 0.036	0.0339
	DDGse	3.63 ± 0.37	0.277 ± 0.064	0.0759
<i>S. cerevisiae</i> VM014	YPD	2.31 ± 0.06	0.088 ± 0.013	0.0381
	DDGse	3.27 ± 0.44	0.144 ± 0.023	0.0440
<i>K. marxianus</i> VM004	YPD	2.83 ± 0.21	0.128 ± 0.017	0.045
	DDGse	4.58 ± 0.65	0.167 ± 0.031	0.036

Table 4. Ultrastructural analysis of *Saccharomyces boulardii* RC009, *S. cerevisiae* RC012, *S. cerevisiae* VM014 and *K. marxianus* VM004: relationship between cell wall thickness/cell diameter (mm).

YPD: yeast extract – peptone – dextrose broth. DDGse: dried distiller grains with solubles extract.

It is important to design an appropriate culture medium depending on the objective, when the biomass or cell wall or some intracellular or extracellular metabolite is required, their production must be optimised in order to reduce production costs making viable the biotechnological process.

## 6 | EXTRACTION OF THE WALL CELL YEAST AND ITS COMPONENTS

Yeast cell wall is mainly composed of polysaccharides, proteins and lipids that offer different functional groups (carboxyl, hydroxyl, phosphate and amine groups) as well as hydrophobic adsorption sites, such as aliphatic chains and aromatic carbon rings for the interaction with the toxin (JOUANY et al., 2005; RINGOT et al., 2005).

There are different methods to extract the wall of the yeasts and their components.

The type of extraction and the purity of the component will depend on the use, whether intended for the food, and feed and pharmaceutical or cosmetic industry (NGUYEN et al., 1998; YIANNIKOURIS et al., 2003; SHOKRI et al., 2008; HUANG and LI, 2011; BIN DU et al., 2014; VARELAS et al., 2016).

The composition of the yeast cell wall can be studied using Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy that can be applied as a useful tool for the analysis of entire yeast cells providing a fast, effective, reagent-free, and simple method (KULIGOWSKI et al. 2012). The FTIR spectroscopy is a rapid, precise, and accurate method, not requiring sample preparation for the determination and quantification of carbohydrate composition of yeasts (PLATA et al. 2013). In addition, FITR spectroscopy analysis indicated the presence of the C-O, O-H and N-H groups, related to the protein and carbohydrate components, mainly chitin and  $\beta$  glucans involved in the adsorption of AFB<sub>1</sub> (GALICHET et al., 2001).

PEREYRA et al. (2018) studied the spectra the cell yeast walls produced in two culture media (Figure 4) and three (3) regions corresponding to polysaccharides (950 - 1185 cm<sup>-1</sup>), proteins (1480-1700 cm<sup>-1</sup>) and lipids (2840 - 3000 cm<sup>-1</sup>) were observed.

The yeast cell wall spectrum shows three characteristic regions such as carbohydrates, proteins and lipids, which agree with previous works (ADT et al., 2006; AHMAD et al., 2010; NARUEMON et al., 2013; PLATA et al., 2013).

In the same study was observed that the use of YPD increased the amount of total carbohydrates for *S. boulardii* RC009 and *K. marxianus* VM004, while the cells walls of *S. cerevisiae* RC012 and *S. cerevisiae* VM014 grown in DDGse broth showed higher carbohydrate amounts compared to those obtained in YPD medium. GALICHET et al., (2001) obtained spectra similar to ours. They studied the variation of the wall components of a mutated *S. cerevisiae* strain, observing an increase in  $\beta$  glucans and a decrease in mannanoproteins.

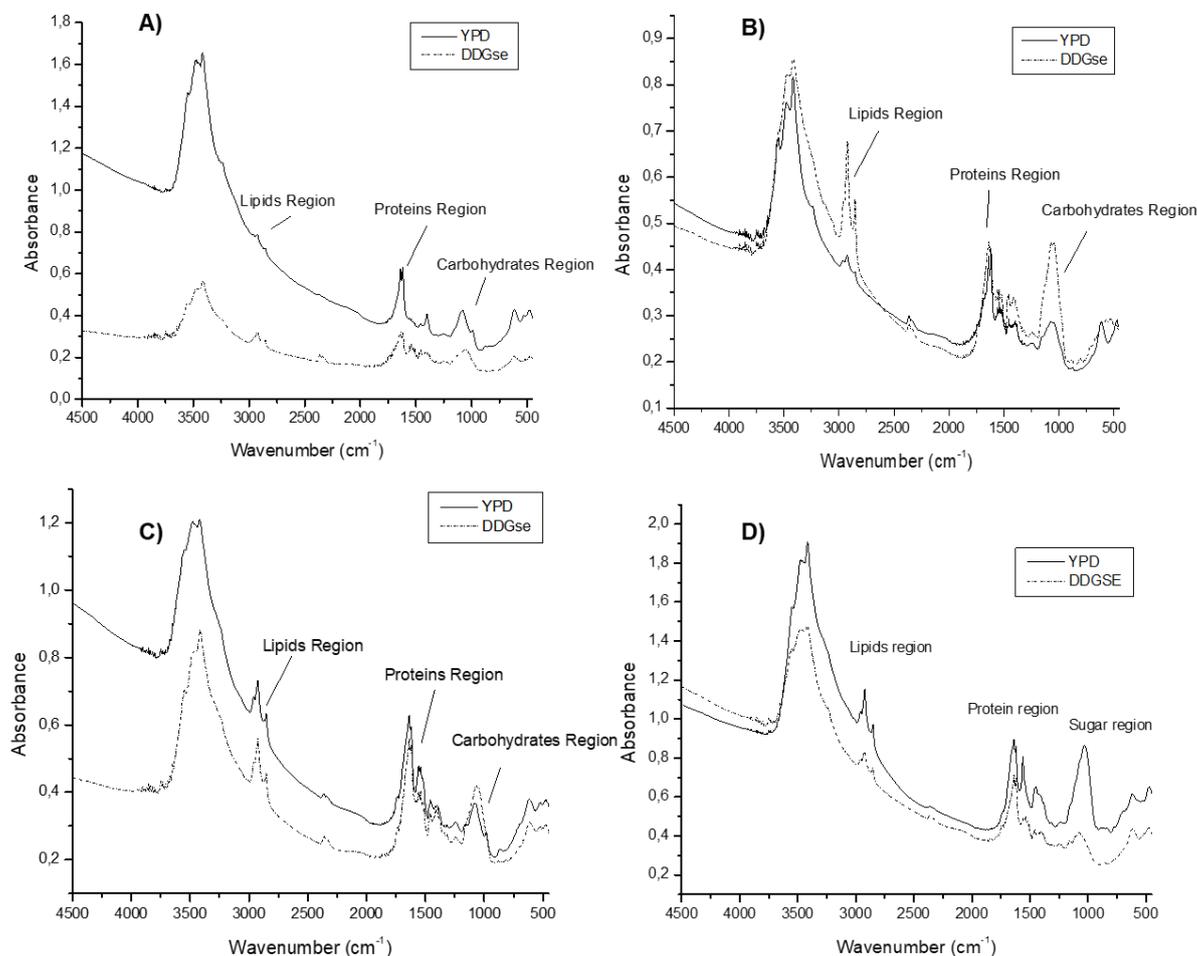


Figure 4. FTIR spectra of cell wall of grown in different culture media. A) *Saccharomyces boulardii* (RC009), B) *S. cerevisiae* (RC012), C) *S. cerevisiae* (VM014), D) *Kluyveromyces marxianus* (VM004).

## 7 | WALL CELL YEAST AS AN AFLATOXIN B<sub>1</sub> ADSORBENT

The yeast cell walls in particular offers a plethora of possibilities; one of the alternatives is the use as mycotoxin adsorbent.

Several studies have been reported on the biodegradation and adsorption of mycotoxins using different yeast species, mainly *S. cerevisiae* and others such as *Rodhotorula* sp., *Pichia kudriavzevii*, *Clavispora lusitaniae*, *Candida krusei* and *P. anomala*, *C. guilliermondii*, *C. intermedia*, *C. lusitaniae* (ARMANDO et al., 2012; YIANNIKOURIS et al., 2003; YIN et al., 2008; VAR et al., 2009; FIORE et al., 2014; MAGNOLI et al., 2016). In recent years, the use of yeast cell wall has gained importance as adsorbents of mycotoxins, including aflatoxin B<sub>1</sub> (YANNIKOURIS et al., 2003; 2004a, 2004b; 2006).

The potential of the YCW with respect to the whole cell to adsorb AFB<sub>1</sub> has been demonstrated (PEREYRA et al., 2018). Adsorption of the extracted YCW was greater than that using the whole cell (Table 5). However, the use of the whole cell would have a probiotic effect in addition to AFB<sub>1</sub> adsorption. In relation to the yeast cell wall use of some species, they adsorbed almost 10 times more than using the same amount of

whole cell.

There are few studies on the adsorption of AFB<sub>1</sub> using yeast CW (JOANNIS CASSAN et al. 2011). YIANNIKOURIS et al. (2006) found that 6177 µg/mL were adsorbed per 100 µg/mL of CW. PEREYRA et al. (2012) studied the adsorption of AFB<sub>1</sub> with CW of commercial yeasts applying mathematical models to explain the type of interaction of the toxin with the adsorbent that occurred. They found adsorption values of 0.29 ± 0.01 (g/g) at 0.40 ± 0.1 (g/g) for pH 2 and 0.061 ± 0.003 (g/g) at 0.15 ± 0.01 (g/g) at pH 6, showing a relation between the pH and the amount of mycotoxin adsorbed

The use of *S. boulardii* and *K. marxianus* cell walls as AFB<sub>1</sub> adsorbents has not been reported in the literature yet.

Yeast strain	Culture media	Whole cell		Cell wall	
		Adsorption Media ± SD (µg/g)	LSD	Adsorption Media ± SD (µg/g)	LSD
<i>S. boulardii</i> RC009	YPD	3.77 ± 1.25	a	40.47 ± 5.69	b
	DDGse	5.72 ± 0.79		43.82 ± 3.53	
<i>S. cerevisiae</i> RC012	YPD	4.13 ± 1.29		37.49 ± 1.54	
	DDGse	5.01 ± 0.22		37.85 ± 1.76	
<i>S. cerevisiae</i> VM014	YPD	3.43 ± 0.54		35.52 ± 9.28	
	DDGse	4.42 ± 0.40		43.93 ± 3.11	
<i>K. marxianus</i> VM004	YPD	3.69 ± 0.64		48.21 ± 1.09	
	DDGse	6.37 ± 0.09		44.52 ± 1.87	

Table 5. Adsorption of AFB<sub>1</sub> using whole cells and cell wall of *Saccharomyces boulardii* (RC009), *S. cerevisiae* (RC012 and VM014) and *K. marxianus* (VM004) in simulated gastrointestinal pH solution.

YPD: yeast extract – peptone – dextrose broth. DDGse: dried distiller grains with solubles extract. The same letters do not indicate significant differences. Analyses were performed for each column separately according to Fisher's minimal significant difference test (LSD) with a P <0.05.

It is known that the three-dimensional structure of the polysaccharides constituting the CW allows the adsorption of mycotoxins or their metabolic derivatives (YIANNIKOURIS et al. 2004a, 2004b). DEVEGOWDA and CASTALDO (2000) explained that the interaction of AFB<sub>1</sub> with the CW is from mannan glucans through hydrogen bonds. YIANNIKOURIS et al. (2006) showed that the interaction with mycotoxins is due to the helical conformation of 1-3 β glucans in the complexation of ZEN, AFB<sub>1</sub>, DON and PAT. The 1-3 β glucans participate in Van der Waals unions and hydrogen bonds, while 1-6 β glucans strengthen Van der Waals unions and stabilize the interaction.

The efficiency to adsorb mycotoxins is a complex function of the following three factors: chemical structure of the toxin, adsorbent composition and the pH of the medium.

## 8 | CONCLUSIONS AND CONSIDERATIONS

Yeasts are used as supplements in animal feed due to their relatively high content of proteins and amino acids, energy and micronutrients compared to common cereals and oilseed meals. Whole cells, cell walls, wall components ( $\beta$ -glucans, mannanoligosaccharides) have been shown to improve the performance and health of animal growth. Nowadays, they are commercialized and there are many researches that evaluate the use of yeasts on the potential development and benefits for the health of animals. Still, it is necessary to develop biotechnological strategies such as the one proposed in this chapter. The advances described here demonstrate the potential of cell walls obtained from yeasts isolated from animal environments such as *S. boulardii* RC009 and *S. cerevisiae* RC 0012 and from whey such as *S. cerevisiae* VM014 and *K. marxianus* VM004, all with probiotic properties, to be used as AFB<sub>1</sub> adsorbents. In addition, the use of DDGse as a carbon source could replace a synthetic medium as YPD for the production of biomass and CW.

Increasing the thickness of yeast walls to be used as feed additives and mycotoxin adsorbents is a promising strategy. Future studies should optimize biomass production methodologies using different industrial wastes as carbon sources, which is important from the environmental point of view since it would be giving added value to the waste and somehow avoid environmental contamination, optimize wall extraction methodologies and their components to be cost-effective, low-cost products that would help prevent mycotoxicosis in animal production.

In conclusion, the use of these YCW as a mycotoxin adsorbent is a strategy to reduce the exposure to animals (and consequently to humans) of mycotoxins.

## 9 | ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the Universidad Nacional de Rio Cuarto, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina (CONICET), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT-FONCYT) which supported this study through grants.

## REFERENCES

ACHUPALLAS, J.M., ZHOU, Y. and DAVIS, D.A. Pond Production of Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, Feed Grain Distillers Dried Yeast. **Aquaculture Nutrition**, 22 (6), 22-29. 2016.

ADT, I., TOUBAS, D., PINON, J.M., MANFAIT, M. and SOCKALINGUM, G.D. FTIR spectroscopy as a potential tool to analyse structural modifications during morphogenesis of *Candida albicans*. **Archives Microbiology**, 85, 277-285. 2006.

AGEIROS, J.M., VALLEJOS, J.A., VIEGA CRESPO, P., VILLA, T.G. Oily yeasts as oleaginous cell factories. **Appl Microbiol Biotechnol**, 90: 1219 – 1227. 2011.

- AGUILAR USCANGA, B., FRANÇOIS, J.M. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. **Letter Applied Microbiology**, 37(3):268-74. 2003.
- AHMAD, I., BANI, M.S., NOORI, F., FARZANEH, M., MOGHANLOU, K.S. The effect of bentonite and yeast cell wall along with cinnamon oil on aflatoxicosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Digestive enzymes, growth indices, nutritional performance and proximate body composition. **Aquaculture**, 476: 160–167. 2017.
- AHMAD, A., MUHAMMAD, ANJUM, F., ZAHOOR, T., NAWAZ, H., AHMED, Z. Extraction and characterization of  $\beta$ -D-glucan from oat for industrial utilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, 46, 304-309. 2010.
- AMARAL, P.F.F., COELHO, M.A.Z., MARRUCHO, I.M., and COUTINHO, J.A.P.; Biosurfactants from Yeasts: Characteristics, Production and Application, in **Biosurfactants**, edited by Ramkrishna Sen, Landes Bioscience. 2008
- ARMANDO, M.R., PIZZOLITTO, R.P., DOGI, C.A., CRISTOFOLINI, A., MERKIS, C., DALCERO, A.M., et al. Adsorption of ochratoxin A and zearalenone by potential probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains and its relation with cell wall thickness. **Journal of Applied Microbiology**, 113(2), 256–264. 2012.
- NAVIDSHAD, B., BOO LIANG, J., JAHROMI, M.F., AKHLAGHI, A., and ABDULLAH, N.A comparison between a yeast cell wall extract (Bio-Mos®) and palm kernel expeller as mannan-oligosaccharides sources on the performance and ileal microbial population of broiler chickens, **Italian Journal of Animal Science**, 14:1, 3452, 2015.
- BARRANCO, A.S., VICO, J.P., GRILLÓ, M.J., MAINAR, J.R.C. Reduction of subclinical *Salmonella* infection in fattening pigs after dietary supplementation with a  $\beta$ -galactomannan oligosaccharide. **Journal Applied Microbiology**, 118: 284–294. 2015.
- BIN, D., FENGMEI, Z., BAOJUN, X.  $\beta$ -Glucan extraction from bran of hull-less barley by accelerated solvent extraction combined with response surface methodology. **Journal of Cereal Science**, 59: 95-100. 2014.
- CHACHER, M.F.A., KAMRAN, Z., AHSAN, U., AHMAD, S., KOUTOULIS, K.C., QUTAB H.G. et al. Use of mannan oligosaccharide in broiler diets: an overview of underlying Mechanisms. **World's Poultry Science Journal**, Vol. 73, December 2017.
- CHE, T.M., JOHNSON, R.W., KELLEY, K.W., DAWSON, K.A., MORAN, C.A. and PETTIGREW, J.E. Effects of mannan oligosaccharide on cytokine secretion by porcine alveolar macrophages and serum cytokine concentrations in nursery pigs. **Journal Animal Science**, 90: 657-668. 2012.
- DE GROOT, P.W., RUIZ, C., VÁZQUEZ DE ALDANA, C.R., DUEÑAS E., CID. J et al. A genomic approach for the identification and classification of genes involved in cell wall formation and its regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Comp. Funct. Genomics** 2: 124–142. 2001.
- DEVEGOWDA, G., CASTALDO, D. Mycotoxins: hidden killers in pet foods. Is there a solution. In: Technical Symposium on Mycotoxins. Alltech, Nicholasville. 2000.
- DHANASEKARAN, D., SHANMUGAPRIYA, S., THAJUDDIN, N. and PANNEERSELVAM, A. Aflatoxins and Aflatoxicosis in Human and Animals. Chapter 12, In: Aflatoxins – **Biochemistry and Molecular Biology**, ISBN 978-953-307-395-8. 2011.
- DÍAZ-VERGARA, L., PEREYRA, C., MONTENEGRO, M., PENA, G., AMINAHUEL, C., CAVAGLIERI, L. Encapsulated whey–native yeast *Kluyveromyces marxianus* as a feed additive for animal production. **Food Additives & Contaminants: Part A**, 34(5):750-759. 2017.

- DOGİ, C.A., ARMANDO, M.R., ROSA, C.A.R., LUDUEÑA, R., DALCERO, A.M., CAVAGLIERI, L.R. *Saccharomyces cerevisiae* strains retains their viability and aflatoxin B<sub>1</sub> binding ability under gastrointestinal conditions and improves ruminal fermentation. **Food Additives and Contaminants Part A**, 28(12), 1705 - 1711. 2011.
- FIORI, S., URGEGHE, P., HAMMAMI, W., RAZZU, S., JAOUA, S., MIGHELI, Q. Biocontrol activity of four non- and low-fermenting yeast strains against *Aspergillus carbonarius* and their ability to remove ochratoxin A from grape juice. **International Journal Food Microbiology**, 189, 45–50. 2014.
- FOCHESATO, AS, M.A GALVAGNO, P.C CERRUTTI, M.L GONZALEZ PEREYRA, et al. Optimization and Production of Probiotic and Antimycotoxin Yeast Biomass Using Bioethanol Industry Waste via Response Surface Methodology. **Adv Biotech & Micro.**; 8(1): . 2018
- FRANCOIS, J.M. A simple method for quantitative determination of polisaccharides in fungal cell walls. **Nature Protocols**, 1 (6). Doi:10.1038/nprot.2006.457. 2006.
- GALICHET, A., SOCKALINGUM, G.D., BELARBI, A., and MANFAIT, M. FTIR spectroscopic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: study of an anomalous strain exhibiting a pink-colored cell phenotype. **FEMS Microbiology Letters**, 197(2), 179-186. 2001.
- GANGLIANG, H. and JING. L. Efficient preparation of alkali-insoluble (1 → 3)-β-d-glucan. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, (63), 2, 184-186. 2011.
- GUANG-DA X., SHU-B.W., MINGAN C., ROBERT A. SWICK. Effects of yeast cell wall on growth performance, immune responses and intestinal short chain fatty acid concentrations of broilers in an experimental necrotic enteritis model. **Animal Nutrition**, (3) 399-405. 2017.
- HONG, K.K., NIELSEN, J., Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: a key cell factory platform for future biorefineries. **Cell. Mol. Life Sci.**, 69:2671–2690. 2012.
- JOANNIS CASSAN, C., TOZLOVANU, M., HADJEBA-MEDJDOUB, K., BALLEET, N. and PFOHL-LESZKOWICZ, A. Binding of Zearalenone, Aflatoxin B<sub>1</sub> and ochratoxin A by Yeast-based products: a method for quantification of adsorption performance. **J Food protection**, 74(7), 1175-1185. 2011.
- JOHNSON, E.A. and ECHAVARRI – ERASUN, C. The Yeast, a Taxonomy Study, Chapter 3. Yeast Biotechnology. 2011.
- JOHNSON, E.A.; Biotechnology of non-**Saccharomyces** yeasts—the ascomycetes. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 97: 503–517. 2013.
- JOUANY, J.P., YIANNIKOURIS, A., BERTIN, G. The chemical bonds between mycotoxins and cell wall components of *Saccharomyces cerevisiae* have been identified. **Arch Zoot.**, 8, 26-50. 2005.
- KABAK, B.W., DOBSON, A.D., and VAR, I. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 46(October 2012), 593–619. 2006.
- KEIMER, B.S., KRÖGER, I., RÖHE, R., PIEPER, A., , ZENTEK, S.J. Influence of differently processed yeast (*Kluyveromyces fragilis*) on feed intake and gut physiology in weaned pigs. **Journal of Animal Science**, Volume 96, Issue 1, 15, Pages 194–205, 2018.
- KULIGOWSKI, J., QUINTÁS, G., HERWIG, C., LENDL, B. A rapid method for the differentiation of yeast cells grown under carbon and nitrogen-limited conditions by means of partial least squares discriminant analysis employing infrared micro-spectroscopic data of entire yeast cells. **Talanta**. 15; 99:566-73. 2012.
- KUMURA, H., TANOUE, Y., TSUKAHARA, M., TANAKA, T. and SHIMASAKI, K. Screening of dairy

yeast strains for probiotic applications. *Journal of Dairy Science* (87), 4050-4056. 2004.

KWIATKOWSKI, S., and KWIATKOWSKI, S.E. Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Glucan Polysaccharides – Occurrence, Separation and Application in Food, Feed and Health Industries. Chapter 2. 2012.

LIU, N., WANG, J.Q., JIA, S.C., CHEN, Y.K. and WANG, J.P. Effect of yeast cell wall on the growth performance and gut health of broilers challenged with aflatoxin B<sub>1</sub> and necrotic enteritis. *Poultry Science* 97:477–484 2018.

MACCAFERRI, S., KLINDER, A., BRIGDI, P., CAVINA, P. and COSTAVILLE, A. Potencial probiotic *Kluyveromyces marxianus* B0399 modulates the immune response in Caco-2 cells and Peripheral Blood Mononuclear Cells and impacts the human gut microbiota in an in vitro colonic model system. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(4), 956-964. 2011.

MAGNOLI, A., RODRIGUEZ, M., POLONI, V., PERALTA, M.F., NILSON, A.J., MIAZZO, R.D., et al., Novel yeast isolated from broilers feedstuff, gut and faeces as aflatoxin B<sub>1</sub> adsorbents. *Journal Applied Microbiology*, 121, 1766--1776. 2016.

MAGNOLI, A.P., M.C. RODRIGUEZ, M.L. GONZÁLEZ PEREYRA, V.L. POLONI, M.F. PERALTA, A.J. NILSON, et al. Use of yeast (*Pichia kudriavzevii*) as a novel feed additive to ameliorate the effects of aflatoxin B<sub>1</sub> on broiler chicken performance. *Mycotoxin Research*, (33), 4, 273–283. 2017.

MAŁGORZATA P. and MASEK A. *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall Components as Tools for Ochratoxin A Decontamination. *Toxins*, 7, 1151-1162. 2015.

MARRERO, Y., CASTILLO, Y., RUIZ, O., BURROLA, E., ANGULO, C. Feeding of yeast (*Candida* spp.) improves in vitro ruminal fermentation of fibrous substrates. *Journal of Integrative Agriculture*, (14): 3, 514-519. 2015.

MCFARLAND, L.V. Common Organisms and Probiotics: *Saccharomyces boulardii*. In: Implications for Human Health, Prebiotics, Probiotics, and Dysbiosis. *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology*, 145-164. 2017.

MOON S.H., INYOUNG L., XI F., HYUN Y.L., JIHEE K., and DONG U.A. Effect of Dietary Beta-Glucan on the Performance of Broilers and the Quality of Broiler Breast Meat. *Asian-Australas J Anim Sci.*, 29(3): 384–389. 2016.

MORRISON SJ, DAWSON S, CARSON AF. The effects of mannan oligosaccharide and Streptococcus faecium addition to milk replacer on calf health and performance. *Livest Sci.*; 131:292–296. 2010.

NARUEMON M, ROMANEE S, CHEUNJIT P, XIAO H, MC LANDSBOROUGH LA and PAWADEE M. Influence of additives on *Saccharomyces cerevisiae* β-glucan production. *International Food Research Journal*, 20(4): 1953-1959. 2013.

NGUYEN TH, FLEET GH and ROGERS PL. Composition of the cell walls of several yeast species. *Applied Microbiology Biotechnology*, 50: 206-212. 1998.

Omer N., Jawaria Ali Khan, Muhammad Sarwar Khan, Muhammad Ovais Omer, Muhammad Avais, Muhammad Luqman Sohail, et al. Efficacy of β-glucans and manna oligosaccharides (Yeast Cell Wall) and hydrated sodium calcium aluminosilicate (HSCAS) in preventing aflatoxicosis in bovine calves. *Indian J. Anim. Res.*, 52 (6) 887-892. 2018:

OZYURT, M., and DEVECI, U.D. Conversion of agricultural and industrial wastes for single cell production and pollution potential reduction: a review. *Fresenius Environmental bulletin* (fresen environ bull), 13, 693-699. 2004.

PATIL, A.K., KUMAR, S., VERMA, A.K., and BAGHEL, R.P.S. Probiotics as feed additives in weaned pigs: A review. *Livestock Research International*, 3(2), 31–39. 2015.

PEREYRA C., GIL S., MAKITA M., CRISTOFOLINI A., MONGE M., BAINOTTI B., et al. Potencial Biotecnológico de *Kluyveromyces marxianus* VM004 Para Adsorber Aflatoxina B<sub>1</sub>. IX Congreso Latinoamericano de Micología. Del 22 al 25 de agosto de 2017. Lima, Perú.

PEREYRA C.M, CAVAGLIERI L.R, POLONI V., CHIACCHIERA S.M, CRISTOFOLINI A., MERKIS C., et al.. Effect of pH on ultra-structure of wall dead conidia of *Aspergillus niger* aggregate and their relation to the zearalenone adsorption capacity. *World Mycotoxins Journal*. 2016.

PEREYRA C.M., GIL S., CRISTOFOLINI A., BONCI M., MAKITA M., MONGE M.P., et al. The production of yeast cell wall using an agroindustrial waste influences the wall thickness and is implicated on the aflatoxin B<sub>1</sub> adsorption process. *Food Research International* 111, 306–313. 2018.

PEREYRA, C.M., CAVAGLIERI, L.R., CHIACCHIERA, S.M., DALCERO, A.M. The corn influence on the adsorption levels of aflatoxin B<sub>1</sub> and zearalenone by yeast cell wall. *Journal Applied Microbiology*, 114(3): 655-662. 2012.

PIZZOLITTO R.P., ARMANDO M.R., COMBINA M., CAVAGLIERI L.R., DALCERO A.M. and SALVANO M.A. Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* strains as probiotic agent with aflatoxin B<sub>1</sub> adsorption ability to be used in poultry feedstuffs. *Journal of Environmental Science and Health, Part B. Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 47, 933-941. 2012

PLATA MR, KOCH C, WECHSELBERGER P, HERWIG C, LENDL B. Determination of carbohydrates present in *Saccharomyces cerevisiae* using mid-infrared spectroscopy and partial least squares regression. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(25): 8241–8250. 2013.

POLONI V., DOGI C., PEREYRA C., FERNANDEZ JURI MG., KOHLER P., ROSA C., et al. Potention of aflatoxin B<sub>1</sub> adsorbant effect of a commercial additive mixed with different probiotic yeast strains. *Food Additives and Contaminants*, 2015.

REDDY, K.R.N., SALLEH, B., SAAD, B., ABBAS, H.K., ABEL, C.A, and SHIER, W. T. An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health. *Toxin Reviews*, 29(1), 3–26. 2010.

RINGOT, D., LERZY, B., BONHOURE, J.P., AUCLAIR, E., ORIOL, E., and LANONDELLE, Y. Effect of temperature on in vitro ochratoxin A biosorption onto yeast cell wall derivates. *Process Biochemistry*, 40: 3008-3016. (2005).

RODRIGUEZ-ESTRADA U., SHUICHI S., YUTAKA H., HIROSHI F., and JOHN S. Effects of Inactivated Enterococcus faecalis and Mannan Oligosaccharide and Their Combination on Growth, Immunity, and Disease Protection in Rainbow Trout. *North American Journal of Aquaculture*, 75:3, 416-428. 2013.

ROSEN, G.D. Holo-analysis of the efficacy of Bio-Mos® in turkey nutrition. *British Poultry Science*, 48: 27-32. 2007.

SCHMID I, SCHEE H, GASSEL S, JIN C, BUCKINGHAM J, HUMBELIN M, et al.. Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma*/*Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 89: 555-571. 2011.

SERRAT-DÍAZ M., VALLEJO-VIDAL, J.A., AGEITOS-MARTÍNEZ, J.M., LLAURADÓ-MAURI, G., URDANETA-LAFFITA, I., VILLA, T.G. Influencia de las condiciones de cultivo sobre el crecimiento y contenido de pared celular en una cepa floculante de *Kluyveromyces marxianus* Influence of the Culture Conditions on the Growth and Cell Wall Content in a Flocculent Strain of *Kluyveromyces marxianus*. *Rev. Cubana Quím.*, (29):,1, 89-102, e-ISSN: 2224-5421. 2017.

- SHARMA, N.K., BENIWAL, V., KUMAR, N., KUMAR, S., PATHERA, A.K., and RAY, A. Production of tannase under solid-state fermentation and its application in detannification of guava juice. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, 4(3), 281-290. 2014.
- SHOKRI H, ASADI F, KHOSRAVI AR. Isolation of beta-glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. **Nat Prod Res.** 20;22(5):414-21. 2008.
- SIBIRNY, A.A. and BORETSKY, Y.R. *Pichia guilliermondii*, in **Yeast Biotechnology: Diversity and Application**, T. Satyanarayana, G. Kunze (eds.), Springer Science + Business Media B.V. 2009.
- SPENCER, J., RAGOUT DE SPENCER, A., LALUCE, C. Non-conventional yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 58: 2,147–156. 2002.
- STONE C.W. Yeast products in the feed industry: a practical guide for feed professionals. <https://en.engormix.com/feed-machinery/articles/yeast-products-infeed-industry-t33489.htm>. 2006.
- TAMANG, J.P. and FLEET, G.H.; Yeasts Diversity in Fermented Foods and Beverages, in *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*, 170-199, T. Satyanarayana and Gotthard Kunze (Editors) Springer, 2009.
- TORRECILLAS, S., A. MAKOL, M. J. CABALLERO, D. MONTERO, R. GINES, J. SWEETMAN, et al. Improved feed utilization, intestinal mucus production and immune parameters in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannanoligosaccharides (MOS). **Aquaculture Nutrition**, 17:223–233. 2011.
- VAR I, ERGINKAYA Z, KABAK B. Reduction of ochratoxin A levels in white wine by yeast treatments. **Journal- Institute of Brewing**, 115, 30–34. 2009.
- VARELAS V.P., TATARIDIS, M. LIOUNI, E. T. NERANTZIS. Application of different methods for the extraction of yeast  $\beta$ -glucan. **e-Journal of Science & Technology**, (e-JST). 75 – 89. 2016.
- VIEIRA, A.T., TEIXEIRA, M.M., and MARTINS, F.S. The role of probiotics and prebiotics in inducing gut immunity. **Frontiers in Immunology**, 2013
- VILA-DONAT, P., MARÍN, S., SANCHIS, V., and RAMOS, A. J. A review of the mycotoxin adsorbing agents, with an emphasis on their multi-binding capacity, for animal feed decontamination. **Food and Chemical Toxicology**, 114, 246–259. 2018.
- WALKER, G.M. Yeast physiology and biotechnology. First edition. John Wiley and Sons Ltd. USA. 1999.
- WANG W, LI Z, LV Z, ZHANG B, LV H, GUO Y. Effects of *Kluyveromyces marxianus* supplementation on immune responses, intestinal structure and microbiota in broiler chickens. **PLoS One**, 12(7): 2017.
- YIANNIKOURIS, A., ANDRÉ, G., POUGHON, L., FRANÇOIS, J., DUSSAP, C., JEMINET, G., et al. Chemical and conformational study of the interactions involved in mycotoxin complexation with  $\beta$ -D-glucans. **Biomacromolecules**, 7,1147-1155. 2006.
- YIANNIKOURIS, A., FRANÇOIS, J., POUGHON, L., DUSSAP, C.G., BERTIN, G., JEMINET, G., et al. Alkali extraction of  $\beta$ -D-glucans from *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and study of their adsorptive properties towards Zearalenone. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52: 3666-3673. 2004b.
- YIANNINKOURIS, A., FRANCOIS, J., POUGHON, L., DUSSAP, C.G., JEMINET, G., and JOUANY, J.P. Adsorption of zearalenone by  $\beta$ -D-glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Journal of Food Protection**, 67: 1195-1200. 2004a.

YIANNINKOURIS, A., POUGHON, L., CAMELEYRE, X., DUSSAP, C.G., FRANCOIS, J., BERTIN, G., et al. A novel technique to evaluate interactions between *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and mycotoxins: application to zearalenone. ***Biotechnology Letters***, 25: 783-789. 2003.

YIN Y, YAN L, JIANG J, MA Z. Biological control of aflatoxin contamination of crops. ***Journal of Zhejiang University-SCIENCE B***, 9:789-792. 2008.

ZHU, Y., HASSAN, Y. I., WATTS, C., y ZHOU, T. Innovative technologies for the mitigation of mycotoxins in animal feed and ingredients-A review of recent patents. ***Animal Feed Science and Technology***, 216, 19–29. 2016.

## CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E HISTOQUÍMICA DA LÂMINA FOLIAR DE *Calotropis procera* (Aiton) W.T.Aiton

### Rafaela Damasceno Sá

Universidade Federal de Pernambuco,  
Departamento de Ciências Farmacêuticas,  
Laboratório de Farmacognosia  
Recife-Pernambuco

### Adolfo Santos da Silva

Universidade Federal de Pernambuco,  
Departamento de Ciências Farmacêuticas,  
Laboratório de Farmacognosia  
Recife-Pernambuco

### Deysielle Maria dos Santos

Universidade Federal de Pernambuco,  
Departamento de Ciências Farmacêuticas,  
Laboratório de Farmacognosia  
Recife-Pernambuco

### Karina Perrelli Randau

Universidade Federal de Pernambuco,  
Departamento de Ciências Farmacêuticas,  
Laboratório de Farmacognosia  
Recife-Pernambuco

**RESUMO:** *Calotropis procera* (Aiton) W.T.Aiton, popularmente conhecida como algodão-de-seda, é uma espécie da família Apocynaceae muito utilizada no Brasil como ornamental e como medicinal. Este estudo teve como objetivo a caracterização anatômica e histoquímica da lâmina foliar de *C. procera*. Para a caracterização anatômica, lâminas semipermanentes contendo secções transversais e paradérmicas da lâmina

foliar foram analisadas em microscopia de luz. Para a histoquímica, secções transversais de lâminas foliares frescas foram submetidas a diferentes reagentes. A folha é anfiestomática, com estômatos anomocíticos. A nervura central é biconvexa e apresenta feixe vascular bicolateral. Canais laticíferos estão presentes no parênquima. O mesofilo é isobilateral. Através da histoquímica foram evidenciados alcaloides, compostos lipofílicos, óleos essenciais, lignina e amido. Os caracteres observados contribuem para o controle de qualidade da espécie.

**PALAVRAS-CHAVE:** Apocynaceae; Farmacobotânica; Microscopia; Padronização.

### ANATOMICAL AND HISTOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE LEAF BLADE OF *Calotropis procera* (Aiton) W.T.Aiton

**ABSTRACT:** *Calotropis procera* (Aiton) W.T.Aiton, popularly known as algodão-de-seda, is a species of the Apocynaceae family widely used in Brazil as ornamental. This study aimed the anatomical and histochemical characterization of the leaf blade of *C. procera*. For the anatomical characterization, semipermanent slides containing transverse and paradermic sections of the leaf blade were analyzed by light microscopy. For histochemistry, cross-sections of fresh leaf

blades were submitted to different reagents. The leaf blade is amphistomatic, with anomocytic stomata. The midrib is biconvex and presents bicollateral vascular bundle. Laticiferous channels are present in the parenchyma. The mesophyll is isobilateral. Through histochemistry were evidenced alkaloids, lipophilic compounds, essential oils, lignin and starch. The observed characters contribute to the quality control of the species.

**KEYWORDS:** Apocynaceae; Pharmacobotany; Microscopy; Standardization.

## 1 | INTRODUÇÃO

A família Apocynaceae compreende cerca de 400 gêneros e aproximadamente 3.700 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. São plantas de hábitos variados, incluindo entre lianas, árvores, arbustos e herbáceas (SOUZA; LORENZI, 2012). No Brasil ocorrem 78 gêneros e 783 espécies encontradas em todo o território nacional (KOCH et al., 2015).

A família é caracterizada por espécies que apresentam em sua constituição química inúmeros compostos, entre eles glicosídeos cardiotônicos e alcaloides indólicos (KANJI; MACLEAN, 2012). Várias substâncias têm sido isoladas a partir dos gêneros de Apocynaceae, algumas delas sendo protótipos de classes farmacológicas distintas, como os alcaloides reserpina (com indicação anti-hipertensiva e para arritmias cardíacas), vimblastina e vincristina (antitumorais) e os glicosídeos cardiotônicos ouabaína, estrofantinidina e cimarina (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

Além dos representantes com propriedades medicinais, outras espécies são também cultivadas e comercializadas como ornamentais, como é o caso de *Calotropis procera* (Aiton) W.T.Aiton. Esta é uma planta laticífera, de porte arbustivo ou arbóreo, com aproximadamente 2,5 m de altura, originária da África, Índia e Pérsia e introduzida no Brasil como ornamental (KISMANN; GROTH, 1999; RANGEL; NASCIMENTO, 2011). É conhecida como algodão-de-seda e utilizada na medicina popular para tratar diversas doenças, principalmente suas folhas e seu látex (SILVA et al., 2010). Algumas revisões de literatura mostraram também que a espécie apresenta diversas atividades farmacológicas comprovadas (COSTA et al., 2015; BAIRAGI; GHULE; GILHOTRA, 2018).

Entretanto, observa-se na literatura que há poucos estudos com relação à descrição anatômica da espécie e à histolocalização de seus compostos. Por isso, o objetivo desse trabalho foi realizar a caracterização anatômica e histoquímica da lâmina foliar de *C. procera*, para estabelecer os caracteres úteis na identificação correta dessa espécie.

## 2 | METODOLOGIA

Para a caracterização anatômica, secções transversais de lâminas foliares de *C. procera* foram obtidas à mão livre, usando lâmina comum de barbear e medula do pecíolo de embaúba (*Cecropia* sp.) como material de suporte. Secções paradérmicas também foram realizadas nas faces abaxial e adaxial. Em seguida, todas as secções foram submetidas a uma solução de hipoclorito de sódio (50%) para processo de descoloração (KRAUS; ARDUIN, 1997). Após lavagem em água destilada, as secções transversais foram coradas segundo técnica descrita por Bukatsch (1972), com safranina e azul de Astra (2:8, v/v) e as secções paradérmicas foram coradas com azul de metileno (KRAUTER, 1985).

Posteriormente, todas as secções foram montadas em lâminas semipermanentes, seguindo procedimentos usuais em anatomia vegetal (JOHANSEN; 1940; SASS; 1951). A análise das lâminas foi conduzida em imagens em software (Toup View Image), obtidas por câmera digital acoplada a um microscópio de luz (Alltion).

Para a caracterização histoquímica, secções transversais de lâminas foliares frescas foram obtidas pelo mesmo método utilizado na caracterização anatômica. Os seguintes reagentes específicos foram utilizados para indicar a presença dos metabólitos: vanilina clorídrica para taninos (MACE; HOWELL, 1974); tricloreto de antimônio para triterpenos e esteroides (MACE; BELL; STIPANOVIC, 1974); Dragendorff para detectar alcaloides (YODER; MAHLBERG, 1976); Sudan III para substâncias lipofílicas (SASS, 1951); reagente de Nadi para óleos essenciais (DAVID; CARDE, 1964); floroglucinol para lignina (JOHANSEN, 1940) e Lugol para amido (JOHANSEN, 1940). Controles foram realizados em paralelo aos testes e lâminas histológicas semipermanentes foram preparadas contendo as seções transversais (JOHANSEN, 1940; SASS, 1951), as quais foram analisadas sob microscópio de luz (Alltion).

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em vista frontal, a epiderme é constituída por células com formato poligonal (Fig. 1A). A lâmina foliar é caracterizada como anfiestomática e apresenta estômatos anomocíticos (Fig. 1A-B). De acordo com Metcalfe; Chalk (1950), na família Apocynaceae os estômatos podem ser anomocíticos em algumas espécies, paracíticos em outras e, algumas vezes, podem ser encontrados os dois tipos de estômatos na mesma espécie.

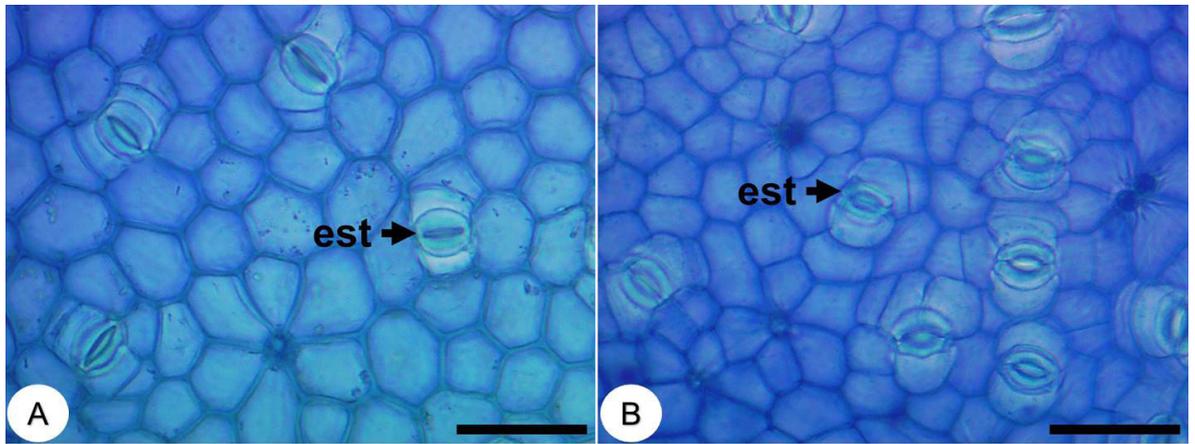


Figura 1 – Secções paradérmicas da lâmina foliar de *Calotropis procera* (Aiton) W.T.Aiton  
 A: Face adaxial; B: Face abaxial. est: estômato. Barras: A-B: 50  $\mu$ m.

Em secção transversal da lâmina foliar, a nervura central exibe contorno biconvexo (Fig. 2A). A epiderme é do tipo unisseriada, recoberta por uma espessa camada de cutícula (Fig. 2B), e apresenta tricomas tectores nas duas faces (Fig. 2C-D). Sob a epiderme encontram-se de três a cinco camadas de colênquima em ambas as faces (Fig. 2A). Em *C. gigantea* foram observadas de cinco a seis camadas de colênquima (RICHA; SHIKHA, 2015). Na região central da nervura situa-se um feixe vascular bicolateral (Fig. 2E). No parênquima observa-se amido e canais laticíferos (Fig. 2B). A presença de canais laticíferos é uma característica da família Apocynaceae (METCALFE; CHALK, 1950).

O mesofilo é isobilateral, com cerca de quatro camadas de parênquima paliçádico na face adaxial, uma a três camadas na face abaxial e o parênquima esponjoso na região central (Fig. 2F). *Calotropis gigantea* apresenta mesofilo dorsiventral (SETHI, 2014; RICHA; SHIKHA, 2015), sendo este um importante caractere para diferenciação dessas espécies.

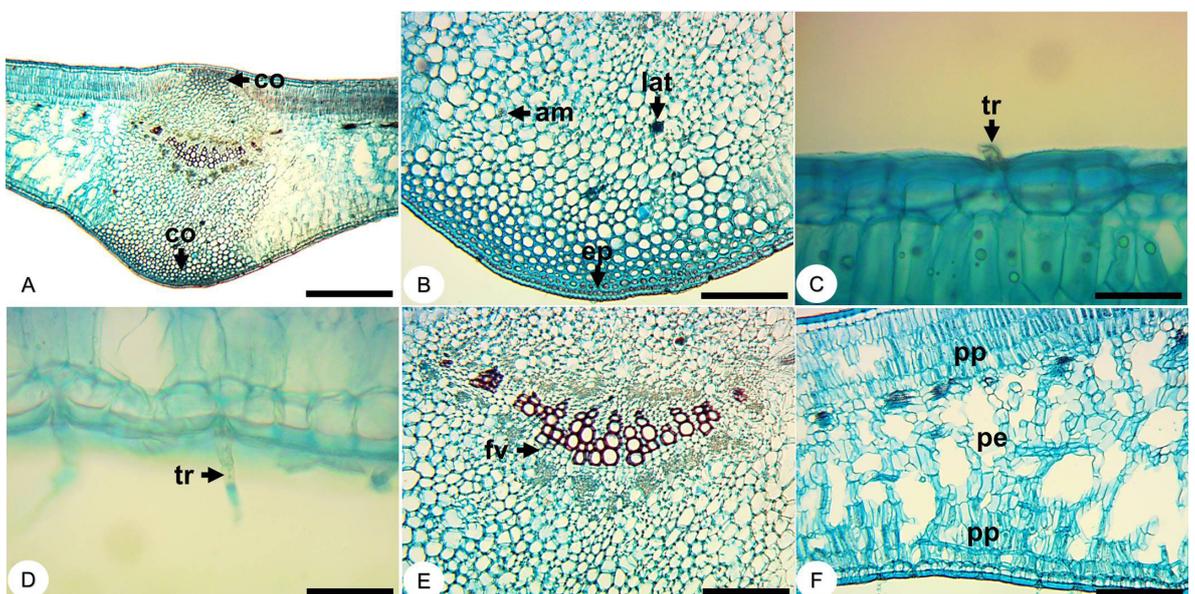


Figura 2 – Secções transversais da lâmina foliar de *Calotropis procera* (Aiton) W.T.Aiton

A-E: Nervura central; F: Mesofilo. am: amido; co: colênquima; ep: epiderme; fv: feixe vascular; lat: laticífero; pe: parênquima esponjoso; pp: parênquima paliçádico; tr: tricoma. Barras: A: 500  $\mu\text{m}$ ; B,E,F: 200  $\mu\text{m}$ ; C,D: 50  $\mu\text{m}$ .

A Figura 3A mostra a secção transversal da lâmina foliar de *C. procera* sem nenhum reagente. Alcaloides foram encontrados no parênquima da nervura central e no parênquima paliçádico (Fig. 3B-C). Compostos lipofílicos foram visualizados na cutícula (Fig. 3D) e óleos essenciais no parênquima da nervura central (Fig. 3E). A lignina presente no xilema foi evidenciada com floroglucinol (Fig. 3F) e grãos de amido foram evidenciados no parênquima da nervura central (Fig. 3G). Os testes para taninos, triterpenos e esteroides foram negativos. Em estudos fitoquímicos com a espécie coletada na Índia e na Nigéria foram encontrados taninos, terpenos e esteroides (SHOBOWALE et al., 2013; TIWARI; SINGH; SINGH, 2014; YADAV; NAGORI; DESAI). Entretanto, Neto et al. (2013) coletaram a espécie em Pernambuco-Brasil e, assim como o presente trabalho, obtiveram resultados negativos para a presença de taninos e terpenos.

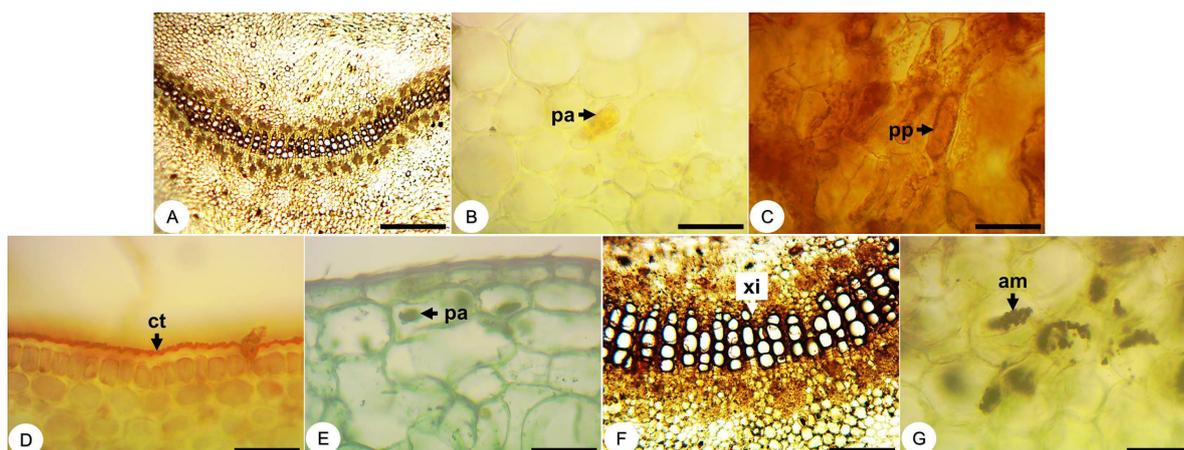


Figura 3 – Histoquímica da lâmina foliar de *Calotropis procera* (Aiton) W.T.Aiton

A: Controle; B,C: Dragendorff; D: Sudan III; E: Reagente de Nadi; F: Floroglucinol; G: Lugol. am: amido; ct: cutícula; pa: parênquima; pp: parênquima paliçádico; xi: xilema. Barras: A-G: 50  $\mu\text{m}$ .

#### 4 | CONCLUSÃO

A caracterização anatômica determinou os principais caracteres para identificação da espécie. A histoquímica demonstrou os locais de acúmulo e/ou síntese dos metabólitos presentes, colaborando na padronização farmacobotânica e podendo, assim, ser fundamental no auxílio de pesquisas e certificar o controle de qualidade da droga vegetal.

## REFERÊNCIAS

- BAIRAGI, S. M.; GHULE, P.; GILHOTRA, R. Pharmacology of natural products: an recent approach on *Calotropis gigantea* and *Calotropis procera*. **Ars Pharmaceutica**, v. 59, n. 1, p. 37-44, 2018.
- BUKATSCH, F. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. **Mikrokosmos**, v. 61, n. 8, p. 255, 1972.
- COSTA, N. D. J. et al. Potencial terapêutico e tecnológico da planta *Calotropis procera*. **Rev. GEINTEC**, v. 5, n. 3, p. 2222-2236, 2015.
- DAVID, R.; CARDE, J. P. Coloration différentielle des inclusions lipidiques et terpéniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du réactif nadi. **C R Acad. Sci. Paris, ser D**, v. 258, p. 1338-1340, 1964.
- DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo: Editora UNESP, 2002.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc., 1940. 523p.
- KANJI, S.; MACLEAN, R. D. Cardiac glycoside toxicity: more than 200 years and counting. **Crit. Care Clin.**, v. 28, p. 527-535, 2012.
- KISMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. 2. ed. São Paulo: BASF, 1999.
- KOCH, I. et al. **Apocynaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB48> >.
- KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, 1997. 198p.
- KRAUTER, D. Erfahrungen mit Etzolds FSA-Färbung für pflanzenschnitte. **Mikrokosmos**, v. 74, p. 231-233, 1985.
- MACE, M. E.; BELL, A. A.; STIPANOVIC, R. D. Histochemistry and isolation of gossypol and related terpenoids in root of cotton seedlings. **Phytophatol.**, v. 64, p. 1297-1302, 1974.
- MACE, M. Z.; HOWELL, C. R. Histochemistry and identification of condensed tannin precursors in roots of cotton seedlings. **Can. J. Bot.**, v. 52, p. 2423-2426, 1974.
- METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses**. Oxford: Clarendon Press, 1950.
- NETO, M. C. L. et al. Evaluation of antihyperglycaemic activity of *Calotropis procera* leaves extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 23, n. 6, p. 913-919, 2013.
- RANGEL, E. S.; NASCIMENTO, M. T. Ocorrência de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. (Apocynaceae) como espécie invasora de restinga. **Acta Bot. Bras.**, v. 25, p. 657-663, 2011.
- RICHA, K. H.; SHIKHA, S. Phytochemical investigations and anatomical study of two species of *Calotropis* from Chandigarh. **Int. J. Pharm. Sci. Res.**, v. 6, n. 4, 1452-1459, 2015.
- SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. 2. ed. Ames: The Iowa State College Press, 1951. 391p.
- SETHI, P. Morphological, microscopical, physico-chemical and antimicrobial investigations on leaves of

*Calotropis gigantea* Linn. **Int. J. Res. Ayurveda Pharm.**, v. 5, n. 2, p. 193-197, 2014.

SHOBOWALE, O. O. et al. Phytochemical and antimicrobial evaluation of aqueous and organic extracts of *Calotropis procera* ait leaf and latex. **Nigerian Food J.**, v. 31, n. 1, p. 77-82, 2013.

SILVA, M. C. A. et al. Therapeutic and biological activities of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. **Asian Pac. J. Trop. Med.**, v. 3, n. 4, p. 332-336, 2010.

SOUZA, V.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2012. 768p.

TIWARI, A.; SINGH, S.; SINGH, S. Chemical analysis of leaf extracts of *Calotropis procera*. **Int. J.Sci. Res. Publications**, v. 4, n. 1, p. 407-424, 2014.

YADAV, S. K.; NAGORI, B. P.; DESAI, P. K. Pharmacological characterization of different fractions of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) in streptozotocin induced experimental model of diabetic neuropathy. **J. Ethnopharmacol.**, v. 152, n. 2, p. 349-357, 2014.

YODER, L. R.; MAHLBERG, P. G. Reactions of alkaloid and histochemical indicators in laticifers and specialized parenchyma cells of *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). **Am. J. Bot.**, v. 63, p. 1167-1173, 1976.

## CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E HISTOQUÍMICA DE *Schinus molle* L.

### **Luciano de Medeiros Dantas**

Universidade Federal de Campina Grande,  
Campus Cuité, Unidade Acadêmica de Biologia  
Cuité-Paraíba

### **Rafaela Damasceno Sá**

Universidade Federal de Pernambuco,  
Departamento de Ciências Farmacêuticas,  
Laboratório de Farmacognosia  
Recife-Pernambuco

### **Larisse Bianca Soares Pereira**

Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Departamento de Biologia, Laboratório de  
Anatomia e Ecofisiologia Vegetal  
Recife-Pernambuco

### **Karina Perrelli Randau**

Universidade Federal de Pernambuco,  
Departamento de Ciências Farmacêuticas,  
Laboratório de Farmacognosia

### **Flávia Carolina Lins da Silva**

Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Departamento de Biologia  
Recife-Brasil

**RESUMO:** *Schinus molle* L., Anacardiaceae, é uma árvore nativa da América Latina usada como ornamental, bebida e como medicinal. Para contribuir com a padronização farmacobotânica da espécie, o objetivo desse trabalho foi realizar um estudo anatômico e histoquímico de *S. molle*. Lâminas semipermanentes foram preparadas,

seguindo procedimentos usuais em anatomia vegetal, para análise de caule, pecíolo e lâmina foliar em microscopia óptica, de polarização e eletrônica de varredura. Testes histoquímicos foram realizados na lâmina foliar. Os principais caracteres úteis para a identificação da planta foram determinados. Através dos testes histoquímicos foi evidenciada a presença de compostos fenólicos, taninos, alcaloides, triterpenos e esteroides, substâncias lipofílicas, óleos essenciais, lignina e cristais de oxalato de cálcio. Os resultados dão suporte para o controle de qualidade da espécie.

**PALAVRAS-CHAVE:** Anacardiaceae; Microscopia; Controle de qualidade.

### ANATOMICAL AND HISTOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF *Schinus molle* L.

**ABSTRACT:** *Schinus molle* L., Anacardiaceae, is a tree native to Latin America used as ornamental, drink and as medicinal. To contribute to the pharmacobotanical standardization of the species, the objective of this work was performing an anatomical and histochemical study of *S. molle*. Semipermanent histological slides were prepared, following common plant anatomy procedures, for analysis of stem, petiole and leaflet in optical microscopy, polarization and scanning electron microscopy. Histochemical tests were performed in the leaflet. The main

characters useful in the identification of the plant were determined. Through the histochemical tests, it was evidenced the presence of phenolic compounds, tannins, alkaloids, triterpenes and steroids, lipophilic substances, essential oils, lignin and calcium oxalate crystals. The results provide support to quality control of the species.

**KEYWORDS:** Anacardiaceae; Microscopy; Quality control.

## 1 | INTRODUÇÃO

A família Anacardiaceae possui cerca de 80 gêneros e 873 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (STEVENS, 2001; APG IV, 2016). Destes, 14 gêneros e 53 espécies ocorrem no Brasil, abrangendo os domínios fitogeográficos da Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (SILVA-LUZ; PIRANI, 2015).

*Schinus L.*, um dos gêneros da família Anacardiaceae, reúne aproximadamente 37 espécies nativas das Américas, ocorrendo em áreas tropicais e subtropicais (ZONA, 2015). No Brasil existem 11 espécies, conhecidas como “árvore pimenta”, “pimenta-rosa” ou “aroeira”. São cultivadas como ornamentais e, em algumas regiões, ocorrem como plantas invasoras (ZONA, 2015; RAMÍREZ-ALBORES; BUSTAMANTE; BADANO, 2016).

*Schinus molle L.* é uma árvore de 5-8m de altura, de copa globosa, com ramos e folhas aromáticos, nativa da América do Sul (LORENZI; MATOS, 2002). No Brasil, é conhecida como aroeira (LEITÃO et al., 2014), aroeira salsa (CAMILO; BREGAGNOLI; SOUZA, 2013), aroeirinha, aroeira-de-folha-de-salso e aroeira-mansa (FENNER et al., 2006). Tem valor comercial como ornamental, aromatizante, pimenta e como óleo essencial. Suas folhas e cascas são utilizadas na medicina popular como repelente, analgésico, anti-inflamatório e antibacteriano (TEIXEIRA et al., 2014; CHIRINO et al., 2017).

Estudos fitoquímicos revelam a presença de polifenóis, terpenos e ácidos graxos na espécie (DOMINGUEZ; CARMONA; VENEGAS, 1971; POZZO-BALBI et al., 1978; YUEQIN et al., 2003; ONO et al., 2008; IBRAHIM; HAGGAG, 2013; MALCA-GARCÍA et al., 2017). Os terpenos são os principais constituintes do óleo essencial extraído das folhas e frutos (GOMES et al., 2013; CAVALCANTI et al., 2015). Encontram-se na literatura vários estudos farmacológicos com os óleos essenciais, os quais comprovam atividades: alelopática (SIMIONATTO et al., 2011), repelente e inseticida (BATISTA et al., 2016), antiparasitária (BALDISSERA et al., 2013), antimicrobiana (MARTINS et al., 2014), antioxidante (MARTINS et al., 2014) e antitumoral (MALCA-GARCÍA et al., 2017).

Ao destacar a eficiência de uma planta como medicinal ou como fonte de um composto importante, ressalta-se a importância de uma identificação correta. Portanto, o objetivo deste estudo foi realizar a caracterização anatômica e histoquímica de *S. molle*.

## 2 | METODOLOGIA

### 2.1 Material vegetal

Partes aéreas de *Schinus molle* L., localizadas entre o terceiro e quinto nós, foram coletadas de espécimes adultos que ocorrem na área urbana de Cuité., Paraíba, Brazil (06°29'01"S, 36°09'13"W). Uma exsicata foi depositada no Herbário Professor Vasconcelos Sobrinho (PEUFR), da Universidade Federal Rural de Pernambuco, sob número de tombamento 53.678.

### 2.2 Caracterização anatômica

Secções transversais na região mediana do caule, pecíolo e folíolo de material fresco foram obtidas à mão livre, usando uma lâmina de aço comum e medula do pecíolo de *Cecropia* sp. como material de suporte (OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 2009). As secções transversais foram descoloridas com hipoclorito de sódio (50%) (KRAUS; ARDUIN, 1997), lavadas com água destilada e coradas de acordo com técnica descrita por Bukatsch (1972) com safranina e azul de Astra. Para o folíolo também foram realizados cortes paradérmicos, de acordo com os procedimentos citados acima, mas foram corados com azul de metileno (KRAUTER, 1985). Em seguida, lâminas histológicas semipermanentes foram preparadas contendo as secções transversais e paradérmicas, seguindo procedimentos usuais em anatomia vegetal (JOHANSEN, 1940; SASS, 1951). As análises das lâminas foram conduzidas em imagens em software (Toup View Image), obtidas por câmera digital acoplada a um microscópio de luz (Alltion).

Para a caracterização em microscopia de polarização, lâminas histológicas semipermanentes foram preparadas com cortes transversais de caule, pecíolo e folíolo, obtidos pelo mesmo método utilizado para a análise em microscopia de luz. As lâminas foram analisadas sob microscópio de polarização (Leica DM750M) acoplado a câmera digital (Leica ICC50 W), através de imagens processadas em software (LAS EZ).

Para a caracterização em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), amostras de folíolos frescos foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% (com tampão de cacodilato de sódio 0,1M) e fixadas em solução de ósmio a 2% (com tampão de cacodilato de sódio 0,1M). Após desidratação em série etílica, o material foi submetido à secagem no ponto crítico (Bal-Tec CPD 030) e montado em stubs de MEV, com fita adesiva dupla face e revestido com ouro (Leica EM SCD 500) (HADDAD et al., 1998). Por fim, as amostras foram examinadas com um microscópio eletrônico de varredura (QUANTA 200 FEG) no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).

### 2.3 Caracterização histoquímica

Testes histoquímicos foram realizados em cortes transversais de folíolos frescos,

obtidos pelo mesmo método utilizado na caracterização anatômica. Os seguintes reagentes específicos foram utilizados para indicar a presença das substâncias: cloreto férrico (10%) para compostos fenólicos (JOHANSEN, 1940); vanilina clorídrica para taninos (MACE; HOWELL, 1974); Liebermann-Burchard para triterpenos e esteroides (MACE; BELL; STIPANOVIC, 1974); Dragendorff para detector alcaloides (YODER, 1976); Sudan III para substâncias lipofílicas (SASS, 1951); reagente de Nadi para óleos essenciais (DAVID; CARDE, 1964); floroglucinol para lignina (JOHANSEN, 1940); Lugol para amido (JOHANSEN, 1940) e ácido clorídrico (10%) para estabelecer a natureza química dos cristais (JENSEN, 1962). Controles foram realizados paralelamente aos testes e lâminas histológicas semipermanentes foram preparadas contendo as seções transversais (JOHANSEN, 1940; SASS, 1951), as quais foram analisadas sob microscópio óptico (Alltion).

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

O caule de *S. molle*, em secção transversal, possui formato circular (Fig. 1A), apresentando, em crescimento primário, epiderme unisseriada recoberta por cutícula espessa (Fig. 1B). Em regiões de desenvolvimento secundário, apresenta periderme (Fig. 1C) com algumas lenticelas (Fig. 1A). Observam-se tricomas tectores (Fig. 1C). Machado et al. (2018) não mencionaram a presença de tricomas no caule de *S. molle*. Tricomas tectores também foram observados no caule de *S. terebinthifolius* por Almeida (2013) e por Azevedo; Quirino; Bruno (2015). Entretanto, Almeida (2013) também descreveram tricomas glandulares no caule de *S. terebinthifolius* e Perrotta; Arambarri (2004) encontraram tricomas tectores e glandulares no caule de *S. longifolia*.

A região cortical do caule, em crescimento primário, é formada por duas a três camadas de colênquima e por oito a dez camadas de parênquima (Fig. 1B), enquanto que a região cortical do caule em crescimento secundário é formada somente por parênquima (Fig. 1C). Machado et al. (2018) observaram apenas colênquima na região cortical do caule de *S. molle*.

Fibras de esclerênquima formam um anel descontínuo ao redor de canais secretores (Fig. 1C), os quais são ovais e estão associados ao floema (Fig. 1D). A presença desses canais secretores associados ao floema é uma característica comum em Anacardiaceae (METCALFE; CHALK, 1940). Entretanto, em *S. longifolia* também foram encontrados canais secretores na região cortical do caule, entre a hipoderme e o colênquima (PERROTTA; ARAMBARRI, 2004). O sistema vascular é colateral e a região medular é composta de parênquima (Fig. 1A).

Cristais prismáticos e drusas são encontrados na região cortical e no floema (Fig. 1B-E). Azevedo; Quirino; Bruno (2015) citaram apenas a presença de drusas na região cortical do caule de *S. terebinthifolius*, enquanto Almeida (2013) descreveram cristais prismáticos e drusas na região cortical do caule de *S. terebinthifolius*. No caule de *S. longifolia* foram encontrados cristais prismáticos na região cortical e drusas na região

medular (PERROTTA; ARAMBARRI, 2004).

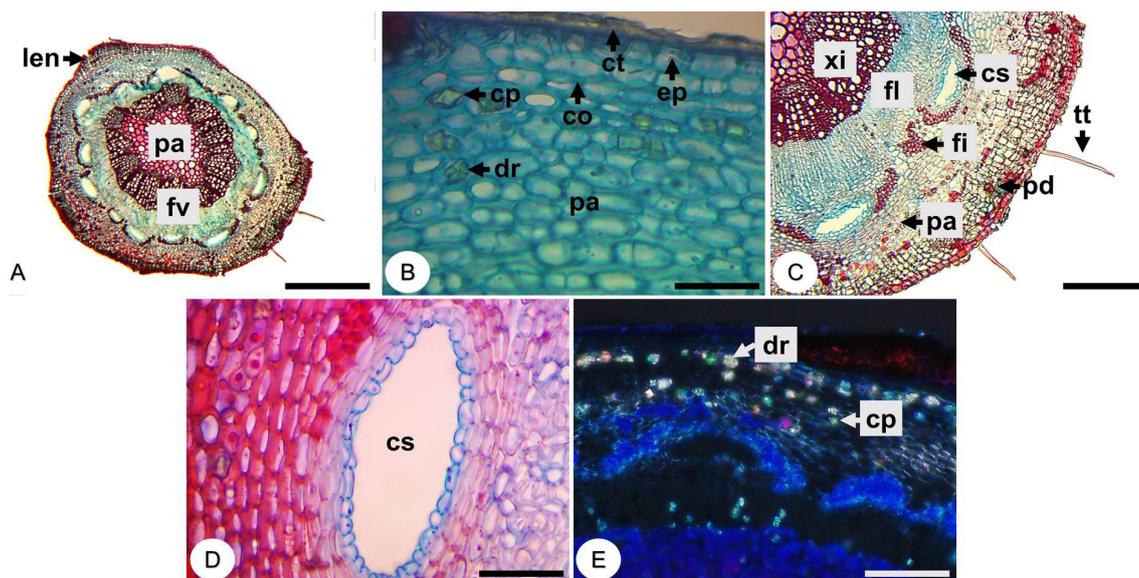


Figura 1 - Secções transversais do caule de *Schinus molle* L.

A: Aspecto geral; B-C: Detalhe da região cortical; D: Canal secretor; E: Cristais prismáticos e drusas. co: colênquima; cp: cristal prismático; cs: canal secretor; ct: cutícula; dr: drusa; ep: epiderme; fi: fibra; fl: floema; fv: feixe vascular; len: lenticela; pa: parênquima; pd: periderme; xi: xilema. Barras: A: 500  $\mu\text{m}$ ; B-D: 50  $\mu\text{m}$ ; C: 200  $\mu\text{m}$ ; E: 100  $\mu\text{m}$ .

O pecíolo, em secção transversal, possui formato cilíndrico (Fig. 2A-B). Almeida (2013) mencionaram um formato biconvexo para o pecíolo de *S. terebinthifolius*, enquanto Azevedo; Quirino; Bruno (2015) citaram um formato aproximadamente circular para *S. terebinthifolius*. Em *S. longifolia*, Perrotta; Arambarri (2004) verificaram um formato semicircular. A epiderme é unisseriada, recoberta por cutícula espessa e apresenta estômatos (Fig. 2C). Tricomas não foram encontrados no pecíolo de *S. molle*, o que pode ser considerado um importante caractere de diagnose, uma vez que foram encontrados tricomas tectores no pecíolo de *S. terebinthifolius* (ALMEIDA, 2013; AZEVEDO; QUIRINO; BRUNO, 2015) e tricomas tectores e glandulares no pecíolo de *S. longifolia* (PERROTTA; ARAMBARRI, 2004).

Observam-se uma a duas camadas subepidérmicas de parênquima (Fig. 2C), seguidas por duas a quatro camadas de parênquima paliçádico, dispostas lateralmente, formando um arco aberto em cada lado do córtex do pecíolo (Fig. 2A-B). Na região de encontro dos arcos de parênquima paliçádico, observa-se a presença de colênquima (Fig. 2A-B). No pecíolo de *S. terebinthifolius*, o parênquima paliçádico é composto por cerca de três a cinco camadas (AZEVEDO; QUIRINO; BRUNO, 2015).

Na região mais interna do córtex encontra-se parênquima e fibras de esclerênquima que, como visto no caule, formam um anel descontínuo em torno dos canais secretores associados ao floema (Fig. 2A-B). No entanto, no pecíolo os canais secretores estão em número de cinco e estão voltados para a face abaxial (Fig. 2A-B).

Os feixes vasculares são colaterais e em número de seis, dispostos formando um

anel, com cinco feixes voltados para a face abaxial e um feixe voltado para a face adaxial (Fig. 2A-B). No pecíolo de *S. longifolia* ocorrem de quatro a cinco feixes vasculares, dispostos em forma de arco (PERROTTA; ARAMBARRI, 2004). A região medular é parenquimática (Fig. 2A-B). Cristais prismáticos e drusas são encontrados na região cortical, principalmente na camada subepidérmica e no parênquima paliçádico (Fig. 2C). Azevedo, Quirino; Bruno (2015) observaram apenas drusas na região cortical e no xilema do pecíolo de *S. terebinthifolius*.

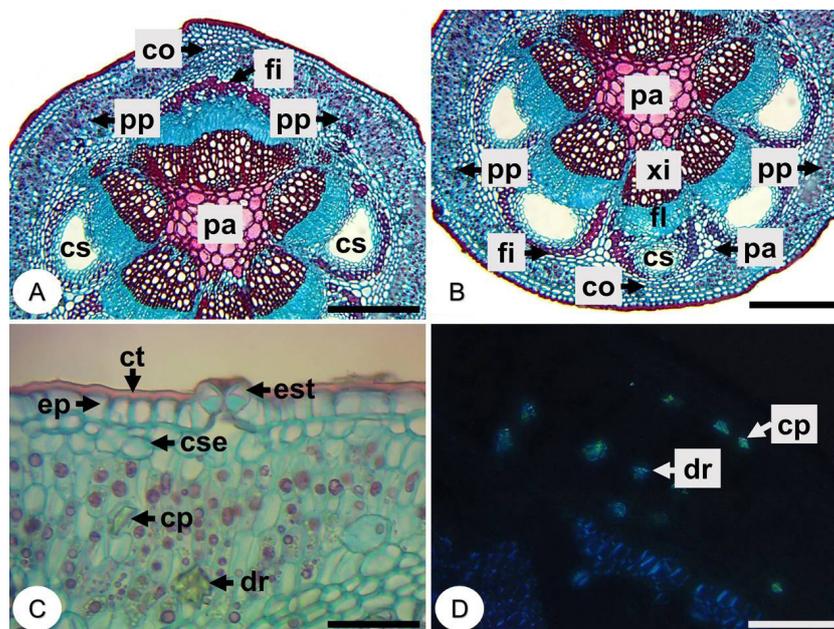


Figura 2 – Secções transversais do pecíolo de *Schinus molle* L.

A-B: Aspecto geral; C: Detalhe da região cortical; D: Cristais prismáticos e drusas. co: colênquima; cp: cristal prismático; cs: canal secretor; cse: camada subepidérmica; ct: cutícula; dr: drusa; ep: epiderme; est: estômato; fi: fibra; fl: floema; pa: parênquima; pp: parênquima paliçádico; xi: xilema. Barras: A-B: 200  $\mu$ m; C-D: 50  $\mu$ m.

O folíolo, em vista frontal, apresenta células epidérmicas com paredes levemente onduladas ou retas nas faces adaxial e abaxial (Fig. 3A-B). Em MEV, observa-se que a cutícula é lisa em ambas as faces (Fig. 3C-D).

O folíolo é anfiestomático, com estômatos anomocíticos e ciclocíticos (Fig. 3A-B). Machado et al. (2018) e Pires et al. (2015) também observaram esses mesmos tipos de estômatos para a espécie. Além de *S. molle*, *S. longifolia* também possui folíolo anfiestomático (PERROTTA; ARAMBARRI, 2004), porém, apresenta apenas estômatos anomocíticos. *Schinus terebinthifolius* e *S. weinmaniifolia* possuem folíolos hipoestomáticos. Duarte et al. (2009) e Almeida (2013) descreveram estômatos anomocíticos em *S. terebinthifolius*, enquanto Azevedo; Quirino; Bruno (2015) descreveram a presença de estômatos tetracíticos em *S. terebinthifolius*. *Schinus weinmaniifolia* possui estômatos anomocíticos (ARAMBARRI et al., 2008).

Tricomas tectores unicelulares são visualizados em ambas as faces da epiderme (Fig. 3E-F). Machado et al. (2018) encontraram tricomas tectores e glandulares em *S. molle*. *Schinus longifolia* e *S. terebinthifolius* apresentam tricomas tectores

e glandulares (PERROTTA; ARAMBARRI, 2004; DUARTE et al., 2009; AZEVEDO; QUIRINO; BRUNO, 2015).

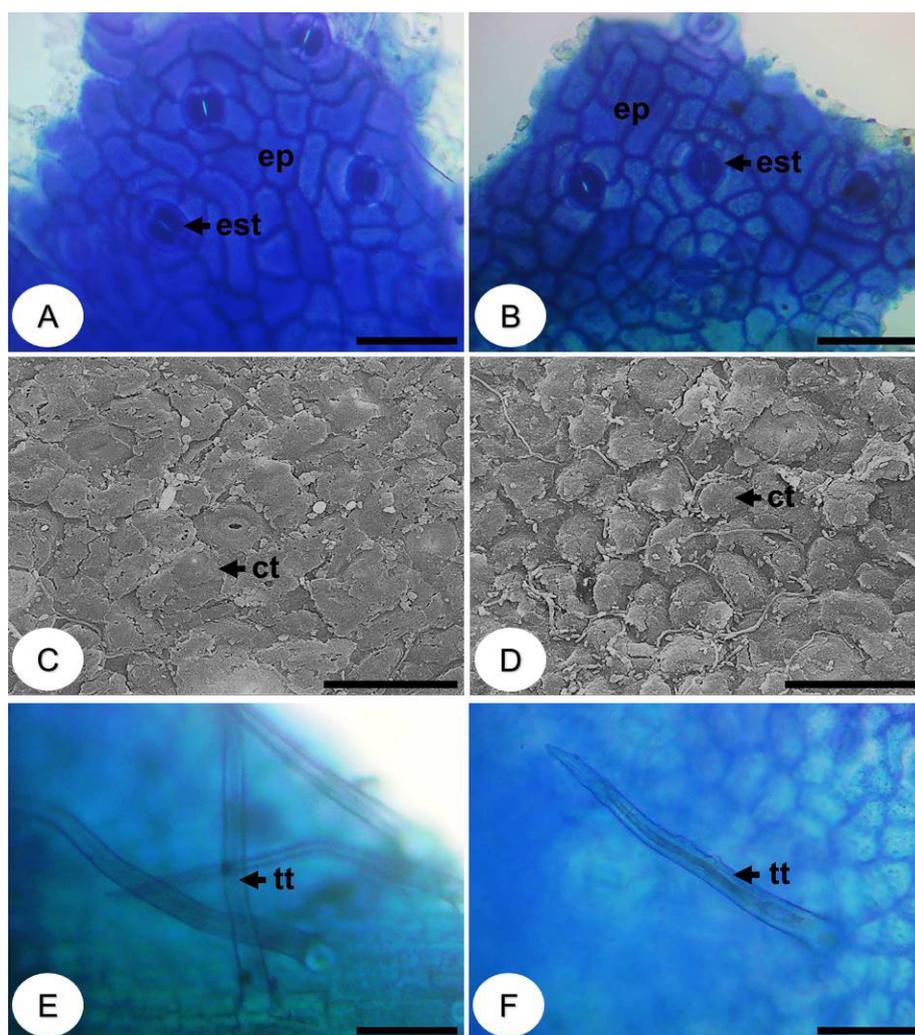


Figura 3 – Secções paradérmicas e microscopia eletrônica de varredura do folíolo de *Schinus molle* L.

A,C,E: Face adaxial; B,D,F: Face abaxial. ct: cutícula; ep: epiderme; est: estômato; tt: tricoma tector. Barras: A-F: 50  $\mu$ m.

Em seção transversal, o folíolo apresenta epiderme unisseriada, recoberta por cutícula espessa (Fig. 4A) e camada subepidérmica em ambas as faces (Fig. 4B). *Schinus terebinthifolius* possui uma camada subepidérmica apenas na face adaxial (DUARTE et al., 2009; ALMEIDA, 2013; AZEVEDO; QUIRINO; BRUNO, 2015) e *S. longifolia* não possui camada subepidérmica (PERROTTA; ARAMBARRI, 2004), tornando este um caráter importante para distinguir estas espécies.

A nervura central tem um contorno levemente biconvexo, com colênquima em ambos os lados e parênquima paliádico somente na face adaxial (Fig. 4A). O sistema vascular é composto por quatro feixes colaterais vasculares, dos quais dois são maiores e dois menores (Fig. 4A). O floema dos dois feixes maiores está associado aos canais secretores (Fig. 4A). Os feixes vasculares e os canais secretores estão envolvidos pelo parênquima (Fig. 4A).

O mesofilo é isobilateral, com cerca de três camadas de parênquima paliádico, voltadas para cada face da epiderme, e uma camada de parênquima esponjoso (Fig. 4B). *Schinus weinmaniifolia* também possui mesofilo isobilateral (ARAMBARRI et al., 2008). *Schinus longifolia* e *S. terebinthifolius* possuem mesofilo dorsiventral (PERROTTA; ARAMBARRI, 2004; DUARTE et al., 2009; ALMEIDA, 2013), sendo que *S. terebinthifolius* possui canais secretores no mesofilo.

Na borda do folíolo há um canal secretor e colênquima (Fig. 4B). Cristais prismáticos e drusas são encontrados na nervura central e no mesofilo (Fig. 4C-D). Cristais prismáticos e drusas também foram encontrados no folíolo de *S. terebinthifolius* (DUARTE et al., 2009), enquanto no folíolo de *S. longifolia* foram encontradas apenas drusas (PERROTTA; ARAMBARRI, 2004). Segundo Metcalfe; Chalk (1950), um ou mais tipos de cristais podem ocorrer na família.

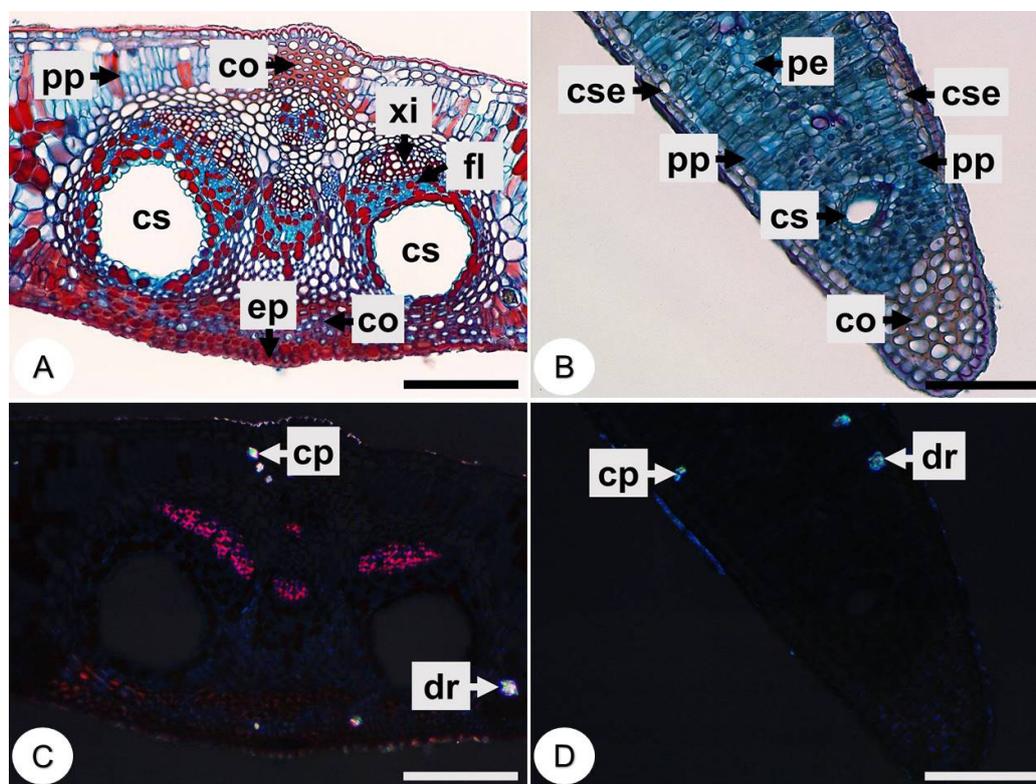


Figura 4 – Secções transversais do folíolo de *Schinus molle* L.

A,C: Nervura central; B,D: Mesofilo. co: colênquima; cp: cristal prismático; cs: canal secretor; cse: camada subepidérmica; ct: cutícula; dr: drusa; ep: epiderme; fl: floema; pa: parênquima; pe: parênquima esponjoso; pp: parênquima paliádico; xi: xilema. Barras: A-D: 100  $\mu$ m.

A Figura 5A mostra a secção transversal do folíolo sem adição de reagente. Compostos fenólicos foram encontrados nas células epidérmicas, na camada subepidérmica e no mesofilo (Fig. 5B). Em *S. terebinthifolius*, compostos fenólicos foram encontrados nos canais secretores (SILVA, 2011), o que não foi observado no presente estudo para *S. molle*.

Outros metabólitos secundários identificados no mesofilo de *S. molle* foram taninos (Fig. 5C), alcaloides (Fig. 5D), triterpenos e esteroides (Fig. 5E). Em *S. terebinthifolius*,

os taninos foram identificados no mesofilo e na nervura central (ALMEIDA, 2013). Os alcaloides não são muito comuns na família Anacardiaceae, com alguns relatos nos gêneros *Dracontomelum* e *Spondias* (CORREIA; DAVID; DAVID, 2006; SILVA et al., 2014). Os terpenos também são encontrados em outras partes de *S. molle*, como na casca e na fruta (YUEQIN et al., 2003; ONO et al., 2008; MALCA-GARCÍA et al., 2017).

Compostos lipofílicos foram evidenciados na cutícula, epiderme, camada subepidérmica, colênquima e no parênquima da nervura central (Fig. 5F), bem como nas células que circundam os canais secretores (Fig. 5G). Todas essas regiões coradas com Sudan III também foram coradas com reagente de Nadi (Fig. 5H-I), indicando a presença de óleos essenciais. A composição do óleo essencial de *S. molle* varia de acordo com o local de coleta, como demonstrado por Gomes et al. (2013), que analisou onze populações de *S. molle* e identificaram quatro grupos, sendo os principais compostos: sabineno,  $\alpha$ - e  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -cadinol e mirceno.

A lignina presente no xilema foi evidenciada com floroglucinol (Fig. 5J) e a dissolução dos cristais com o uso de ácido clorídrico (10%) mostrou que eles são de oxalato de cálcio (Fig. 5K-L). Machado et al. (2018) também identificaram que os cristais presentes no folíolo de *S. molle* são de oxalato de cálcio, mas através de espectroscopia de raios-X por energia dispersiva. O teste para amido foi negativo. Este teste também foi negativo no folíolo de *S. terebinthifolius* (ALMEIDA, 2013).

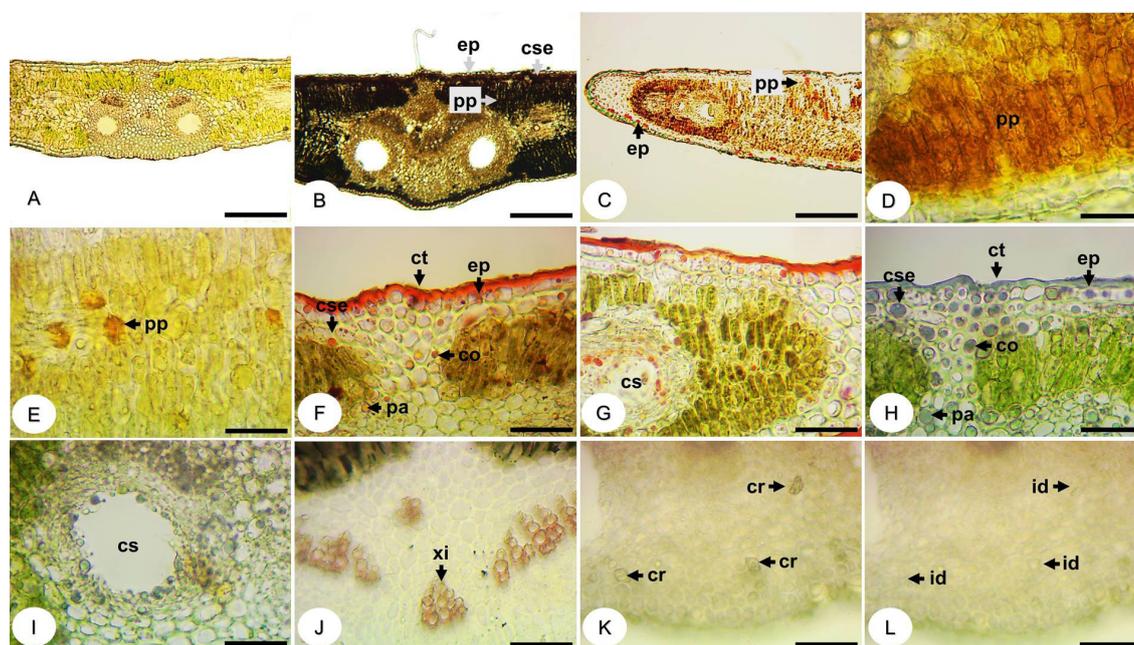


Figura 5 – Histoquímica do folíolo de *Schinus molle* L.

A: Controle; B: Cloreto férrico (10%); C: Vanilina clorídrica; D: Dragendorff; E: Liebermann-Burchard; F-G: Sudan III; H-I: Reagente de Nadi; J: Floroglucinol; K-L: Ácido clorídrico (10%). co: colênquima; cr: cristal; cs: canal secretor; cse: camada subepidérmica; ct: cutícula; ep: epiderme; id: idioblasto; pa: parênquima; pp: parênquima paliádico; xi: xilema. Barras: A-C: 200  $\mu$ m; D-L: 50  $\mu$ m.

## 4 | CONCLUSÃO

Este trabalho ampliou as informações sobre o gênero *Schinus* e mostrou os caracteres úteis na identificação de *S. molle* e em sua diferenciação de outras espécies deste gênero, como o tipo de tricoma presente no caule e no folíolo; a quantidade e localização dos canais secretores e feixes vasculares no caule, pecíolo e folíolo; o tipo de estômato e mesofilo do folíolo e o tipo e localização dos cristais nos órgãos estudados. Também foi possível observar a histolocalização dos metabólitos presentes no folíolo, destacando a presença de alcaloides.

## 5 | AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste pelas análises em Microscopia Eletrônica de Varredura.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C. C. B. R. **Estudo farmacognóstico e validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação de taninos nas cascas de *Schinus terebinthifolius* Raddi**. 2013. Recife. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Pernambuco. Recife.
- APG IV. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Bot. J. Linn Soc.**, v. 181, p. 1-20, 2016.
- ARAMBARRI, A. M., et al. Leaf anatomy of medicinal shrubs and trees from Misiones forest of the Paranaense Province (Argentina). Part 2. **Bol. Soc. Argent. Bot.**, v. 43, p. 31-60, 2008.
- AZEVEDO, C. F.; QUIRINO, Z. G. M.; BRUNO, R. L. A. Estudo farmacobotânico de partes aéreas vegetativas de aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae). **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 17, p. 26-35, 2015.
- BALDISSERA, M. D., et al. Trypanocidal activity of the essential oils in their conventional and nanoemulsion forms: In vitro tests. **Exp. Parasitol.**, v. 134, p. 356-361, 2013.
- BATISTA, A. C. S. O., et al. In vitro efficacy of essential oils and extracts of *Schinus molle* L. against *Ctenocephalides felis felis*. **Parasitology**, v. 143, p. 627-638, 2016.
- BUKATSCH, F. Bemerkungen zur doppelfärbung Astrablau-Safranin. **Mikrokosmos**, v. 61, p. 255, 1972.
- CAMILO, G. A. P. V.; BREGAGNOLI, M.; SOUZA, C. A. S. Levantamento da biodiversidade florística da arborização urbana em Guaxupé - Minas Gerais. **Rev. Agrogeoambiental**, v. 5, p. 61-74, 2013.
- CAVALCANTI, A. S., et al. Volatiles composition and extraction kinetics from *Schinus terebinthifolius* and *Schinus molle* leaves and fruit. **Braz. J. Pharmacogn.**, v. 25, p. 356-362, 2015.
- CHIRINO, E., et al. Morpho-functional traits and plant response to drought conditions in seedlings of six native species of Ecuadorian Ecosystems. **Flora**, v. 233, p. 58-67, 2017.
- CORREIA, S. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae.

Quim. Nova, v. 29, p. 1287-1300, 2006.

DAVID, R.; CARDE, J. P. Coloration différentielle des inclusions lipidiques et terpéniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du réactif nadi. **C R Acad Sci Paris, ser D**, v. 258, p. 1338-1340, 1964.

DOMINGUEZ, X. A.; CARMONA, J. F.; VENEGAS, R. B. Lignoceric acid and other compounds of *Schinus molle*. **Phytochemistry**, v. 10, p. 1678, 1971.

DUARTE, M. R., et al. Anatomia foliar comparada de espécies de aroeira: *Myracrodruon urundeuva* Allemão e *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Visão Acadêmica**, v. 10, p. 18-28, 2009.

FENNER, R., et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 42, p. 369-394, 2006.

GOMES, V., et al. Variation in the essential oils composition in Brazilian populations of *Schinus molle* L. (Anacardiaceae). **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 48, p. 222-227, 2013.

HADDAD, A., et al. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1998. 179 p.

IBRAHIM, M. T.; HAGGAG, E. G. Phenolics from *Schinus molle* stems and their anti-bacterial and anti-microbial activity. **Life Sci. J.**, v. 10, p. 1931-1937, 2013.

JENSEN, W. A. **Botanical histochemistry: principles and practice**. San Francisco: W. H. Freeman & Co, 1962. 408 p.

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

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, 1997. 163 p.

KRAUTER, D. Erfahrungen mit Etzolds FSA-Färbung für pflanzenschnitte. **Mikrokosmos**, v. 74, p. 231-233, 1985.

LEITÃO, F., et al. Medicinal plants traded in the open-air markets in the State of Rio de Janeiro, Brazil: an overview on their botanical diversity and toxicological potential. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 24, p. 225-247, 2014.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 484 p.

MACE, M. E.; BELL, A. A.; STIPANOVIC, R. D. Histochemistry and isolation of gossypol and related terpenoids in root of cotton seedlings. **Phytopathol.**, v. 64, p. 1297-1302, 1974.

MACE, M. Z.; HOWELL, C. R. Histochemistry and identification of condensed tannin precursors in roots of cotton seedlings. **Can. J. Bot.**, v. 52, p. 2423-2426, 1974.

MACHADO, C. D., et al. *Schinus molle*: anatomy of leaves and stems, chemical composition and insecticidal activities of volatile oil against bed bug (*Cimex lectularius*). **Rev. Bras. Farmacogn.**, 2018.

MARTINS, M. R., et al. Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. **J. Ethnopharmacol.**, v. 151, p. 485-492, 2014.

MALCA-GARCÍA, G. R., et al. Constituents from the bark resin of *Schinus molle*. **Braz. J. Pharmacogn.**, v. 27, p. 67-69, 2017.

- METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses.** Oxford: Clarendon Press, 1950.
- OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia.** São Paulo: Editora Atheneu, 2005. 420 p.
- ONO, M., et al. Sesquiterpenoids, triterpenoids, and flavonoids from the fruits of *Schinus molle*. **Food Sci. Technol. Res.**, v. 14, p. 499-508, 2008.
- PERROTTA, V. G.; ARAMBARRI, A. M. *Schinus longifolia* var. *longifolia* (Anacardiaceae): anatomía foliar y caulinar. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 23, p. 142-147, 2004.
- PIRES, M. F., et al. Micromorfometria foliar de *Schinus molle* L. (Anacardiaceae) em diferentes alturas na copa. **Cerne**, v. 21, p. 17-25, 2015.
- POZZO-BALBI, T., et al. The triterpenoid acids of *Schinus molle*. **Phytochemistry**, v. 17, p. 2107-2110, 1978.
- RAMÍREZ-ALBORES, J. E.; BUSTAMANTE, R. O.; BADANO, E. I. Improved predictions of the geographic distribution of invasive plants using climatic niche models. **PLoS ONE**, v. 11, p. e0156029, 2016.
- SASS, J. E. **Botanical microtechnique.** 2nd. ed. Ames: Iowa State College Press, 1951. 228 p.
- SILVA, A. M. L. **Perfil morfo-anatômico e histoquímico (fenólico e lipofílico) das fases do desenvolvimento foliar de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae).** 2011. Araraquara. 57 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Estadual Paulista. Araraquara.
- SILVA, G. A., et al. Gênero *Spondias*: aspectos botânicos, composição química e potencial farmacológico. **J. Bio. Pharm. Agric. Manage.**, v. 10, p. 27-41, 2014.
- SILVA-LUZ, C. L.; PIRANI, J. R. **Anacardiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB44>.
- SIMIONATTO, E., et al. Chemical composition and biological activities of leaves essential oil from *Schinus molle* (Anacardiaceae). **J. Essent. Oil Bear Pl.**, v. 14, p. 590-599, 2013.
- STEVENS, P. F. **Angiosperm Phylogeny Website.** Version 12. 2001. Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.
- TEIXEIRA, A. H., et al. Conhecimento popular sobre o uso de plantas medicinais no município de Sobral-Ceará, Brasil. **Sanare, Sobral**, v. 13, p. 23-28, 2014.
- YODER, L. R.; MAHLBERG, P. G. Reactions of alkaloid and histochemical indicators in laticifers and specialized parenchyma cells of *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). **Am. J. Bot.**, v. 63, p. 1167-1173, 1976.
- YUEQIN, Z., et al. Isolation of two triterpenoids and a biflavanone with antiinflammatory activity from *Schinus molle* fruits. **Planta Med.**, v. 69, p. 893-898, 2003.
- ZONA, S. The correct gender of *Schinus* (Anacardiaceae). **Phytotaxa**, v. 222, p. 75-77, 2015.

## CARACTERIZAÇÃO FARMACOGNÓSTICA E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE-DAD PARA *FINGERPRINT* DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM *ALTERNANTHERA BRASILIANA*

### **José Marcos Teixeira de Alencar Filho**

Universidade Federal Rural de Pernambuco  
(UFRPE), Faculdade Irecê (FAI)  
Recife – PE, Irecê – BA

### **Hyany Andreysa Pereira Teixeira**

Universidade Federal do Vale do São Francisco  
(UNIVASF)  
Petrolina – PE

### **Iure Silva de Carvalho**

Universidade Federal do Vale do São Francisco  
(UNIVASF)  
Petrolina – PE

### **Pedrita Alves Sampaio**

Universidade Federal Rural de Pernambuco  
(UFRPE)  
Recife – PE

### **Emanuella Chiara Valença Pereira**

Universidade Federal Rural de Pernambuco  
(UFRPE)  
Recife – PE

### **Isabela Araujo e Amariz**

Universidade Federal Rural de Pernambuco  
(UFRPE)  
Recife – PE

### **Larissa Araújo Rolim**

Universidade Federal do Vale do São Francisco  
(UNIVASF)  
Petrolina – PE

### **Edigênia Cavalcante da Cruz Araújo**

Universidade Federal do Vale do São Francisco  
(UNIVASF)

Petrolina – PE

**RESUMO:** *Alternanthera brasiliana* pertence à família Amaranthaceae e é popularmente conhecida no Brasil como “Penicilina”. Os objetivos deste trabalho foram a caracterização farmacognóstica físico-química da droga vegetal a base da espécie *A. brasiliana* e o desenvolvimento de uma metodologia analítica por CLAE-DAD para *fingerprint* dos compostos fenólicos do extrato etanólico bruto. Os testes para caracterização foram realizados conforme preconizado pela Farmacopeia Brasileira 5ª Edição. O método analítico foi desenvolvido utilizando a ferramenta de planejamento fatorial 3<sup>3</sup>. Para a caracterização, os parâmetros estavam dentro do preconizado. Em relação ao método analítico, a fase móvel utilizada em gradiente era composta por água ultrapurificada acidificada com ácido trifluoroacético 0,01% e acetonitrila (TFA:ACN) de 90:10 de 0 a 30 min; TFA:ACN 60:40 isocrático de 30 a 40 min; TFA:ACN 90:10 de 40 a 50 min. Tempo de corrida total de 60 min. Volume de injeção de 20  $\mu$ L e fluxo de 0,8 mL/min. A partir dos resultados, obtiveram-se parâmetros físico-químico para padronização da droga vegetal, assim como um método analítico para realização de *fingerprint* do extrato etanólico.

**PALAVRAS-CHAVE:** caracterização

farmacognóstica, desenho experimental, desenvolvimento de metodologia analítica, CLAE-DAD.

## PHARMACOGNOSTIC CHARACTERIZATION AND DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHOD BY HPLC-DAD FOR PHENOLIC COMPOUNDS FINGERPRINT IN *ALTERNANTHERA BRASILIANA*

**ABSTRACT:** *Alternanthera brasiliana* belongs to Amaranthaceae family and is popularly known in Brazil as “Penicillin”. The objectives of this work were the physico-chemical pharmacognostic characterization of the plant drug based on the *A. brasiliana* species and the development of an analytical methodology by HPLC-DAD for fingerprint of the phenolic compounds of the crude ethanolic extract. The tests for characterization were performed as recommended by the Brazilian Pharmacopoeia 5th Edition. The analytical method was developed using the factorial planning tool 3<sup>3</sup>. For the characterization, the parameters were within the recommended one. Regarding the analytical method, the graded mobile phase was composed of ultra-purified water acidified with 0.01% trifluoroacetic acid and acetonitrile (TFA:ACN) of 90:10 from 0 to 30 min; TFA:ACN 60:40 isocratic from 30 to 40 min; TFA:ACN 90:10 from 40 to 50 min. Total run time of 60 min. injection volume of 20 µL and flow of 0.8 ml/min. From the results, physical-chemical parameters were obtained for the standardization of the vegetal drug, as well as an analytical method for the fingerprint of the ethanolic extract.

**KEYWORDS:** pharmacognostic characterization, experimental design, development of analytical methodology, HPLC-DAD.

### 1 | INTRODUÇÃO

*Alternanthera brasiliana* (L.) KUNTZE pertence à família Amaranthaceae sendo popularmente conhecida no Brasil como “Penicilina”, “Benzetacil” ou “Terramicina”. É um arbusto que chega até 1,5 m de altura, e é usada na medicina popular como anti-inflamatória, cicatrizante e antidiarreica (BARUA et al., 2013). É também utilizada como planta ornamental devido a coloração arroxeada característica das suas folhas quando é cultivada a sombra (ALENCAR FILHO et al., 2019).

Estudos publicados na literatura especializada demonstram importantes atividades biológicas para a espécie em questão. A atividade cicatrizante de feridas do extrato metanólico das folhas de *A. brasiliana* foi reportada em diversos modelos experimentais. Os autores comprovaram a alteração do perfil enzimático antioxidante durante a cicatrização de feridas cutâneas em ratos imunocomprometidos, usando extrato metanólico de *A. brasiliana*. A contração da ferida atingiu 77,10% no oitavo dia de experimento, sendo maior que o grupo controle (39,25%) e que o fármaco padrão utilizado (60,00%) (BARUA et al., 2012; BARUA et al., 2013).

A atividade antibacteriana foi reportada para as frações clorofórmica, acetato de

etila e metanólica obtidas de suas partes aéreas, com halos significativos de inibição (12,5 mm) para a cepa *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), na concentração de 125 µg de extrato impregnado em disco de difusão. No mesmo estudo, os autores encontraram valores de concentração inibitória mínima (CIM) para as frações clorofórmica e acetato de etila (1,56 mg/mL), e para a fração metanólica (0,78 mg/mL) sobre a mesma cepa já citada. A fração acetato de etila mostrou-se sendo a única dentre as testadas com atividade contra *Candida albicans* (ATCC 1023), com CIM de 1,56 mg/mL. Para a cepa *Enterococcus faecalis* (ATCC 29219), as fases clorofórmicas e acetato de etila apresentaram CIM de 1,56 mg/mL (SILVA et al., 2011).

Silva e colaboradores (2014) determinaram a atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH da fase acetato de etila obtida por partição líquido-líquido do extrato etanólico das partes aéreas de *A. brasiliana*, com  $CE_{50}$  de  $28,9 \pm 1,08$  µg/mL. A atividade fotoprotetora também foi reportada para a fase acetato de etila, apresentando absorção nas regiões UVA, UVB e UVC. O fator de proteção solar UVB calculado experimentalmente *in vitro* foi de  $11,320 \pm 3,467$ , na concentração de 100 mg/mL (SILVA et al., 2014).

Em relação a fitoquímica, vários constituintes já foram isolados a partir de extratos de *A. brasiliana*. Algumas classes de metabólitos secundários já foram identificadas, tais como flavonoides, sendo sua maioria flavonas glicosiladas (BROCHADO et al., 2003), betalainas e betacianinas, as quais são pigmentos que dão a coloração característica das folhas de várias espécies do gênero *Alternanthera*, vários hidrocarbonetos e derivados de hidrocarbonetos, bem como oxilipinas (SILVA et al., 2005; DELADINO et al., 2017; TRAPP et al., 2015).

As plantas representam uma extraordinária fonte de novos compostos com atividade terapêutica, o que torna justificável o crescente interesse no estudo de plantas medicinais. Extratos obtidos a partir de espécies vegetais são misturas complexas de variadas classes de metabólitos secundários, como alcaloides, flavonoides, cumarinas, terpenos, ácidos graxos, entre outras. Uma das etapas mais importantes no desenvolvimento de produtos baseados em matérias-primas vegetais é a caracterização química destes extratos. Uma vez obtidos os dados químicos sobre o extrato, são selecionadas as substâncias ou classe de substâncias que podem ser utilizadas como marcadores químicos ativos ou analíticos. A escolha destes marcadores químicos é fundamental no desenvolvimento de um medicamento fitoterápico, por exemplo (LYCHNOFLORA, 2017).

Para registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil, a ANVISA exige a realização de outros testes (físico-químicos e microbiológicos) que visam garantir a pureza e a integridade da droga vegetal, acrescidos da avaliação de solventes e excipientes utilizados na extração do derivado vegetal, relação aproximada da droga:derivado vegetal, além da pureza e integridade do extrato (BRASIL, 2010). Estes testes são importantes para padronização da droga vegetal, o que favorece a produção de fitomedicamentos com qualidade.

Dito isso, associado ao fato de ser de extrema importância a padronização de matérias-primas vegetais para assegurar o controle de qualidade, decidiu-se realizar caracterização farmacognóstica físico-química da droga vegetal obtida a partir da espécie *A. brasiliiana*, bem como o desenvolvimento de uma metodologia analítica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um Detector de Arranjo de Diodo (CLAE-DAD) para realização de *fingerprint* dos compostos fenólicos do extrato etanólico bruto das suas partes aéreas.

## 2 | METODOLOGIA

### 2.1 Caracterização farmacognóstica físico-química da droga vegetal

Foram realizados os ensaios de determinação da granulometria dos pós, perda por dessecação (método gravimétrico), cinzas totais, cinzas insolúveis em ácido, cinzas sulfatadas, índice de espuma e substâncias extraíveis por álcool (método c: extração a frio). Os testes foram realizados conforme preconizado pela Farmacopeia Brasileira 5ª Edição (BRASIL, 2010), em triplicata. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

### 2.2 Desenvolvimento do método analítico por CLAE-DAD para *fingerprint* de compostos fenólicos

O método analítico utilizado com base para desenvolvimento do novo método foi selecionado devido a sua capacidade de separar e identificar flavonoides glicosilados, que são os marcadores químico de *A. brasiliiana*, no entanto em outra espécie vegetal, a *Morus nigra* L. (SAMPAIO, 2017). A tabela 1 descreve o gradiente utilizado como ponto de partida para o desenvolvimento do novo método, mostrando os níveis intermediários.

	Tempo (min)	Solução A (%)	Solução B (%)
<b>Gradiente linear</b>	0 – 30	90 – 50	10 – 50
<b>Isocrático</b>	30 – 40	50	50
<b>Gradiente linear</b>	40 – 50	50 – 90	50 – 10
<b>Isocrático</b>	50 – 60	90	10

Tabela 1 – Sistema de fase móvel utilizado nas análises por CLAE-DAD.

O desenvolvimento do método analítico foi realizado por meio da utilização de um planejamento fatorial (PF) 3<sup>3</sup>, utilizando como variáveis independentes as condições de gradiente inicial, gradiente intermediário, e fluxo da fase móvel, em três níveis, resultando em 27 corridas cromatográficas. Estes níveis são identificados como nível baixo (-1), médio (0) e alto (+1). A tabela 2 mostra os níveis do desenho experimental

para desenvolvimento do método analítico. A tabela 3 mostra a matriz de planejamento fatorial 3<sup>3</sup>.

Variáveis independentes	Níveis		
	-1	0	+1
Ácido trifluoroacético (TFA) 0,01% Inicial	85%	90%	95%
Ácido trifluoroacético (TFA) 0,01% Intermediário	40%	50%	60%
Fluxo da fase móvel	0,6 mL/min	0,8 mL/min	1,0 mL/min

Tabela 2 – Níveis do desenho experimental para o estudo.

	TFA 0,01% Inicial	TFA 0,01% intermediário	Fluxo
PF 1	+1	+1	-1
PF 2	+1	0	-1
PF 3	+1	-1	-1
PF 4	+1	+1	0
PF 5	+1	0	0
PF 6	+1	-1	0
PF 7	+1	+1	+1
PF 8	+1	0	+1
PF 9	+1	-1	+1
PF 10	0	+1	-1
PF 11	0	0	-1
PF 12	0	-1	-1
PF 13	0	+1	0
PF 14	0	0	0
PF 15	0	-1	0
PF 16	0	+1	+1
PF 17	0	0	+1
PF 18	0	-1	+1
PF 19	-1	+1	-1
PF 20	-1	0	-1
PF 21	-1	-1	-1
PF 22	-1	+1	0
PF 23	-1	0	0
PF 24	-1	-1	0
PF 25	-1	+1	+1
PF 26	-1	0	+1
PF 27	-1	-1	+1

Tabela 3 – Matriz de planejamento fatorial 3<sup>3</sup>.

As condições de análise foram as que seguem: como fase estacionária foi utilizada uma coluna octadecilsilano (C18) com dimensões de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula de 5 µm (Thermo Scientific® Hypersil); como fase móvel foi usada uma mistura de solventes, onde a solução A era composta por água + 0,01% (v/v) de ácido

trifluoracético (TFA) e a solução B era acetonitrila (ACN), e volume de injeção de 20 µL. A temperatura da coluna foi mantida constante em 30° C durante todas as análises e o tempo total de corrida foi de 60 min.

As análises foram realizadas utilizando um cromatógrafo líquido Shimadzu® (LC-20 AT) equipado com um amostrador automático (SIL-20 A) e um detector de arranjo de diodos – DAD (SPD-M20A) controlado por software LC-Solution® 1.0. As soluções do extrato foram preparadas na concentração de 1 mg/mL. Todas as soluções foram degaseificadas e filtradas através de membrana filtrante de 0,22 µm (Chromafil Xtra), antes de serem analisadas no cromatógrafo. A detecção foi realizada em DAD no comprimento de onda de 340 nm. Para o cálculo do fator hierárquico de resposta cromatográfica (HCRF), adaptado de Alves (2016), foi levado em consideração o número de picos no cromatograma e a resolução do pico majoritário, analisados em triplicata, a partir da Equação 1:

$$\text{HCRF} = (10 \cdot a) + (100 \cdot b) \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: a = número de picos no cromatograma; b = resolução do pico majoritário.

## 2.3 Análise dos dados

As amostras foram analisadas em triplicata e as análises estatísticas foram realizadas de acordo com o padrão dos dados obtidos, utilizando-se teste “t” de *Student* não pareado para análise das diferenças dos valores dos dados das amostras, considerando-se diferença significativa quando o valor calculado de “p” foi menor que 0,05. Todos os dados obtidos foram expressos em média ± desvio padrão da média. Os gráficos foram construídos utilizando o programa Origin 8.0, e as análises estatísticas foram realizados no programa Statistica 7.0.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Caracterização farmacognóstica físico-química da droga vegetal

No experimento da determinação do tamanho de partícula, após o processo de pesagem foi calculada a quantidade média de pó de *A. brasiliiana* retida em cada tamis. O maior percentual de massa retida foi entre o tamis de malha 425 µm e o de malha 250 µm, constatando que o tamanho médio das partículas se encontrava nesse intervalo (Figura 1). Foi calculada a percentagem da fração de passagem e da fração retida do pó em cada um dos tamises e a partir dos resultados obtidos foi possível observar, por meio do gráfico construído, que o tamanho médio das partículas do pó de *A. brasiliiana* é de 373,51 µm (Figura 2). Dessa forma, o pó foi classificado como moderadamente grosso segundo a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010).

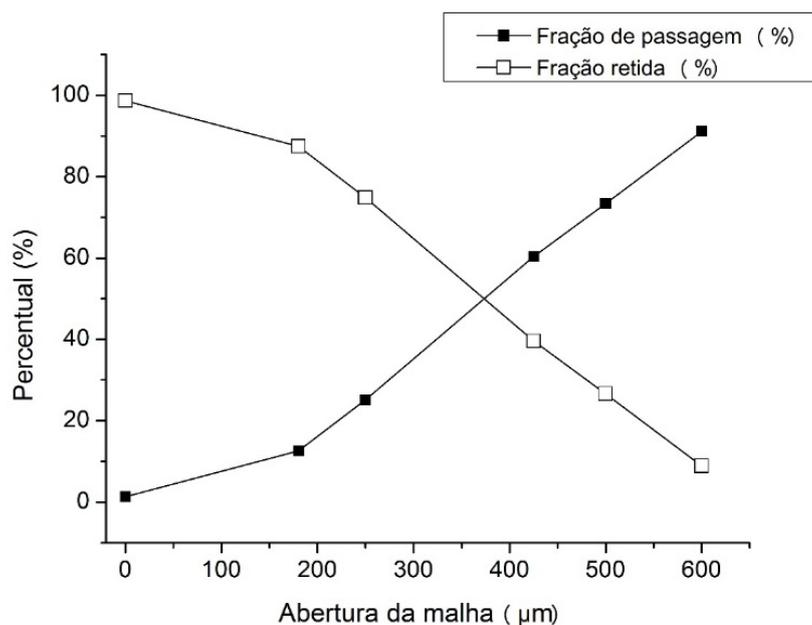


Figura 1 – Distribuição granulométrica do pó das folhas de *A. brasiliana*

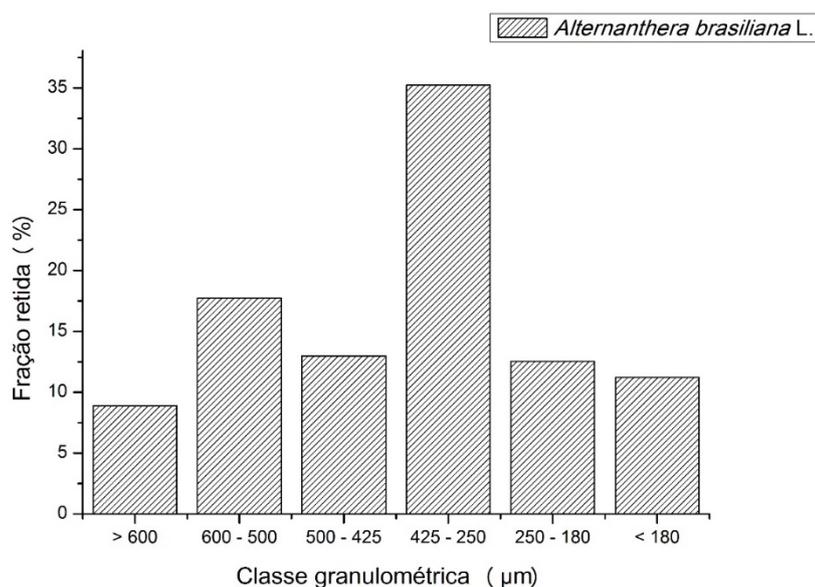


Figura 2 – Gráfico do tamanho médio de partículas do pó obtido de *A. brasiliana*.

O teor de umidade de uma droga vegetal é um importante dado, pois sugere muito acerca de sua qualidade. O pó da droga vegetal apresentou um teor de  $3,41 \pm 0,16\%$  de água, sendo esse valor inferior ao máximo encontrado para outras drogas descritas na Farmacopeia Brasileira (2010). Esse teste é fundamental para manter a conservação da amostra, visto que o alto teor de umidade é o principal fator para a reação de hidrólise e a proliferação de micro-organismos, podendo também degradar seus constituintes químicos, prejudicando a qualidade da droga. A baixa umidade indica que o processo de secagem em estufa com ar circulante foi eficiente. Na Farmacopeia, não existe um valor máximo preconizado para o teor de umidade desta espécie, mas

de acordo com a mesma, o teor ideal para perda por dessecação de uma amostra vegetal varia de 8 a 14% (BRASIL, 2010).

Cinzas totais é um parâmetro que visa verificar o teor de impurezas inorgânicas não voláteis que podem estar presentes como contaminantes. Consiste na incineração total da matéria orgânica da amostra, deixando apenas os resíduos minerais. É um pré-requisito importante para o controle de qualidade da droga vegetal, pois indica a existência de adulteração na amostra. Os valores obtidos a partir da determinação de cinzas totais foram de  $9,93 \pm 0,44\%$ . Não existe um valor de referência para a espécie. A determinação de cinzas insolúveis em ácido refere-se à quantificação de sílica e constituintes silicosos na droga vegetal. Os resultados obtidos para este parâmetro foi de  $10,02 \pm 0,22\%$ . Altos teores de cinzas insolúveis podem indicar contaminação de areia e/ou terra, indicando um mau tratamento na colheita, higienização e processamento do material (COUTO et al., 2009). Em relação aos resultados de cinzas sulfatadas o valor obtido experimentalmente para esse teste foi de  $12,77 \pm 0,01\%$ . Nos vegetais, as inclusões minerais cristalinas contribuem para o aumento das cinzas, influenciando principalmente os valores de cinzas sulfatadas (MOHAMAD et al., 2013).

O resultado obtido para o parâmetro substâncias extraíveis por álcool foi de  $4,75 \pm 0,07\%$ , apresentando um baixo teor de substâncias extraíveis por etanol. A granulometria do pó tem influência direta no resultado de substâncias extraíveis por álcool, uma vez, que quanto menor as partículas da droga vegetal, maior a superfície de contato do pó com o solvente, logo mais eficiente se torna o processo de extração (BRASIL, 2010).

A determinação do índice de espuma tem o objetivo de estimar a presença de saponinas na droga vegetal, os quais formam espuma persistente quando agitados com água. O índice de espuma foi avaliado, visando verificar a maior diluição em água que possibilita a formação de espumas com 1 cm de altura. Esperado os 15 minutos de teste, observou-se que não houve presença de espuma em nenhum dos tubos analisados, sendo, portanto, o índice de espuma menor que 100 e o resultado negativo para a presença de saponinas na amostra vegetal.

### **3.2 Desenvolvimento do método analítico por CLAE-DAD *fingerprint* de compostos fenólicos**

A partir da análise dos valores de HCRF, pôde-se obter o Gráfico de Pareto (Figura 3) e o gráfico de superfície-resposta (Figura 4). O Gráfico de Pareto mostra que as condições que influenciaram de forma significativa e positiva no desenvolvimento do método foram: o fluxo (Q) e o gradiente de ácido trifluoroacético (TFA) intermediário (L).

O gráfico de superfície-resposta mostra nas áreas mais escuras os pontos em que as condições obtiveram melhores valores de HCRF. Os níveis das variáveis independentes selecionadas foram: nível médio para o TFA 0,01% inicial e para o

fluxo da fase móvel, e nível alto para TFA 0,01% intermediário. Como resultado do cálculo do HCRF para o método selecionado, obteve-se o valor de 426,2. O método que obteve o menor valor de HCRF foi a condição número 21, com HCRF de 298,1.

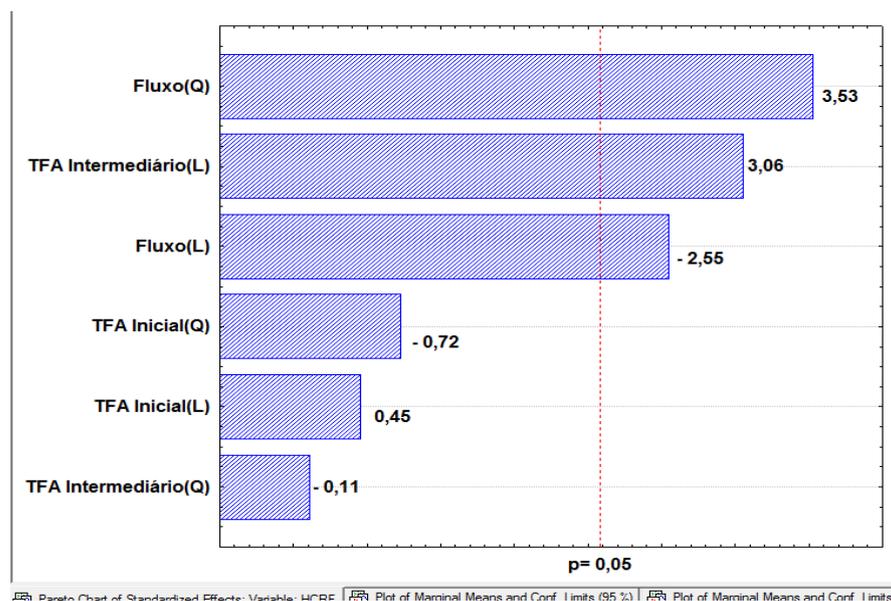


Figura 3 – Gráfico de Pareto do método analítico.

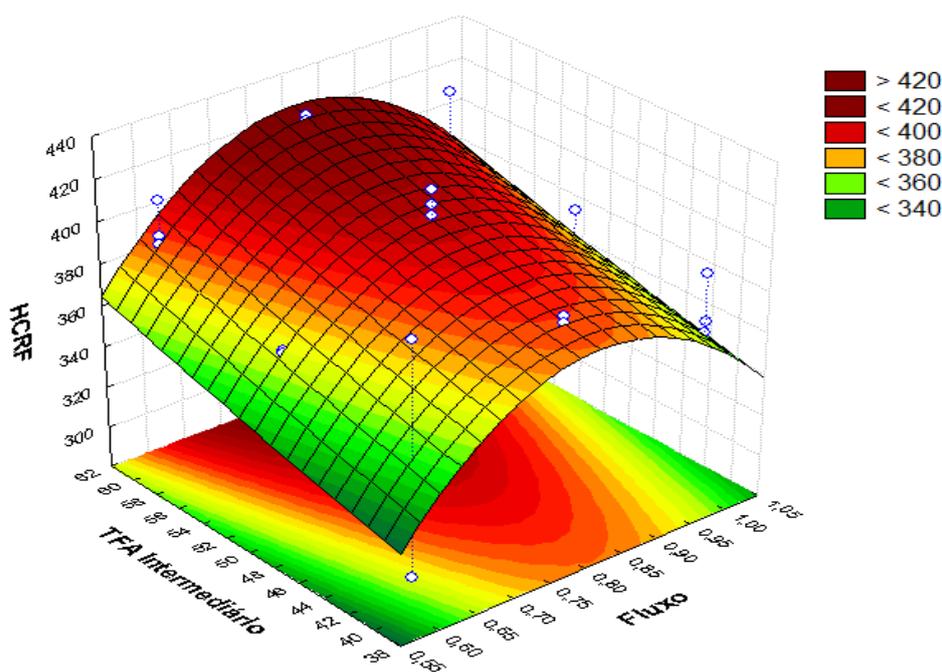


Figura 4 – Curvas de nível da superfície resposta do método analítico.

A partir da análise das variáveis do planejamento fatorial e do cálculo do HCRF, pôde-se verificar que as melhores condições cromatográficas foram as seguintes: a fase móvel utilizada em gradiente era composta por água ultrapurificada acidificada com ácido trifluoroacético 0,01% e acetonitrila (TFA:ACN) de 90:10 à 60:40 de 0 a 30 min; TFA:ACN 60:40 isocrático de 30 a 40 min, TFA:ACN de 60:40 à 90:10 de 40 a 50 min, permanecendo isocrático 90:10 por mais 10 min. O tempo total de corrida foi de 60 min, como pode ser observado na Tabela 4. O volume de injeção foi de 20  $\mu$ L e o

fluxo de 0,8 mL/min.

Condição da fase móvel	Tempo (min)	TFA 0,01% (%)	Acetonitrila (%)
<b>Gradiente linear</b>	0 – 30	90 – 60	10 – 40
Isocrático	30 – 40	60	40
Gradiente linear	40 – 50	60 – 90	40 – 10
Isocrático	50 – 60	90	10

Tabela 4 – Sistema gradiente de fase móvel selecionado para a análise por CLAE.

O perfil cromatográfico de *A. brasiliiana* pode ser observado na figura 5. No cromatograma foram observados 32 picos. A resolução do pico majoritário foi de 1,196 e sua pureza esteve acima de 0,99, o que demonstra que não houve co-eluição com nenhum outro composto do extrato. O comprimento de onda escolhido para análises dos cromatogramas foi de 340 nm, pois é um comprimento de onda específico para visualizar absorção de flavonoides, que são os marcadores químicos da espécie em estudo.

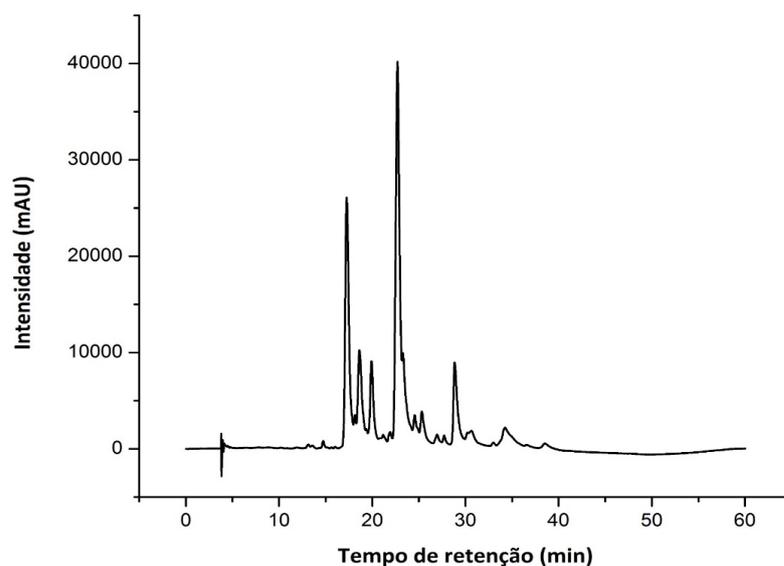


Figura 5 – Perfil cromatográfico de *Alternanthera brasiliiana*.

#### 4 | CONCLUSÕES

Para assegurar a qualidade das preparações a base de plantas medicinais é necessário que a sua matéria-prima tenha composição química determinada e estável, para tanto algumas análises devem ser realizadas no controle de qualidade da droga vegetal. Portanto, o controle de qualidade é uma fase importante, onde pode ser avaliada a composição química das plantas medicinais, a melhor forma de extração e

os parâmetros físico-químicos.

Até então não existia nenhum parâmetro físico-químico para controle de qualidade da droga vegetal obtida a partir de *A. brasiliiana*, de forma que os resultados obtidos fornecem informações importantes para a qualidade da droga. No que tange o método cromatográfico, seu desenvolvimento foi pertinente pois poderá ser utilizado para determinação quali-quantitativa dos seus marcadores químicos.

A padronização química e a realização do controle de qualidade da matéria-prima diminuem significativamente problemas relacionados a presença de materiais estranhos, troca de espécies e contaminação por microrganismos. Dessa forma, pode-se garantir que as substâncias responsáveis pelo efeito terapêutico estejam presentes em quantidade adequada para garantir a eficácia e a segurança do fitoterápico.

A pesquisa com plantas medicinais cresce a cada ano e nesse cenário considera-se de fundamental importância os estudos de padronização de matéria-prima vegetal. Desse modo, levando em consideração o panorama atual das exigências legais, faz-se necessário que haja um controle de qualidade sobre a droga vegetal em estudo.

## REFERÊNCIAS

ALENCAR FILHO, J. M. T. et al. Phytochemical analysis in *Alternanthera brasiliiana* by LC-MS/MS and GC-MS. **Natural Product Research**, in press, 2019.

ALVES, J. M. P. **Desenvolvimento de métodos analíticos e impressões digitais cromatográficas para controle de qualidade de drogas vegetais de espécies da família Bromeliaceae**. 87f. Dissertação de Mestrado, mestrado em Recursos Naturais do Semiárido, Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Petrolina-PE, 2016.

BARUA, C. C. et al. Influence of *Alternanthera brasiliiana* (L.) Kuntze on altered enzyme profile during cutaneous wound healing in immunocompromised rats. **International Scholarly Research Network – ISRN Pharmacology**, v. 2012, p. 1-8, 2012.

BARUA, C. C. et al. Wound healing activity of *Alternanthera brasiliiana* Kuntze and its antioxidant profiles in experimentally induced diabetic rats. **JAPHAC**, v. 3, nº 10, p. 161-166, 2013.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira. 5ª ed., v. 1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010.

BROCHADO, C. O. et al. Flavonol Robinobiosides and Rutinosides from *Alternanthera brasiliiana* (Amaranthaceae) and their effects on lymphocyte proliferation *in vitro*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.14, n. 3, 449-451, 2003.

COUTO, R. O. et al. Caracterização físico-química do pó das folhas de *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae). **Revista Eletrônica Farmácia**, v. 6, n. 3, p. 59-69, 2009.

DELADINO, L. et al. Betalains and phenolic compounds of leaves and stems of *Alternanthera brasiliiana* and *Alternanthera tenella*. **Food Research International**, v. 97, p. 240–249, 2017.

LYCHNOFLORA – Pesquisa e desenvolvimento em Produtos Naturais LTDA. <<http://www.lychnoflora.com.br/lychnoflora/en/blog/importancia-de-tecnicas-hifenadas-para-caracterizacao-dos-extratos-de-interesse-industria>>, acesso em 21 de março de 2019.

MOHAMAD, T.A.S.T. et al. Chemical and pharmacognostical characterization of two Malaysian plants both known as Ajisamat. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, p.724 -730, 2013.

SAMPAIO, P. A. **Utilização de planejamento fatorial como estratégia para o desenvolvimento tecnológico de extratos padronizados de *Morus nigra* L.** 117f. Dissertação de Mestrado, mestrado em Recursos Naturais do Semiárido, Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Petrolina-PE, 2017.

SILVA, E. E. S. et al. Identification of glycosil flavones and determination *in vitro* of antioxidant and photoprotective activities of *Alternanthera brasiliana* L. Kuntze. **Research Journal of Phytochemistry**, vol. 8, p. 148-154, 2014.

SILVA, E. E. S. et al. Identification of Glycosil Flavones and Determination in vitro of Antioxidant and Photoprotective Activities of *Alternanthera brasiliana* L. Kuntze. **Research Journal of Phytochemistry**, v. 8, n. 4, p. 148-154, 2014

SILVA, L. C. et al. Antimicrobial Activity of *Alternanthera brasiliana* Kuntze (Amaranthaceae): a Biomonitored Study. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, n. 1, p. 147-53, 2011.

SILVA, N. C. B. et al. Developmental effects of additional ultraviolet A radiation, growth regulators and tyrosine in *Alternanthera brasiliana* (L.) KUNTZE cultured in vitro. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 779-786. 2005.

TRAPP, M. A. et al. Antibiotic oxylipins from *Alternanthera brasiliana* and its endophytic bacteria. **Phytochemistry**, v. 110, p. 72–82, 2015.

## CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DE PLANTAS DO SEMIÁRIDO NORDESTINO COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

**Ítalo da Silva Batista**  
**Francinalva Dantas de Medeiros**

**RESUMO:** Os estudos envolvendo plantas com potencial atividade medicinal são uma importante fonte de recurso para a validação da medicina tradicional, bem como para o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos pela indústria farmacêutica. O bioma semiárido é rico em biodiversidade e uma grande fonte de recursos com potencial farmacológico, entre elas destaca-se as espécies *Libidibia ferrea* e *Schinopsis brasiliensis*, com relatos do seu uso popular como antimicrobianos. Assim, o presente trabalho teve por objetivo realizar a caracterização fitoquímica de plantas do semiárido nordestino com potencial atividade antimicrobiana. Para isso as espécies foram coletadas no município de Cuité – PB, no Horto Olho D'água da Bica, para *L. ferrea* foram utilizadas as folhas e frutos maduros e para *S. brasiliensis* foram utilizadas as folhas. O material vegetal foi seco em estufa de circulação de ar a e moído utilizando moinho de facas, em seguida extraídos os seus constituintes químicos utilizando maceração, como método extrator, e solução hidroalcoólica como solvente extrator. A caracterização fitoquímica foi realizada utilizando metodologias tradicionais colorimétricas e cromatografia

líquida, para a obtenção do perfil cromatográfico das espécies. Para o extrato de *L. ferrea* foi observado significativa presença de polifenóis totais seguidos de flavonoides, entretanto, não foi possível detectar taninos. Para o extrato de *S. brasiliensis* foi observado a presença de compostos fenólicos, alcaloides, e reação levemente positiva para taninos. Foi realizado o perfil cromatográfico dos extratos a fim de realizar sua caracterização fitoquímica. Portanto, os extratos hidroalcoólicos obtidos apresentaram constituintes fitoquímicos relevantes para a presença de atividade antimicrobiana.

**PALAVRAS-CHAVE:** Plantas medicinais, Fitoquímica, *Libidibia ferrea*, *Schinopsis brasiliensis*.

### PHYTOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF SEMIARID PLANTS WITH POTENTIAL ANTIMICROBIAL ACTIVITY

**ABSTRACT:** Studies involving plants with potential medicinal activity are an important resource for the validation of traditional medicine, with the popular use of these plants, as well as for the development of herbal medicines by the pharmaceutical industry. The semi-arid biome is rich in biodiversity and a great source of resources with pharmacological potential, among them the

species *Libidibia ferrea* and *Schinopsis brasiliensis*, with reports of its popular use as antimicrobials. Thus, the present work aimed to characterize the phytochemical of northeastern semiarid plants with potential antimicrobial activity, aiming to contribute to the future development of phytotherapeutic drugs. For this the species were collected in the municipality of Cuité - PB, in Horto Olho D'água da Bica, for *L. ferrea* the leaves and mature fruits were used and for *S. brasiliensis* the leaves were used. The plant material was dried in an air circulating oven at 40 ° C and milled using a knife mill, after which the chemical constituents were extracted using maceration, as an extractor method, and 50% and 70% hydroalcoholic solution as extraction solvent. The phytochemical characterization was performed using traditional colorimetric methodologies and liquid chromatography, to obtain the chromatographic profile of the species. For the *L. ferrea* extract, a significant presence of total polyphenols followed by flavonoids was observed, however, it was not possible to detect tannins. The presence of phenolic compounds, alkaloids, and a slightly positive reaction to tannins were observed for *S. brasiliensis* extract. The chromatographic profile of the extracts was carried out in order to perform their phytochemical characterization. Therefore, the hydroalcohol extracts obtained showed phytochemical constituents that are relevant for the presence of antimicrobial activity, corroborating with what is observed in the literature.

**KEYWORDS:** Herbal medicines, Phytochemistry, *Libidibia ferrea*, *Schinopsis brasiliensis*.

## INTRODUÇÃO

A fitoterapia, ou a terapia através do uso de plantas com atividade medicinal, é uma das práticas terapêuticas mais antigas da história da humanidade, com origens no conhecimento popular. As plantas medicinais, utilizadas na medicina tradicional, têm o intuito de prevenção de doenças, e promoção e recuperação da saúde (BARACUHY et al., 2016). O uso de plantas medicinais é uma prática baseada no conhecimento popular e, quase sempre, transmitida oralmente. Dessa forma, conhecer como as pessoas utilizam os recursos naturais torna-se de grande valor na construção do conhecimento científico.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece a importância da fitoterapia, sugerindo ser uma alternativa viável e importante também às populações dos países em desenvolvimento, já que seu custo é diminuído (FERREIRA et al., 2014; GUO et al., 2016; LEITE et al., 2017). Garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional. Esse é o objetivo da Política e do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PPNPMF), que propõe a ampliação das opções terapêuticas e melhoria da atenção à saúde aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS). Um dos princípios orientadores da PPNPMF é a ampliação das opções terapêuticas e melhoria da atenção à saúde

aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS). Sendo implantada também no SUS a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), que além de auxiliar no que diz respeito a utilização dos fitoterápicos, também envolve outras áreas como a homeopatia, acupuntura, entre outras (Brasil, 2006a; Brasil 2016b; Brasil 2016).

O Brasil possui a maior e mais variada composição florística do mundo. Dentre as regiões geográficas do país, temos a região do semiárido (figura 1), em que se destaca o bioma caatinga, que é uma promissora fonte de recursos vegetais a serem explorados do ponto de vista farmacêutico. Esse bioma se estende pela totalidade do estado do Ceará (100%) e mais de metade da Bahia (54%), da Paraíba (92%), de Pernambuco (83%), do Piauí (63%) e do Rio Grande do Norte (95%), quase metade de Alagoas (48%) e Sergipe (49%), além de pequenas porções de Minas Gerais (2%) e do Maranhão (1%), ocupando uma área aproximada de 844.453 km<sup>2</sup>, equivalente a 9.92% da área total do território brasileiro. A caatinga é marcada pelo clima semiárido, com altas temperaturas e duas estações bem definidas, uma seca e quente e outra seca e úmida. O solo é alcalino, pedregoso e raso, dificultando a agricultura. A vegetação, predominantemente um estrato arbóreo ou arbustivo-arbóreo, fica submetida à deficiência hídrica sazonal, agravada nos anos de seca.

Como exemplos de espécies de plantas com potencial atividade medicinal temos, *Libidibia ferrea* L.P. Queiroz e *Schinopsis brasiliensis* Engler.

O gênero *Libidibia* (família Fabaceae) compreende mais de 500 espécies de árvores e arbustos distribuídos mundialmente, especialmente nas áreas tropicais e subtropicais. *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) L.P. Queiroz (basônimo *Caesalpinia ferrea*), popularmente conhecida como jucá ou pau-ferro, é uma árvore endêmica das regiões Norte, Nordeste e Sudeste, apresentando domínio fitogeográfico na Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. A árvore apresenta grande porte, podendo alcançar 15 metros, e possui tronco curto com diâmetro médio de 40-60 cm. As folhas são compostas bipinadas e as flores são amarelas, aparecendo em inflorescências terminais ou axilares. Os frutos são indeiscentes e apresentam-se como vagens rígidas de cor verde ou marrom dependendo do estágio de maturação (COSTA; GUILHON-SIMPLICIO; SOUZA, 2015; FLORA DO BRASIL, 2017; NAWWAR et al. 2015).

Na medicina popular brasileira, essa planta é utilizada para diversos fins terapêuticos, incluindo tratamento de feridas, contusões, reumatismo, inflamações, febre, diabetes, enterocolite, diarreia, tosse, asma, hemoptise pulmonar, entre outros. As folhas, frutos, cascas e raízes são geralmente utilizadas na forma de chá e tinturas. As cascas também são aplicadas na preparação de xaropes e enxaguantes bucais (CARVALHO et al. 1996; SAMPAIO et al., 2009). Devido ao seu potencial terapêutico e ao seu amplo uso popular no Brasil, a *L. ferrea* foi incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde – RENISUS (BRASIL, 2009).

Pesquisas apontam que diferentes partes de *L. ferrea* apresentam atividade

anti-inflamatória, antioxidante, analgésica, hipoglicêmica, cicatrizante, antiviral, antimicrobiana, antitumoral, antiulcerogênica, antirugas, despigmentante, entre outras, as quais dão suporte científico ao seu uso popular e ainda revelam outras atividades biológicas importantes. Dentre as diversas atividades biológicas reportadas, destaca-se o potencial anti-inflamatório e analgésico da *L. ferrea* (BACCHI et al., 1995; CUNHA et al., 2017; HASSAN et al., 2015; LIMA et al., 2012; LOPES et al., 2013; MARREIRO et al., 2014; OHIRA et al., 2013; PEDROSA et al., 2016; PEREIRA et al., 2012; PEREIRA et al., 2016; SILVA et al., 2011).

A *Schinopsis brasiliensis* Engl. é árvore da família Anacardiaceae, de comportamento decíduo, podendo atingir até 15m de altura. Sua casca externa é cinzenta, quase negra, áspera e desprende-se em porções irregularmente quadrangulares, com espessura de até 30 mm. É encontrada desde a latitude 5° S no Ceará e Rio Grande do Norte, até 20° S em Mato Grosso e Minas Gerais. É popularmente conhecida como braúna, quebracho ou chamacoco. Na caatinga, possui caráter solitário, sendo encontrados no máximo 15 indivíduos por hectare (CARVALHO, 2008). Diversos estudos descreveram o potencial antimicrobiano da *S. brasiliensis* (Donati et al 2014, Saraiva et al 2013, Saraiva et al 2011, Silva et al 2012). Popularmente, suas partes são utilizadas na medicina para diversos agravos (ALMEIDA et al, 2005, ALBUQUERQUE, 2006, ALBUQUERQUE et al, 2007). A *S. brasiliensis* também é utilizada pelos índios kariri-xocó e xocó, sendo sua casca triturada e cozida é usada para aliviar dores de dente, e o chá da casca é usado no combate à dor de ouvido (CARVALHO, 2008).

O presente trabalho teve por objetivo realizar a caracterização fitoquímica de plantas do semiárido nordestino com potencial atividade antimicrobiana, visando contribuir para o desenvolvimento futuro de medicamentos fitoterápicos.

## METODOLOGIA

Para a seleção das espécies vegetais utilizadas, foi realizada uma revisão da literatura utilizando as bases de dados, Periódicos Capes. Eletronic Libary Online (SciELO), Science Direct, PubMed e Flora do Brasil arquivo digital produzido pela National Library of Medicine na área das Biociências. Além das bases de dados, durante a pesquisa foi utilizado o acervo da Biblioteca da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), campus Cuité-PB.

As plantas da região do semiárido paraibano foram selecionadas de acordo com a indicação popular de atividade antimicrobiana. O material vegetal selecionado foi coletado no município de Cuité – PB, no Horto do Centro de Educação e Saúde, da Universidade Federal de Campina Grande. A identificação botânica das plantas foi realizada no Herbário do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, Campus Cuité, onde foram depositada as exsicatas.

O material vegetal coletado foi seco em estufa de ventilação forçada à temperatura

constante de 40 °C e processado em moinho de facas com granulometria em torno de 10 mesh, sendo dividido em alíquotas e essas submetidas a processo extrativo por maceração utilizando solução hidroalcoólica a 50 % para o preparo do extrato de *L. ferrea* e 70 % para o extrato de *S. brasiliensis*.

Foram realizados testes para identificação através de reações de caracterização de metabólitos secundários característicos da espécie, por meio de reações químicas. Para compostos fenólicos foram realizadas reação utilizando cloreto férrico, para taninos utilizando reação com gelatina, esteroides e triterpenoides utilizou-se reação de Lieberman-Burchard, para identificação da presença de alcaloides realizou-se reação de Dragendorff, e para identificação da presença de flavonoides realizou-se reação de Shinoda.

A determinação do perfil cromatográfico do extrato foi realizada utilizando por cromatografia líquida, acoplado a um detector de ultravioleta (UV). Para isto, foi utilizada uma coluna reversa do tipo C18, com fase móvel composta por água purificada e metanol.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram selecionadas as plantas *Libidibia ferrea* L.P. Queiroz e *Schinopsis brasiliensis* Engler, coletadas as partes aéreas dessas espécies no município de Cuité – PB, no Horto do Centro de Educação e Saúde, da Universidade Federal de Campina Grande, e, posteriormente, encaminhadas para identificação botânica no herbário, na mesma instituição.

O material vegetal, separadamente, foi submetido à secagem em estufa de circulação de ar, à 40 °C e posteriormente pulverizado em moinho de facas com malha de 10 mesh. Os extratos hidroalcoólicos foram obtidos pelo método de maceração a temperatura ambiente, sem agitação, utilizando como solvente extrator uma mistura de água/etanol na proporção 50:50 (v/v) para *L. ferrea* e na proporção 30:70 (v/v) para *S. brasiliensis*.

Para o extrato de *L. ferrea* foi observado significativa presença de polifenóis totais seguidos de flavonoides, entretanto, não foi possível detectar taninos. Para o extrato de *S. brasiliensis* foi observado a presença a presença de compostos fenólicos, alcaloides, e reação levemente positiva para taninos.

Os resultados observados corroboram com a literatura, pois estudos fitoquímicos revelaram a presença de flavonoides, saponinas, taninos condensados (catequinas) e hidrolisados (ácidos gálico e elágico), cumarinas, esteroides e outros compostos fenólicos em extratos hidroalcoólicos das folhas e cascas do caule de *L. ferrea* (ARAUJO et al., 2014; LIMA et al., 2012; VASCONCELOS et al., 2011; WYREPKOWSKI et al., 2014). O extrato aquoso dos frutos apresentou alcaloides, antraquinonas, açúcares depsídeos, depsídonas, flavonoides, taninos, saponinas, sesquiterpenos, lactonas e triterpenos (CARVALHO, 1993). Os taninos e seus derivados foram identificados como

os compostos majoritários da casca e do fruto dessa planta (NAKAMURA et al., 2002; VASCONCELOS et al., 2011; WYREPKOWSKI et al., 2014).

O teor elevado e a diversidade de polifenóis presentes nas partes da *L. ferrea* têm sido associados as suas diversas atividades biológicas. Os derivados tânicos isolados dos frutos, incluindo o ácido gálico (AG), metil galato e ácido elágico (AE), apresentaram atividade antidiabética e antitumoral em estudos in vitro (NAKAMURA et al., 2002; UEDA et al., 2001).

Para a *S. brasiliensis* foi observado por Cardoso et al (2004) a presença de grupos fenois, isolados na fração hexânica do extrato metanólico da casca da *S. brasiliensis*, além de evidenciar a presença de derivados esteroides de ergosterol. A caracterização fitoquímica do óleo essencial das folhas desta planta mostrou uma forte presença de mirceno, um monoterpene com atividade antioxidante (DONATI et al, 2014). Já Santos et al (2014) detectaram a presença de flavonoides e taninos no extrato hidroalcoólico da casca da *S. brasiliensis*, bem como a ausência de toxicidade. Ainda é possível detectar, qualitativamente, a presença de auronas, catequinas, chalconas, flavononas, saponinas e taninos na fração acetato de etila do extrato hidroalcoólico, enquanto que na fração hexânica e na clorofórmica apenas esteroides e triterpenos, respectivamente.

## CONCLUSÃO

Portanto, os extratos hidroalcoólicos obtidos apresentaram constituintes fitoquímicos relevantes para a presença de atividade antimicrobiana, corroborando com o que é observado na literatura.

## AGRADECIMENTOS

O presente projeto PIBIC/CNPq-UFCG foi realizado com apoio do Centro de Educação e Saúde – UFCG e da Universidade Federal de Campina Grande.

## REFERÊNCIAS

Albuquerque UP (2006). Re-examining hypotheses concerning the use and knowledge of medicinal plants: a study in the Caatinga vegetation of NE Brazil. *J Ethnobiol Ethnomed* 2:30.

Albuquerque UP, Medeiros PM, Almeida ALS, Monteiro JM, Lins-Neto EMF, Melo JG, Santos JP (2007). Medical plants of the *caatinga* (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. *J Ethnopharmacol* 114:325-354.

Almeida CFCBR, Lima e Silva TC, Amorim ELC, Maia MBS, Albuquerque UP. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from *caatinga* (Northeast Brazil). *J Arid Environments*. 2005;62:127-142.

ARAÚJO, A. A.; SOARES, L. A. L.; FERREIRA, M. R. A. NETO, M. A. S.; SILVA, G. R.; ARAÚJO

JR., R. F.; GUERRA, G. C. B.; MELO, M. C. N. Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone-water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. *Journal of Ethnopharmacology*, New York, v. 156, p. 88-96, 2014.

BACCHI, E. M.; SERTIÉ, J. A.; VILLA, N.; KATZ, H. Antiulcer action and toxicity of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea*. *Planta Medica*, Stuttgart, v. 61, n. 3, 1995.

BARACUHY, J.G.V.; FURTADO, D.A.; FRANCISCO, P.R.M.; LIMA, J.L.S.; PEREIRA, J.P.G. **Plantas Mediciniais de uso comum no Nordeste do Brasil**. 2º edição. Campina Grande: EDUEG, 2016.

BRASIL. Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo. Secretaria dos Colaboradores. Comissão Assessora de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. **Plantas Mediciniais e Fitoterápicos**. São Paulo: Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo, 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. 1º edição. Brasília. Ministério da Saúde. 2006a.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Mediciniais da Central de Medicamentos**. 1º edição. Brasília: Ministério da Saúde, 2006b.

Cardoso MP, David JM, David JP. A new alkyl phenol from *Schinopsis brasiliensis*. *Nat Prod Res*. 2005;19(5):431-433

Carvalho PER. Espécies arbóreas brasileiras. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas: 2008.

CARVALHO, J. C. T.; TEIXEIRA, J. R. M.; SOUZA, P. J.C; BASTOS, J. K.; FILHO, D. S.; SARTI, S. J. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. *Journal of Ethnopharmacology*, New York, v. 53, p. 175-178, 1996.

COSTA; L. M.; GUILHON-SIMPLICIO, F.; SOUZA, T. P. *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz Var. *Ferrea*: Pharmacological, phytochemical and botanical aspects. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Hyderabad, v. 7, n. 4, 48-53, 2015.

CUNHA, A. P.; RIBEIRO, A. C. B.; RICARDO, N. M. P. S.; OLIVEIRA, A. C.; DÁVILA, L. S. P.; CARDOSO, J. H. L.; RODRIGUES, D. C.; AZEREDO, H. M. C.; SILVA, L. M. A.; BRITO, E. S.; FILHO, J. M.; ROCHA, T. M.; LEAL, L. K. A. M.; RICARDO, N. M. P. S. Polysaccharides from *Caesalpinia ferrea* seeds – Chemical characterization and anti-diabetic effects in Wistar rats. **Food Hydrocolloids**, New York, v. 65, p. 68-76, 2017.

Donati M, Mondin A, Chen Z, Miranda FM, Nascimento Júnior BB, Schirato G, Pastore P, Foldi G. Radical scavenging and antimicrobial activities of *Croton zehntneri*, *Pterodon emarginatus* and *Schinopsis brasiliensis* essential oils and their major constituents: estragole, trans-anethole, B-caryophyllene and myrcene. *Nat Prod Res*. 2014

FERREIRA, P. A.; SANTOS, F. L. A.; ALVES, L. D. S.; FERRAZ, L. R. M.; ROSA, T. A.; SILVA, R. M. F.; PRESMICH, G. M. A.; ROLIM, L. A.; SILVA, M. S.; MAIA, M. B. S.; ROLIM-NETO, P.J. Characterization and standardization of the herbal drug *Baccharis trimera* (Less.) DC and its lyophilized extract. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, Pnackula, v. 5, n. 12, p. 5191-5200, 2014.

GUO, L.; DUAN, L.; DOU, L.; LIU, L.; YANG, H.; LIU, E.; LI, P. Quality standardization of herbal medicines using effective compounds combination as labeled constituents. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, New York, v. 129, p. 320-331, 2016.

HASSAN, S. K.; EL-SAMMAD, N. M.; MOUSA, A. M.; MOHAMMED, M. H.; FARRAG, A. R. H.; HASHIM, A. N. E.; WERNER, V.; LINDEQUIST, U.; NAWWAR, M. A. E. Hypoglycemic and antioxidant activities of *Caesalpinia ferrea* Martius leaf extract in streptozotocin-induced diabetic rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Haikou, v. 5, n. 6, p. 462-471, 2015.

LEITE, R. S.; SOUZA, V. G.; OLIVEIRA, A. H.; JUNIOR, J. V. C.; SALVADOR, I. S.; ANDRADE, F. H. D.; MACEDO, R. O.; SOUZA, F. S. Standardization and stability evaluation of dry extracts of *Myracrodruon urundeuva* Allemão obtained by spray dryer. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Hyderabad, v. 9, n. 2, 154-159, 2017.

LIMA, S. M. A.; ARAÚJO, L. C. C.; SINTÔNIO, M. M.; FREITAS, A. C. C.; MOURA, S. L.; CORREIA, M. T. S.; MALTA, D. J. N.; GONÇALVES-SILVA, T. Anti-inflammatory and analgesic potential of *Caesalpinia ferrea*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 169, 175, 2012.

LOPES, N.; FACCIN-GALHARDI, L. C.; ESPADA, S. F.; PACHECO, A. C.; RICARDO, N. M. P. S.; LINHARES, R. E. C.; NOZAWA, C. Sulfated polysaccharide of *Caesalpinia ferrea* inhibits herpes simplex virus and poliovirus. **International Journal of Biological Macromolecules**, Oxford, v. 60, p. 93-99, 2013.

MARREIRO, R. O.; BANDEIRA, M. F. C. L.; SOUZA, T. P.; ALMEIDA, M.C.; BENDAHAM, K.; VENÂNCIO, G. N.; RODRIGUES, I. C.; COELHO, C. N.; MILÉRIO, P. S. L. L.; OLIVEIRA, G. P.; CONDE, N. C. O. Evaluation of the stability and antimicrobial activity of an ethanolic extract of *Libidibia ferrea*. **Clinical, Cosmetic and Investigation Dentistry**, Auckland, 2014

NAWWAR, M. A.; HUSSEIN, S. A.; EL-MOUSALLAMI, A. M.; HASHIM, A. N.; MOUSA, M. A.; HETTA, M. H.; HAMED, M. A.; WERNER, V.; BECKER, A.; HAERTEL, B.; LINDEQUIST, U. Phenolics from *Caesalpinia ferrea* Mart.: antioxidant, cytotoxic and hypolipidemic activity. **Pharmazie**, München, v. 70, p. 553-558, 2015. .

OHIRA, S.; TAKAYA, K.; MITSUI, T.; KIDO, M.; KAKUMOTO, K.; HAYASHI, K.; KUBOKI, A.; TANI, H.; IKEDA, S.; IINUMA, M.; AKAO, Y.; NOZAKI, H. New chalcone dimers from *Caesalpinia ferrea* Mart act as potent inhibitors of DNA topoisomerase II. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 54, p. 5052-5055, 2013.

PEDROSA, T. N.; BARROS, A. O.; NOGUEIRA, J. R.; FRUET, A. C.; RODRIGUES, I. C.; CALCAGNO, D. Q.; SMITH, M. A. C.; SOUZA, T. P.; BARROS, S. B. M.; VASCONCELLOS, M. C.; SILVA, F. M. A.; KOOLEN, H. H. F.; MARIA-ENGLER, S. S.; LIMA, E. S. Anti-wrinkle and anti-whitening effects of jucá (*Libidibia ferrea* Mart.) extracts. **Archives of Dermatological Research**, Berlin, v. 308, p. 643-654, 2016.

PEREIRA, L. P.; SILVA, R. O.; BRINGEL, P. H. S. F.; SILVA, K. E. S.; ASSREUY, A. M. S.; PEREIRA, M. G. Polysaccharide fractions of *Caesalpinia ferrea* pods: Potential anti-inflammatory usage. **Journal of Ethnopharmacology**, New York, v. 139, p. 642-648, 2012.

PEREIRA, L.P.; MOTA, M. R. L.; BRIZENO, L. A. C.; NOGUEIRA, F. C.; FERREIRA, E. G. M.; PEREIRA, M. G.; ASSREUY, A. M. S. Modulator effect of a polysaccharide-rich extract from *Caesalpinia ferrea* stem barks in rat cutaneous wound healing: Role of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , NO, TGF- $\beta$ . **Journal of Ethnopharmacology**, New York, v. 187, p. 213-223, 2016.

POPOWSKA, 2012.

SAMPAIO, F. C.; PEREIRA, M. S. V.; DIAS, C. S.; COSTA, V. C. O.; CONDE, N. C. O; BUZALAF, M. A. R. *In vitro* antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, New York, v. 124, p. 289-294, 2009.

Santos CCS, Araújo SS, Santos ALLM, Almeida ECV, Dias AS, Damascena NP, Santos DM, Santos MIS, Júnior KALR, Pereira CKB, Lima ACB, Shan AYKV, Santana AEG, Estevam CS, Araújo BS. Evaluation of the toxicity and molluscicidal and larvicidal activities of *Schinopsis brasiliensis* stem bark extract and its fractions. *Braz J Pharma*. 2014;24:298-303.

Saraiva AM, Castro RHA, Cordeiro RP, Peixoto Sobrinho TJS, Castro VTNA, Amorim ELC, Xavier HS, Pisciotano MNC. *In vitro* evaluation of antioxidant, antimicrobial and toxicity properties of extracts of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae). *Afr J Pharm Pharmacol*. 2011;5(14):1724-1731.

Saraiva AM, Saraiva CL, Cordeiro RP, Soares RR, Xavier HS, Caetano N. Atividade antimicrobiana e sinérgica das frações das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl. frente a clones multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. *Rev Bras Plantas Med*. 2013;15(2):199-207

Silva MSP, Brandão DO, Chaves TP, Formiga-Filho ALN, Costa EMMB, Santos VL, Medeiros ACD. Study bioprospecting of medicinal plant extracts of the semiarid northeast: contribution to the control of oral microorganisms. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012.

SILVA, L. C. N.; JÚNIOR, C. A. S.; SOUZA, R. M.; MACEDO, A. J.; SILVA, M. V.; CORREIRA, M. T. S. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. **Food and Chemical Toxicology**, New York, v. 49, p. 2222-2228, 2011.

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**, New York, v. 137, p. 1533-1541, 2011.

## COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETORA DOS EXTRATOS DE *AVERRHOA CARAMBOLA L.*

### **Tálison Taylon Diniz Ferreira**

Universidade Federal do Maranhão - UFMA  
São Luís – Maranhão

### **Orlene Nascimento da Silva**

Universidade Federal do Maranhão – UFMA  
São Luís – Maranhão

### **Jéssyca Wan Lume da Silva Godinho**

Universidade Federal do Maranhão – UFMA  
São Luís – Maranhão

### **Kleyton Santos Veras**

Universidade Federal do Maranhão – UFMA  
São Luís – Maranhão

### **Denise Fernandes Coutinho**

Universidade Federal do Maranhão – UFMA  
São Luís – Maranhão

### **Flavia Maria Mendonça do Amaral**

Universidade Federal do Maranhão – UFMA  
São Luís – Maranhão

**RESUMO:** O emprego de espécies vegetais na terapêutica está integrado em diversas sociedades, contudo, a falta de informações sobre as suas propriedades representa um risco para o usuário, o que estimular os estudos de padronização de extratos e possibilita o fornecimento de importantes subsídios sobre estes recursos terapêuticos. Assim, esse estudo objetiva aplicar metodologia analítica para padronização dos extratos das folhas

de *Averrhoa carambola* L. (Oxalidaceae), conhecida como carambola, amplamente empregada na prática popular e de grande ocorrência no Brasil. As folhas de carambola foram coletadas em habitat natural, submetidas à secagem e moagem para obtenção dos extratos hidroalcoólicos, empregando planejamento fatorial tendo como variáveis: operação de extração (maceração, percolação e Soxhlet) e relação de hidromódulo (1:8, 1:12 e 1:16), submetidas a análise físico-químicas, investigação da atividade fotoprotetora e antioxidante. Os resultados comprovam presença de compostos fenólicos, saponinas, taninos condensados, flavonas, flavonóis, xantonas, catequinas, flavononas, esteroides e triterpenos; porém, foram evidenciadas variações quantitativas entre os extratos; variações essas também evidenciadas no doseamento de compostos fenólicos e avaliação da atividade antioxidante. Na determinação do fator de proteção solar, os extratos não apresentaram atividade significativa. As análises cromatográficas indicaram substâncias a serem empregadas como marcadores analíticos e/ou ativo para controle de qualidade dos extratos. Os resultados evidenciam que procedimento extrativo e relação de hidromódulo são variáveis que influenciam nos extrativos da espécie; e, conseqüentemente, na atividade antioxidante, fotoprotetora e concentração dos constituintes

químicos.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Averrhoa carambola* L., padronização de extratos, controle de qualidade, atividade antioxidante, atividade fotoprotetora.

## CHEMICAL COMPOSITION, ANTIOXIDANT AND PHOTOPROTETIC ACTIVITY OF THE EXTRACTS OF *AVERRHOA CARAMBOLA* L.

**ABSTRACT:** The use of plant species in the therapeutic is integrated in various societies, however, the lack of information about the properties represents a risk to the users, which stimulate the study of standardized of extracts and enables the provision of important subsidies on these therapeutic resources. Thus, this study aims to apply an analytical methodology for the standardization of extracts of the leaves of *Averrhoa carambola* L. (Oxalidaceae), known as carambola, widely used in popular practice and great occurrence in Brazil. Carambola leaves weret collected in natural habitat, subjected to drying and milling to obtain the hydroalcoholic extracts, using factorial planning, with the following variables: extracting operations (maceration, percolation and Soxhlet) and hidromódulo ratio (1:8, 1:12 and 1:16), submitted to physical-chemical analysis, investigation of photoprotective and antioxidant activity. The results show the presence of phenolic compounds, saponins, condensed tannins, flavones, flavonols, xanthonnes, catechins, flavonones, steroids and triterpenes; however, there were quantitative variations between extracts; variations also evident in the assay of phenolic compounds and evaluation of antioxidant activity. In determining the sun protection factor, the extracts did not present significant activity. Chromatographic analysis indicated substances to be used as analytical and / or active markers for the quality control extracts. The results show that the extractive procedure and the hidromódulo ratio are variables that influence the extractives of the species; and consequently, antioxidant, photoprotective activity and concentration of the chemical constituents.

**KEYWORDS:** *Averrhoa carambola* L., standardization of extracts, quality control, antioxidant activity and photoprotective activity.

### 1 | INTRODUÇÃO

O uso medicinal de espécies vegetais sempre teve grande expressão, seja por razões históricas e culturais e/ou por representar o único recurso acessível aos cuidados básicos de saúde, com reconhecimento da sua representatividade pela Organização Mundial de Saúde (OMS), pois a propagação do uso de plantas validadas poderia diminuir os custos dos programas de saúde pública (AGRA et al., 2008). Contudo, a falta de informações adequadas sobre as propriedades das plantas de uso popular medicinal, seus efeitos farmacológicos e toxicidade são fatores de alto risco; bem como o uso em associação com outras plantas e/ou medicamentos sintéticos, onde as possíveis interações não estão elucidadas (SILVEIRA et al., 2008).

Na análise da qualidade das plantas medicinais, produtos tradicionais fitoterápicos e medicamentos fitoterápicos um dos problemas predominantes é a variabilidade dos constituintes químicos e, conseqüentemente, da eficácia terapêutica; que podem estar relacionados a diversas variáveis, tais como: qualidade da matéria prima, tecnologias operacionais, características edafoclimáticas, entre outras (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Na garantia da qualidade é fundamental o desenvolvimento de estudos para definir parâmetros para padronização dos produtos farmacêuticos e uniformidade do material utilizado, visando garantia da integridade dos constituintes em todas as etapas de preparação (SIMÕES et al., 2004; KLEIN et al., 2009).

Os estudos de padronização devem priorizar a avaliação dos extrativos vegetais por meio de planejamento fatorial, enfatizando a definição das variáveis que influenciam na extração, pois representam a etapa fundamental na obtenção de fitoterápicos, garantindo a separação de substâncias de interesse da matriz complexa (MIGLIATO et al., 2011).

Vários estudos mostram que inúmeras espécies vegetais nativas são utilizadas para fins terapêuticos nos estados do nordeste brasileiro, com destaque para *Anacardium occidentale* L. (caju), *Averrhoa carambola* L. (carambola), *Chenopodium ambrosioides* L. (mastruz), *Eleutherine plicata* Herb (coquinho) e *Psidium guajava* L. (goiaba) (AGRA et al., 2008; NEIVA et al., 2014). Entretanto, faltam pesquisas sobre seus constituintes químicos e/ou atividades biológicas; o que deve estimular os estudos de validação (AGRA et al., 2008).

*Averrhoa carambola* L. (carambola), representa uma das 900 espécies pertencentes à família Oxalidaceae, constituindo árvore frutífera originária da Índia, aclimatada em muitos países tropicais, como o Brasil, introduzida desde início do século XIX (PROVASI et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2011). Suas folhas e frutos têm sido usados na prática popular como estimulante de apetite, antidiarreico, antipirético, diurético, antidiabético, antioxidante, anti-inflamatório, antimicrobiano, tratamento de eczemas e diabetes (MORESCO, 2011).

Diante do exposto, esse estudo teve como objetivo investigar a influência dos processos de extração nas folhas de *Averrhoa carambola*, visando contribuição efetiva na obtenção de novas alternativas e/ou complementos terapêuticos.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Coleta do material vegetal, identificação botânica e obtenção dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Averrhoa carambola*

Amostras das folhas de *Averrhoa carambola* foram coletadas no município de Matões no Estado do Maranhão (latitude – 3,63, longitude – 44,55, 3 graus 37'51" sul,

44 graus 33'11" oeste), no mês de abril de 2013. A identificação botânica foi realizada no Herbário Ático Seabra da Universidade Federal do Maranhão (UFMA); sob número 0561/SLS017213.

A amostra vegetal foi submetida à secagem em estufa com circulação de ar, em temperatura média de 38°C; seguida de trituração em moinho de facas, obtendo pó moderadamente grosso (250 - 710  $\mu$ m) (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Os extratos foram obtidos a partir do material seco e moído por planejamento fatorial, empregando como variáveis o método extrativo maceração (M), percolação (P), Soxhlet (S), por período de 15, 3 e 1 dias respectivamente e relação droga/solvente (1:8, 1:12, 1:16), utilizando etanol 70% como solvente. Todos os extratos foram submetidos à determinação de rendimento (SIMÕES et al., 2004; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

## 2.2 Análises químicas e físico-químicas

Os extratos hidroalcoólicos das folhas de *Averrhoa carambola* foram submetidos a métodos de avaliação qualitativos e semi-quantitativos dos constituintes químicos, determinação do pH (extrato hidratado e seco), teor de cinzas totais, umidade e densidade (MATOS, 2009; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Para determinar as concentrações de polifenóis totais foram obtidas utilizando reagente Folin-Ciocalteu,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 20%. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 760 nm e os resultados expressos em miligramas de equivalência a ácido gálico (GA) por grama de extrato seco (MESQUITA et al., 2016).

Para mensurar as concentrações de flavonoides totais foram determinadas utilizando solução metanólica de  $\text{AlCl}_3$ , com leituras realizadas em espectrofotômetro a 425 nm e os resultados expressos em miligramas de equivalência a quercetina (QE) por grama de extrato seco (MESQUITA et al., 2016).

Para a realização da cromatografia em camada delgada, alíquotas de 10  $\mu$ L da solução metanólica de cada extrato (1 mg/mL) foram aplicados em placas de sílica gel F<sub>254</sub>, sendo utilizado como eluente: n-butanol P.A./ácido acético P.A./água (20:5:2), segundo Provasi et al. (2001), com modificações. As amostras foram analisadas utilizando o revelador: vapor de iodo. A análise qualitativa e quantitativa foi fundamentada no valor de  $R_f$  (índice de retenção) e na coloração entre os extratos (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Para obtenção do perfil cromatográfico por CLAE foi empregado um cromatógrafo Surveyor Plus/Finnigan acoplado a detector de ultra-violeta (CLAE-UV-Vis). Uma coluna analítica Hypersil BDS C-18 de fase reversa (250 x 4,60 mm, 5  $\mu$ m, Thermo Electron) protegida por uma pré-coluna C-18 (4 x 3 mm, 5  $\mu$ m, Gemini, Phenomenex) foi utilizada. A mistura de solventes empregada para eluição foi: água Milli-Q contendo 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila (C), com gradiente: 0-1 min, 80% de A e 20% de C; 1-32 min, 30% de A e 70% de C; 32-35 min, 80% de A e 20% de C. O fluxo foi de

1,0 mL/min, a temperatura ambiente e foram injectados 25µL. A detecção no UV-Vis foi realizada a 280 nm.

### 2.3 Avaliações da atividade antioxidante

A investigação da capacidade antioxidante foi realizada pelos ensaios ABTS e DPPH.

A atividade antioxidante pelo método DPPH foi determinada segundo Brand-Williams et al. (1995), com modificações. As amostras foram diluídas em diferentes concentrações em etanol P.A (5 a 100 µg/mL), em seguida adicionados à solução metanólica de DPPH (40 µg/mL). Após 30 min de reação em temperatura ambiente ao abrigo da luz, a absorbância de cada solução foi medida em espectrofotômetro a 517 nm. Padrão de ácido gálico foi usado como controle positivo, nas mesmas condições das amostras. A percentagem de descoloração do radical DPPH foi obtida com a equação: atividade antioxidante (%) = [(ADPPH – Aamostra)/ ADPPH] x 100. Onde ADPPH é a absorbância do DPPH (controle negativo) e Aamostra é a absorbância do radical na presença dos extratos ou dos padrões. Os resultados foram expressos como valores de CE<sub>50</sub> (concentração efetiva 50%), concentração do extrato que causa a perda de 50% da atividade do DPPH. Os extratos foram classificados de acordo com Melo et al., (2010).

O ensaio FRAP foi baseado no método descrito por Benzie e Strain (1996), com modificações. O reagente FRAP foi previamente preparado. Diferentes concentrações de 100 µL das amostras (1 – 100 µg/mL) foram adicionadas a 300 µL de água destilada e 3 mL do reagente FRAP, sendo a mistura incubada em banho-maria a 37°C por 30 minutos. As absorbâncias das misturas foram lidas em comprimento de onda de 593 nm em espectrofotômetro, usando a solução FRAP como branco. A curva de calibração foi previamente preparada e os resultados foram expressos como milimols de Fe<sup>2+</sup> por grama de amostra. Padrões de Trolox foram tratados sob as mesmas condições das amostras.

### 2.4 Determinação do Fator de Proteção Solar (FPS)

Foi utilizado o método *in vitro* espectrofotométrico desenvolvido por Mansur et al. (1986). Os extratos hidroalcoólicos das folhas de *Averrhoa carambola* foram diluídos em etanol P.A. 99,5 % até a concentração final de 0,2 µg/mL. As absorbâncias das soluções foram determinadas na faixa de 290 a 320 nm, com intervalos de 5 nm e os resultados foram aplicados na equação a seguir:

$$FPS \text{ espectrofotométrico} = FC. \sum_{290}^{320} EE(\lambda). I(\lambda). Abs(\lambda)$$

## 2.5 Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos pelo menos uma vez. Para planejamento fatorial foram consideradas variáveis: operação de extração e hidromódulo. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão ( $X \pm SD$ ), ou média  $\pm$  erro padrão ( $X \pm SEM$ ). A análise estatística empregou análise de variância (ANOVA) seguida do teste Tukey-Kramer. O nível de significância foi pré-estabelecido em 5% ( $p < 0,05$ ). Todos os dados foram analisados pelo Programa GraphPadPrism versão 5.0.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos de *Averrhoa carambola* obtidos foram submetidos a avaliação de pH, densidade, teor de umidade e cinzas totais (tabela 1).

EXTRATOS	pH		densidade	umidade	cinzas totais
	EH	ES			
P 1:08	6,52	6,08	0,91	7,94	5,96
P 1:12	6,73	6,26	0,90	7,91	4,67
P 1:16	6,87	6,41	0,90	8,81	5,15
S 1:08	6,01	6,13	0,91	7,27	6,29
S 1:12	6,05	6,40	0,90	4,15	6,28
S 1:16	6,14	6,74	0,90	5,75	6,25
M 1:08	6,44	6,50	0,90	7,65	7,58
M 1:12	6,53	6,62	0,89	10,04	6,06
M 1:16	6,54	6,82	0,90	11,17	4,73

Tabela 1. Valores de pH, densidade (g/mL), teor de umidade (%) e cinzas totais (%) dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Averrhoa carambola* L.

EH: extrato hidroalcoólico; ES: extrato seco ressuscitado em água destilada a 1%

Vale enfatizar que esses valores de pH dos extratos de *Averrhoa carambola*, não inviabilizam a obtenção de suas preparações derivadas de uso tópico, já que segundo Silva et al. (2009), os valores de tolerância biológica para aplicação de produtos cutâneos devem estar entre pH de 5,5 a 8,0.

Os valores de densidade dos extratos hidroalcoólicos secos de *Averrhoa carambola* variaram de 0,89 a 0,90 g/mL (tabela 1), logo dentro da normalidade, já que a literatura estabelece valores de 0,87 a 0,98 g/mL, como normais após o processo de extração o de plantas medicinais (FONSECA, 2009).

A umidade residual variou de 4,1 a 11,17%, (tabela 1), indicando teores aceitáveis (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Umidade abaixo de 14 garante ao produto a inibição da ação de enzimas e do desenvolvimento bacteriano (SZABO et al., 2014).

A determinação do teor de cinzas quantifica as substâncias inorgânicas

não voláteis, sendo importante parâmetro de qualidade possibilitando evidenciar falsificações ou adulterações (SZABO et al., 2014). Os valores apresentados na tabela 1 variam de 4,67 a 7,58%, sendo relativamente superiores aos usuais apresentados por outras espécies com monografias presentes na Farmacopeia Brasileira que variam aproximadamente de 3 a 5% (OCAMPOS et al., 2013). Contudo, esses valores podem ser considerados normais, já que em Provasi et al., 2001, a determinação de cinzas totais de *Averrhoa carambola* foi de 8,57%, demonstrando que esses altos valores são característicos da espécie.

Na avaliação de rendimentos, o extrato hidroalcoólico de *Averrhoa carambola* obtidos por percolação no hidromódulo 1:16, apresentou melhor resultado (35,65%) sem diferença estatística ( $p < 0,05$ ), evidenciando que o método extrativo e o hidromódulo interferem no teor de resíduos sólidos. O rendimento pode ser explicado pela dinâmica do processo, pois na percolação o líquido extrator é renovado constantemente levando a exaustão (TRABULSI FILHO et al., 2013).

Os resultados da prospecção química nos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Averrhoa carambola* através de testes qualitativos, demonstram resultados positivos para compostos fenólicos, saponinas, taninos condensados, heterosídeos cianogênicos, esteroides, triterpenos, flavonas, flavonóis, xantonas, catequinas e flavonas; evidenciando que o procedimento extrativo e a relação de hidromódulo influenciam em relação à avaliação semi-quantitativa.

As classes de metabólitos secundários nesse estudo são compatíveis aos resultados de Provasi et al. (2001) e Araho et al. (2005), que identificaram a presença de flavonoides, taninos e triterpenos.

A quantificação de compostos fenólicos e atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Averrhoa carambola* obtidos por planejamento fatorial demonstrou variação em função do processo extrativo e relação de hidromódulo empregados (tabela 2).

EXTRATO	POLIFENÓIS TOTAIS (mgGA)/g	FLAVONOIDES (mgQE)/g	DDPH (CE <sub>50</sub> ) (µg/mL)	FRAP mmol Fe <sup>2+</sup> /g
P 1:08	349,82 ±1,609 <sup>a</sup>	22,71 ±0,035 <sup>b</sup>	52,31 ±0,053 <sup>c</sup>	2,56 ±0,084
P 1:12	349,61 ±1,301 <sup>a</sup>	18,55 ±0,056 <sup>b</sup>	35,968 ±0,455 <sup>c</sup>	2,31 ±0,172 <sup>d</sup>
P 1:16	358,16±2,088 <sup>a</sup>	21,31 ±0,057 <sup>b</sup>	29,549 ±0,571	2,45 ±0,235 <sup>d</sup>
S 1:08	280,59 ±3,271 <sup>a</sup>	18,84 ±0,017 <sup>b</sup>	49,65 ±0,798 <sup>c</sup>	2,14 ±0,123 <sup>d</sup>
S 1:12	304,1 ±1,526 <sup>a</sup>	21,7 ±0,146 <sup>b</sup>	58,934 ±1,988 <sup>c</sup>	1,43 ±0,041 <sup>d</sup>
S 1:16	275,47 ±1,456 <sup>a</sup>	15,12 ±0,039 <sup>b</sup>	48,93 ±1,428 <sup>c</sup>	1,99 ±0,077 <sup>d</sup>
M 1:08	405,59 ±0,884	25,09 ±0,016	37 ±0,918 <sup>3 c</sup>	2,11 ±0,08 <sup>4d</sup>
M 1:12	398,12 ±0,259	24,34 ±0,043	37,18 ±0,872 <sup>c</sup>	2,88 ±0,064
M 1:16	407,73 ±0,225	24,54 ±0,014	43,05 ±0,552 <sup>c</sup>	1,97 ±0,29 <sup>d</sup>

Tabela 2. Polifenóis totais (mgGA)/g, flavonoides (mgQE)/g, atividade antioxidante por DDPH (CE<sub>50</sub>) e FRAP (mmol Fe<sup>2+</sup>/g) nos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Averrhoa carambola* L.

<sup>a</sup>indica diferenças significativas em relação à M 1:16 (polifenóis totais) ( $p \leq 0,05$ ), ANOVA seguido de Tukey-Kramer. <sup>b</sup> indica diferenças significativas em relação à M 1:08 (flavonoides) ( $p \leq 0,05$ ), ANOVA seguido de Tukey-

Kramer. \*indica diferenças significativas em relação à P 1:16 (DPPH) ( $p \leq 0,05$ ), ANOVA seguido de Tukey-Kramer. <sup>a</sup>indica diferenças significativas em relação à M 1:12 (FRAP) ( $p \leq 0,05$ ), ANOVA seguido de Tukey-Kramer. Ácido gálico (controle positivo):  $CE_{50}$ : 1,5  $\mu\text{g/mL}$ . Trolox (controle positivo): 8,91  $\text{mmol Fe}^{2+}/\text{g}$ .

Na quantificação de polifenóis totais e flavonoides foi constatado valores mais expressivos para os extratos obtidos por maceração 1:08, 1:12 e 1:16; evidenciando que o procedimento a frio de maceração possibilitou resultados mais expressivos, embora a literatura enfatize que a elevação de temperatura do processo extrativo possa influenciar de maneira positiva na velocidade de extração (SIMÕES, et al., 2004; TRABULSI FILHO et al., 2013).

Na análise antioxidante pelo DPPH, todos os extratos apresentaram boa atividade antioxidante, visto que Melo et al. (2010) classifica que todo extrato com  $CE_{50}$  menor que 65  $\mu\text{g/mL}$  pode ser classificado como boa atividade. Dentre os extratos analisados, o melhor resultado foi observado no extrato percolação 1:16, enquanto que pelo método FRAP o extrato com melhor atividade antioxidante foi o extrato maceração 1:12.

Muitos estudos estabelecem uma boa relação entre a atividade antioxidante e os compostos fenólicos (MORESCO, 2011; RAMAIYA et al., 2012); contudo Garcia-Alonso et al. (2004) expressa que a atividade antioxidante não apresenta correlação com a quantidade de fenólicos, mas contribui para isto, através de sinergismo ou antagonismo que ainda são desconhecidos. Assim, esta atividade está relacionada às características e mecanismo de ação dos vários compostos bioativos presentes (PAULA, 2015).

Estudo desenvolvido por Moresco et al. (2011) com extrato etanólico das folhas de *Averrhoa carambola*, apresenta teor de polifenóis e atividade antioxidante por DPPH menos expressivos que os evidenciados no nosso estudo, porém os autores apresentam teor de flavonoides e atividade antioxidante por FRAP mais expressivos. A diferença entre esses resultados, pode ser justificada pela qualidade da matéria prima vegetal que sofre influência das características edafoclimáticas (GOBBONETO; LOPES, 2007); sofrendo ainda, alterações em função dos métodos de análises empregadas.

A análise dos cromatogramas dos extratos das folhas de *Averrhoa carambola* obtidos por planejamento fatorial permite evidenciar a presença de 04 (quatro) substâncias em todas os extratos, sendo uma mais polar ( $R_f = 0,217$ ), duas de média polaridade ( $R_f = 0,417$  e  $0,584$ ) e uma mais apolar ( $R_f = 0,75$ ). A substância com  $R_f = 0,417$ , apresenta intensidade da mancha mais expressiva, passível de utilização como marcador analítico e/ou ativo para os extratos dessa espécie vegetal (Figura 1).

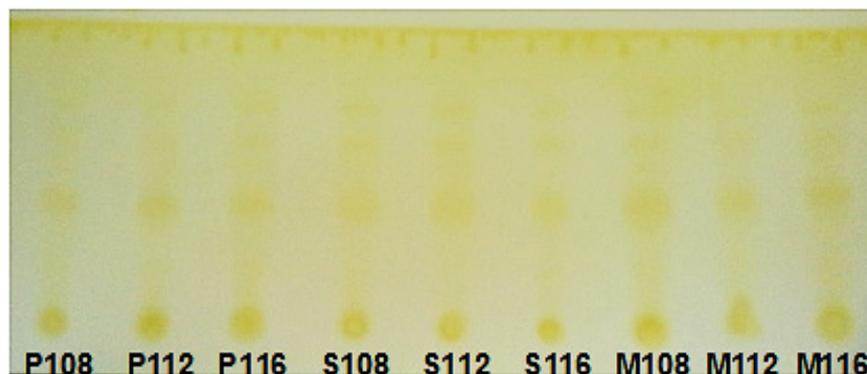


Figura 1: Cromatograma obtidos por cromatografia em camada delgada dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Averrhoa carambola* L. Alíquota de 10 $\mu$ L; Fase móvel: n-butanol P.A./ácido acético P.A./água (20:5:2); Fase estacionária: Sílica gel 60 F254 – MERCK; Revelador: vapor de iodo.

A análise dos cromatogramas (CLAE-UV-Vis) dos extratos de *Averrhoa carambola* obtidos por planejamento fatorial (figura 2) indica perfil cromatográfico semelhante entre as amostras em estudo, mas é constatada variação na constituição química comprovado pela diferença entre os tempos de retenção; variação essa em função do método extrativo e relação de hidromódulo.

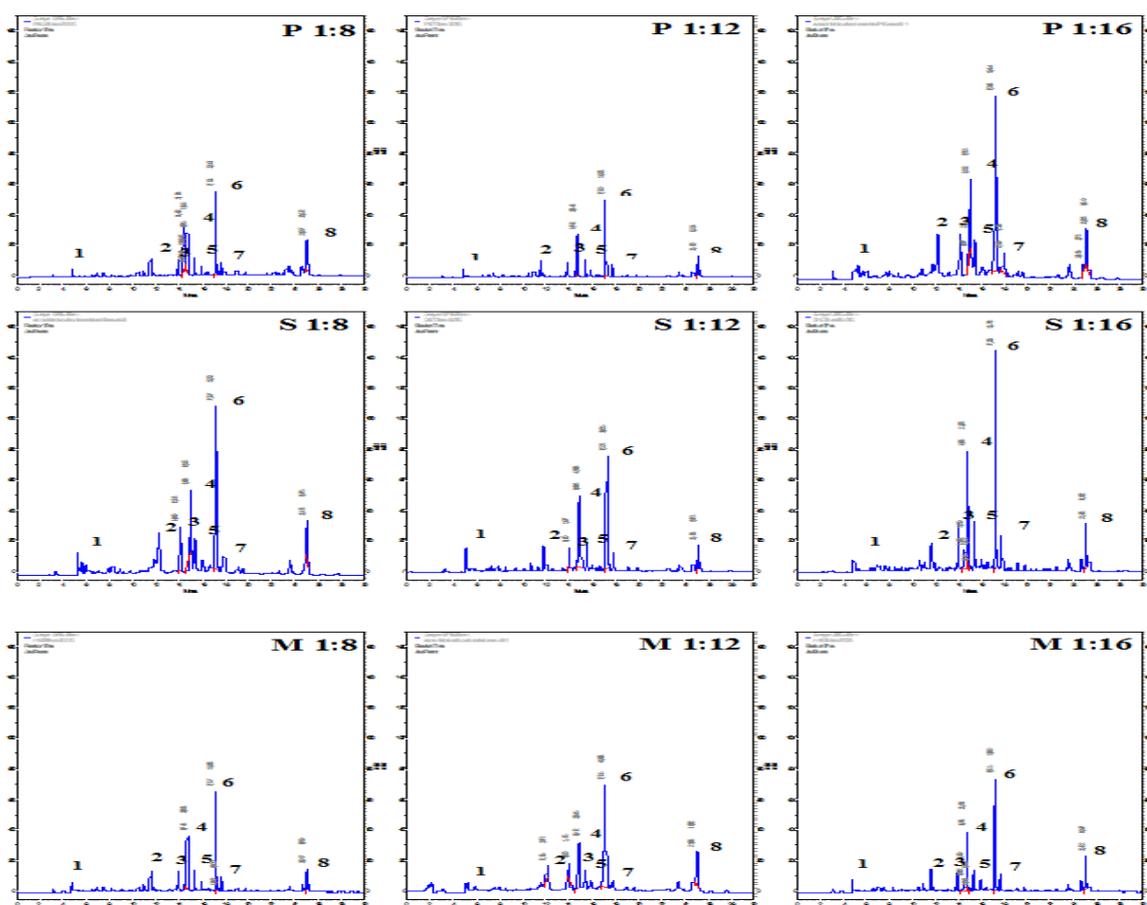


Figura 2. Cromatogramas por CLAE-UV-Vis dos extratos das folhas de *Averrhoa carambola* L., Coluna analítica Hypersil BDS C-18 de fase reversa (Thermo Electron), pré-coluna C-18 (Gemini, Phenomenex). Solventes: água Milli-Q com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila (C), gradiente: 0-1 min, 80% de A e 20% de C; 1-32 min, 30% de A e 70% de C; 32-35 min, 80% de A e 20% de C. Fluxo: 1,0 mL/min, temperatura ambiente, alíquota 25 $\mu$ L. Detecção no UV-Vis a 280 nm.

Em todos os extratos predominam constituintes nos tempos de retenção de 11,5 a 18 min; evidenciando, ainda, uma substância no tempo de 5,0 min e outra no tempo de 25,0 min que podem sugerir um marcador químico para os extratos.

Embora os picos apresentados nesse estudo não tenham sido identificados, a análise do cromatograma indica a presença de compostos fenólicos, já que os compostos fenólicos em sua maioria apresentam banda de absorção máxima próxima a 280 nm (SILVA, 2012).

Os dados da tabela 3 evidenciam que o extrato obtido pelo método extrativo Soxhlet no hidromódulo 1:16, apresentou melhor resultado (FPS: 0,0873); porém sem diferença estatística quando comparado ao método extrativo maceração no hidromódulo 1:8 (FPS: 0,05787).

Mas analisando os dados da tabela 3 constatamos que nenhum dos extratos hidroalcoólicos de *Averrhoa carambola* alcançariam, isoladamente, o valor mínimo exigido pela legislação brasileira, que é de no mínimo FPS 6 (BRASIL, 2012).

EXTRATOS	FPS
P1:08	0,03309 ±0,0049*
P1:12	0,0345 ±0,0082*
P1:16	0,0562 ±0,0065*
M1:08	0,05787 ±0,0101
M1:12	0,03305 ±0,0015*
M1:16	0,03335 ±0,0005*
S1:08	0,0437 ±0,0186*
S1:12	0,0558 ±0,0024*
S1:16	0,0873 ±0,0204

Tabela 3. Investigação da atividade fotoprotetora (FPS) dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Averrhoa carambola* L.

\* indica diferenças significativas em relação à S 1:16 (FPS) ( $p \leq 0,05$ ), ANOVA seguido de Tukey-Kramer.

#### 4 | CONCLUSÃO

As variáveis do procedimento extrativo e/ou hidromódulo influenciam na obtenção dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Averrhoa carambola* L. possibilitando definirmos parâmetros para controle de qualidade dos extratos obtidos a partir dessa espécie. As análises cromatográficas permitiram detectar importantes substâncias que podem servir de marcadores analíticos e/ou ativos para os extratos, contudo houve variação na concentração dos constituintes químicos encontrados, muito influenciada pelas variáveis de obtenção do extrato.

A análise dos cromatogramas obtidos por CLAE-UV-Vis em paralelo a análise da atividade antioxidante indica que os extratos que apresentaram picos mais expressivos não corroboram com os extratos de atividade antioxidante mais significantes. Esse

resultado pode sugerir que essa atividade não está atribuída a uma única classe de metabólitos secundários, como os compostos fenólicos, especialmente aos flavonoides como tem sido sistematicamente enfatizado na literatura, mas comprova a ação sinérgica de diversos constituintes químicos presentes no extrato de *Averrhoa carambola*.

## REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA FILHO, J. M. **Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 1, p. 472-508, 2008.
- ARAO, D.; MIYAKOSHI, M.; CHOU, W.; KAMBARA, T.; MIZUTANI, K.; IKEDA, T. **A new flavone C-glycoside from the leaves of *Averrhoa carambola*.** *Natural Medicines*, v.59, n.3, p. 113-116, 2005.
- BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. **Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay.** *Analytical Biochemistry*, v. 239, n. 292, p.70-76, 1996.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity.** *Food Science and Technology*, vol. 28, p.25-30, 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução RDC nº 30, de 1 de junho de 2012.** Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares Cosméticos e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 2006.
- ANVISA. **FARMACOPEIA BRASILEIRA.** 5.ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.
- FONSECA, F.C. **Desenvolvimento tecnológico de fitoproduto a partir de *Justicia pectoralis* – chambá: obtenção do extrato seco padronizado (CLAE – DAD) e avaliação farmacológica.** 2009. 130f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.
- GARCÍA-ALONSO, M.; PASCUAL-TERESA, S.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVASGONZALO, J. C. **Evaluation of the antioxidant properties of fruits.** *Food Chemistry*, v. 84, p. 13-18, 2004.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. **Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários.** *Química Nova*, v. 30, n.2, p. 374-381, 2007.
- KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M.L.; MELLO, J.C.P. **Fitoterápicos: um mercado promissor.** *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada*, v. 30, n.3, p. 241-248, 2009.
- MATOS, F.J. A. **Introdução a fitoquímica experimental.** 2.ed. Fortaleza: Edições UFC, 2009.
- MANSUR, J. S.; BREDER, M. N. R.; MANSUR, M. C. A.; AZULAY, R. D. **Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria.** *Anais Brasileiro de Dermatologia*, Rio de Janeiro, v. 61, n.3, p. 121-124, 1986.
- MELO, J. G.; ARAÚJO, T. A. S.; CASTRO, V. T. N. A.; CABRAL, D. L. V.; RODRIGUES, M. D.; NASCIMENTO, S. C.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. **Antiproliferative Activity, Antioxidant Capacity and Tannin Content in Plants of Semi-Arid Northeastern Brazil.** *Molecules*, v. 15, p. 8534-8542, 2010.
- MESQUITA, L. S. S.; MESQUITA, J. W. C.; DUTRA, R. P.; BATISTA, M. C. A.; MALIK, S.; AMARAL, F. M. M.; RIBEIRO, M. N. S. **Extraction Parameters Affect Flavonoids Content and Antioxidant Activities in *Passiflora edulis*.** *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. v. 8, n. 10, p. 99-107, 2016.

- MIGLIATO, K.F.; CORRÊA, M. A.; SALGADO, H. R. N.; TOGNOLLI, J. O.; SACRAMENTO, L. V. S.; MELLO, J. C. P.; GIANNINI, M. J. S. M.; ALMEIDA, A. M. F.; PIZZOLLITO, A. C. **Planejamento experimental na otimização da extração dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels.** *Química Nova*. v.34, n.4, p. 695-699, 2011.
- MORESCO, H. H; QUEIROZ, G. S.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M.C.; **Chemical constituents and evaluation of the toxic and antioxidant activities of *Averrhoa carambola* leaves.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 22, n.2, p, 319-324, 2011.
- NEIVA, V. A.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R. F.; CARTAGENES, M. S. S.; COUTINHO-MORAES, D. F.; AMARAL, F. M. M. **Plant species used in giardiasis treatment: ethnopharmacology and *in vitro* evaluation of anti-Giardia activity.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 24, p. 215-224, 2014.
- OCAMPOS, F. M. M.; MIGUEL, O. G.; OLIVEIRA, D. M. S. **Quality control parameters of *Sapium glandulosum* (L.) Morong (Euphorbiaceae): loss on drying, total ash and phytochemical screening.** *Visão Acadêmica*, v.14, n.2, p. 5-13, 2013.
- OLIVEIRA, M.T.R.; BERBERT, P.A.; PEREIRA, R.C.; VIEIRA, H.D.; CARLESSO, V.O. **Características biométricas e físico-químicas do fruto, morfologia da semente e da plântula de *Averrhoa carambola* L. (Oxalidaceae).** *Revista brasileira de sementes*. v.33, n.2, p. 251-260, 2011.
- PAULA, L. C. **Efeitos de diferentes métodos de conservação sobre os compostos bioativos e atividades antioxidante de Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes).** 2015. 130f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Goiás, Goiânia, 2015.
- PROVASI, M.; OLIVEIRA, C. E.; MARTINO, M.C., PESSINI, L.G., BAZOTTE, R.B., CORTEZ, D.A.G. **Avaliação da toxicidade e do potencial antihiperlipêmico da *Averrhoa carambola* L. (Oxalidaceae).** *Acta Scientiarum Health Science*, v. 23, n. 3, p. 665-669, 2001
- RAMAIYA, S.D., BUJANG, J.S., ZAKARIA, M.H., KINGA, W.S, SAHRIRA, M.A.S. **Sugars, ascorbic acid, total phenolic content and total antioxidant activity in passion fruit (*Passiflora*) cultivars.** *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 93, p. 1198-1205, 2012.
- 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.
- SILVA, A. A. **Aplicação de análise multivariada aos dados de análise cromatográficas e espectroscopia para a diferenciação de extratos de madeira.** 2012. 79f. Tese (Doutorado em Química Analítica e Inorgânica) – Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, 2012.
- 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.4, p.618-626, 2008.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia, da planta ao medicamento.** 5 ed. Florianópolis: Ed. UFRGS: 2004.
- SZABO, E. M.; HOMEM, I. C.M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Determinação de parâmetros físico-químicos e ensaio sistemático fitoquímico preliminar de *Cestrum inter medium* Sendtn. (Solanaceae).** *Visão Acadêmica*, v.15, n.4, p. 5-16, 2014.
- TRABULSI FILHO, F.A.; ANDRADE, K.C.S.; SILVA, E.C.; CASTRO, A.T.O.; BATISTA, M.C.A.; RIBEIRO, M.N.S.; AMARAL, F.M.M. **Estudo de padronização de extratos de *Anacardium occidentale* L. na pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos giardicidas.** *Caderno de Pesquisa*, São Luís, v. 20, p 7-15, 2013.

## CONHECIMENTO DE MULHERES USUÁRIAS DE UMA UNIDADE DE ESTRATÉGIA DE SAÚDE DA FAMÍLIA SOBRE A TRICOMONÍASE

### Jessé Alves de Souza

Centro Universitário Cesmac, Maceió-AL

### Laís Marques da Silva Pedrosa

Centro Universitário Cesmac, Maceió-AL

### Evilma Nunes de Araújo

Programa de Pós-graduação em Análise de Sistemas Ambientais, Centro Universitário Cesmac, Maceió-AL

### Alecio Marcelo Lima Dos Santos

Programa de Pós-graduação em Análise de Sistemas Ambientais, Centro Universitário Cesmac, Maceió-AL

### Paulyanne Karlla Araújo Magalhães

Programa de Pós-graduação em Análise de Sistemas Ambientais, Centro Universitário Cesmac, Maceió-AL

### Thiago José Matos Rocha

Programa de Pós-graduação em Análise de Sistemas Ambientais, Centro Universitário Cesmac, Maceió-AL

**RESUMO:** O objetivo deste estudo consistiu-se em avaliar o conhecimento das mulheres em acompanhamento no setor de ginecologia de uma Unidade de Estratégia de Saúde da Família, a respeito da tricomoníase. A avaliação foi realizada de forma interventista de abordagem quantitativa, o qual teve como amostra 100 mulheres que passam por acompanhamento junto ao setor de ginecologia da Unidade. Dentre as mulheres gestantes ou que já tiveram

a experiência da gestação pôde-se observar que 73,33% tiveram acompanhamento com pré-natal durante a gestação e 26,66% não tiveram acompanhamento. Diante do questionamento sobre o conhecimento da infecção, 70% das mulheres entrevistadas responderam não conhecer, 18% conhecem e 12% apenas ouviram falar. Quando questionadas se já tiveram a tricomoníase, 9% afirmaram que já haviam tido a infecção, 81% responderam que não e 10% preferiram não responder. Diante dos dados apurados em relação ao tratamento, todas as mulheres que relataram ter adquirido a infecção pelo *T. vaginalis*, afirmaram ter tratado, dentre elas 88,88% usaram Metronidazol e 11,11% outra medicação. Em suma, há necessidade de se seguirem outros estudos com o intuito de Reavaliar á importância de a população conhecer sobre o agente etiológico *Trichomonas vaginalis*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Tricomoníase. Gestantes. Saúde da mulher.

**ABSTRACT:** The objective of this study was to evaluate the knowledge of the women in follow-up in the gynecology sector of a Family Health Strategy Unit regarding trichomoniasis. The evaluation was performed in a quantitative approach, with a sample of 100 women who undergo follow-up with the gynecology sector of the Unit. Among the pregnant women or

those who already had the experience of gestation, it was observed that 73.33% had follow-up with prenatal care during pregnancy and 26.66% had no follow-up. Faced with questioning about the knowledge of the infection, 70% of the women interviewed answered not knowing, 18% knew and 12% only heard. When asked if they already had trichomoniasis, 9% said they had had the infection, 81% said no, and 10% preferred not to respond. According to the data on the treatment, all the women who reported having acquired the *T. vaginalis* infection, reported having treated, of which 88.88% used Metronidazole and 11.11% other medication. In summary, it is necessary to follow other studies in order to reassess the importance of the population to know about the etiologic agent *Trichomonas vaginalis*.

**KEYWORDS:** Trichomoniasis. Pregnant women. Women's health.

## 1 | INTRODUÇÃO

A tricomoniose é uma das Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST) mais comum em todo mundo, com uma incidência anual superior a 180 milhões de casos. A Organização Mundial de Saúde estimou que esta infecção explicasse quase 50% de todas as IST's com cura em todo o mundo (MAINA et al. 2016). É causada pelo protozoário *T. vaginalis*. Essa parasitose foi descrita pelo médico francês Alfred Donné (1936), relacionando-a com corrimento vaginal. O parasita foi considerado um inofensivo habitante da vagina por 80 anos. A morfologia e ciclo de vida do *T. vaginalis* passou a ser estudado, mas ainda pouco se sabe sobre sua imunopatogênese e os mecanismos usado para evadir o sistema imune (FICHOROVA, 2010).

Apresenta-se uma ampla variedade de manifestações clínicas. Os sinais e sintomas dependem das condições individuais, da agressividade e do número de parasitos infectantes. Pode haver sintomas de severa inflamação e irritação da mucosa genital, com presença de corrimento, o que leva a paciente a procurar o médico. Outras vezes a tricomoníase é assintomática e, ocasionalmente, descoberta em um exame de rotina (MANSHOORI, 2015).

Há também odor vaginal anormal e prurido vulvar. A vagina e a cérvix podem ser edematosas e eritematosas, com erosão e pontos hemorrágicos na parede cervical conhecido como *colpitis macularis* ou cérvix com aspecto de morango. Embora essa aparência seja altamente específica para tricomoníase, é vista somente em poucas mulheres (2% a 5%). Dor abdominal tem sido relatada entre muitas mulheres com tricomoníase e pode ser indicativa de infecção do trato urogenital superior (WANGNAPI, 2015).

É uma IST que exemplifica os fatos supracitados, inclusive no tocante a existência de diversas cepas patogênicas do agente etiológico *Trichomonas vaginalis*. Os indivíduos com tricomoníase desenvolvem infiltração maciça de leucócitos e pontos hemorrágicos nos tecidos genitais que favorecem a transmissão do vírus HIV (SMITH; GARBER, 2015).

Requer um tratamento sistêmico. O Ministério da Saúde preconiza o metronidazol 2g via oral dose única ou o metronidazol 500mg de 12/12 horas por sete dias. O tratamento deve ser realizado conjuntamente com o parceiro sexual. Em gestantes é indicado o uso tópico intravaginal. Embora o metronidazol apresente toxicidade seletiva, a utilização desse fármaco precisa ser monitorada pela enfermagem porque induz a seleção de cepas de *T. vaginalis* resistentes, apresenta potencial carcinogênico, confirmado experimentalmente *in vivo*, e atravessa a barreira transplacentária (SCHWEBKE et al 2014).

Na mulher, quando ocorre um aumento do pH da vagina (5,5 a 5,8), o desenvolvimento da Tricomoníase é facilitado, podendo gerar desde infertilidade tubal, doença inflamatória pélvica atípica, infecções neonatal ou puerperal, rompimento de membranas e parto prematuro, até pneumonia neonatal. Sua incidência está relacionada a vários fatores como idade, atividade sexual, número de parceiros sexuais, outras ITS'S, fase do ciclo menstrual e condições socioeconômicas (BONFANTI; GONÇALVES, 2014).

A incidência desta parasitose depende de vários fatores como a idade, atividade sexual, número de parceiros sexuais, outras IST's, fase do ciclo menstrual, método de diagnóstico, condições socioeconômicas, uso de contracepção, raça, tipo de amostra, entre outros (FIGUEIREDO; COSTA, 2015).

A prevalência elevada associada a graves complicações de saúde que a tricomoniose pode provocar como a transmissão do Vírus de Imunodeficiência Humana (HIV) causa de baixo peso em bebês, nascimentos prematuros, doença inflamatória pélvica atípica, neoplasia cervical e infertilidade, bem como a percentagem elevada de casos assintomáticos e a baixa sensibilidade dos testes usados no diagnóstico desta parasitose traduzem necessidade da compreensão do perfil epidemiológico na população em geral. Deste modo, é importante a realização de estudos em populações não consideradas de risco para existir uma idéia acerca da prevalência desta parasitose (SORVILLO et al., 2014).

A avaliação do conhecimento e práticas da população pode ajudar na redução das barreiras da informação e promoção em saúde (VILELLA et al 2009). O enfermeiro em seu viés educador, por meio ferramentas didáticas, norteia a transformação dos indivíduos inseridos na comunidade, aumentando sua capacidade de entendimento sobre os determinantes de ser saudável (REGIS; BATISTA, 2015).

Nota-se que a promoção em saúde é de suma importância, visando esclarecer e orientar as mulheres sobre as principais IST's, como a tricomoníase, seja elas gestantes, possibilitando um diagnóstico e tratamento precoce e reduzindo o risco de prematuridade e morte fetal, ou mulheres em um modo geral, diminuindo o número de casos da IST em questão e prevenindo complicações ainda maiores à saúde das mesmas.

Diante disto após a realização da palestra educativa notou-se um melhor esclarecimento entre as mulheres perante a IST abordada, o que pôde contribuir para

a minimização dos fatores associados à propagação dessa patologia.

Assim a pesquisa teve a seguinte pergunta norteadora: Qual o conhecimento de mulheres sobre a tricomoníase, usuarias de uma unidade de estratégia de saúde da família?

Frente ao problema em questão, o objetivo deste estudo foi em avaliar o conhecimento das mulheres em acompanhamento no setor de ginecologia de uma Unidade de Estratégia de Saúde da Família, a respeito da tricomoníase.

## 2 | MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Centro Universitário Cesmac, respeitando as normas éticas e legais da resolução 466/12 – MS. Sob protocolo nº 59197716.5.0000.0039 e parecer de aprovação nº 1.779.165. Foi realizado um estudo transversal de abordagem quantitativa, o qual teve como amostra 100 mulheres que passam por acompanhamento junto ao setor de ginecologia da Unidade de Estratégia em Saúde da Família (ESF), localizada no bairro de Guaxuma, Maceió-AL. Desta maneira a amostra foi do tipo não probabilística. O estudo foi realizado no período de janeiro a julho de 2017.

Antes de iniciar a pesquisa, o projeto foi exposto à diretora da unidade apresentando o objetivo e relevância do estudo para a população assistida naquela unidade, para que assim fosse dada a permissão para a realização da pesquisa.

Foram inclusos na pesquisa mulheres grávidas e não grávidas e que assinaram o Termo de Consentimento Livre e esclarecido (TCLE) ou o Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE) e excluídas aquelas que se negaram a assinar o TCLE ou o TALE.

Cada participante da pesquisa foi contactado pelo pesquisador, e a técnica escolhida foi à abordagem direta as mulheres que estiveram na sala de espera do setor de ginecologia. Antes da aplicação dos questionários as mulheres foram sensibilizadas quanto à importância da sua participação no estudo e somente após obter de consentimento verbal e a assinatura do TCLE pela mulher, o questionário foi aplicado. No caso das mulheres com idade inferior a 18 anos, a mesma assinou o TALE e seu responsável o TCLE autorizando sua participação. No mesmo dia em que assinaram o TCLE ou TALE e colaboraram com a pesquisa, foi realizada uma palestra educativa onde pôde-se sensibiliza-las e esclarecer suas dúvidas quanto a IST.

A abordagem das mulheres foi realizada através da aplicação de questionários diretamente na ESF, onde as mesmas freqüentavam, em uma sala reservada, cedida pela diretora da unidade, mantendo a privacidade de cada mulher entrevistada. O instrumento para a coleta de dados inicialmente foi composto por questões pessoais como: faixa etária, estado cívil, gestação atual e escolaridade, seguindo de questões relacionadas ao conhecimento das mesmas sobre a IST, prevenção e tratamento. A análise dos dados foi realizada de maneira descritiva e os dados apurados apresentados

em percentuais, utilizando o programa Microsoft Excel®.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tricomoníase é classificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma DST de freqüente transmissão sexual (STINGUEN et al., 2004). A epidemiologia da doença é ainda pouco compreendida, e alguns profissionais continuam a questionar a sua importância (BOWDEN; GARNET, 2000).

Sendo assim, a população estudada no período de 09 de fevereiro a 28 de Julho de 2017 foi constituída por 100 mulheres cadastradas na Unidade de Saúde. Portanto na análise dos questionários em uma amostra de 100% pôde-se observar que 12% foram menores de idade, entre 16 a 17 anos e 80% tinham entre 18 a 30 anos e 8% tinham mais de 30 anos. Sendo estas 25% gestantes e 75% não gestantes. Miller et al. (2015) cita que há estudos os quais mostram uma prevalência significativa de tricomoníase em mulheres entre 18 à 25 anos. Entretanto no estudo de Allsworth et al. (2010) pôde-se observar um índice de maior prevalência em mulheres de 28 à 40 anos.

Sobre a distribuição das mulheres em relação ao estado civil, 39% afirmaram ser casadas, 33% ter união estável, 22% eram solteiras e 6% eram divorciadas. Diante dos dados apurados notou-se que o estado civil não teve relação com a infecção por *T. vaginalis*. Contradiz com os resultados do estudo realizado por Grama et al. (2010), no qual apresenta que apenas 2,7% das mulheres com teste positivo e 97,3% negativo eram solteiras ou separadas, tendo a maior freqüência da doença entre as mulheres casadas sendo 8,3% positivo e 91,7% negativo.

O mesmo autor ainda trás resultados sobre a escolaridade e cita que em seu estudo a escolaridade foi estatisticamente significativa em relação à infecção, no entanto no presente estudo 57 % das mulheres apresentavam ensino fundamental, 32% ensino médio, 3% ensino superior e 8% não quiseram responder.

É sábio que dentre os fatores relacionados a propagação de IST's está a falta de conhecimento sobre a infecção. Diante disso, foi abordado sobre o conhecimento das mulheres em relação à tricomoníase, logo se apurou os dados do gráfico abaixo.

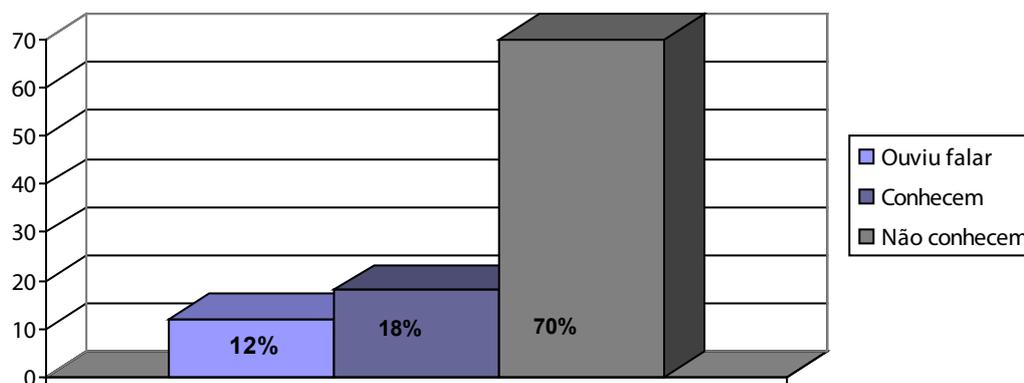


Gráfico 1. Porcentagem do conhecimento relatado entre as mulheres sobre tricomoníase, no período de janeiro a julho de 2017.

Fonte: Dados da pesquisa 2017.

Dentre as mulheres gestantes ou que já tiveram a experiência da gestação pôde-se observar que 73,33% tiveram acompanhamento com pré-natal durante a gestação e 26,66% não tiveram acompanhamento. Na gestação, quando ocorre um aumento do pH da vagina, assim a infecção por *Trichomonas* é facilitada, podendo gerar uma série de complicações materno-fetais. Sua incidência está relacionada a vários fatores como idade, atividade sexual, número de parceiros sexuais, outras doenças sexualmente transmissíveis, fase do ciclo menstrual e condições socioeconômicas (BONFANTI, GONÇALVES, 2014).

Ao serem questionadas se já sofreram algum aborto 16% afirmaram ter abortado em algum momento da vida e 84% responderam que não. Relatos da literatura mostram que gestantes com tricomoníase apresentam maiores riscos de ruptura prematura de membrana, endometrite pós-parto, feto natimorto e morte neonatal (GONDO et al., 2014). Os mecanismos de complicações ligadas a gravidez, devido a infecção por *T. vaginalis* permanecem ainda desconhecidos, necessitando de investigação das interações entre parasitas, microflora vaginal e o hospedeiro, pois poderão ser a chave para o entendimento dessas complicações (FICHOROVA, 2010).

No quesito prevenção, foi interrogado sobre o uso do preservativo e observou-se que as mesmas não adotavam bem o método preventivo ao ter relações sexuais como demonstra o gráfico 2.

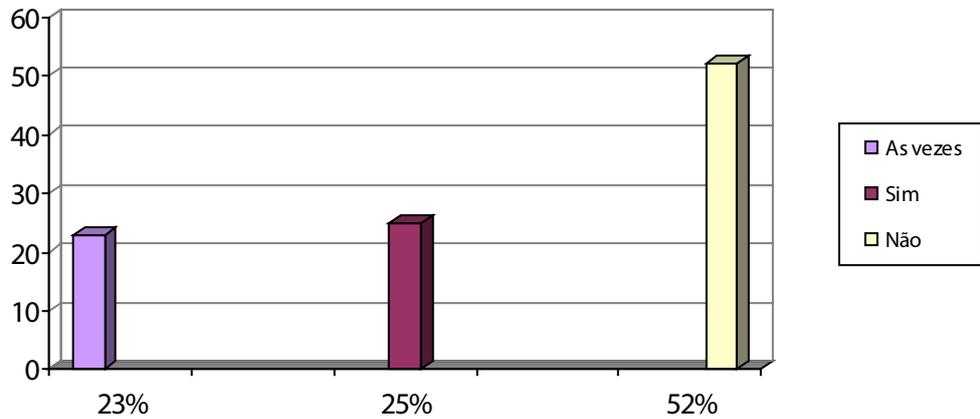


Gráfico 2. Porcentagem sobre o uso de preservativo relatado pelas mulheres no período de janeiro a julho de 2017.

Fonte: dados da pesquisa 2017.

Do ponto de vista clínico, deve-se ressaltar que os homens são portadores assintomáticos da doença. Em estudo realizado por Lichtenstein et al. (2015) sobre o uso de preservativos por mulheres diagnosticadas com tricomoníase, foi constatado que as mesmas dificilmente tinham relações usando o preservativo, seja em união estável ou com seus parceiros habituais, sem levar em conta o risco de contrair uma DST de seus parceiros. Quando indagadas se já realizaram algum exame que pudesse identificar a tricomoníase observou-se os seguintes resultados.

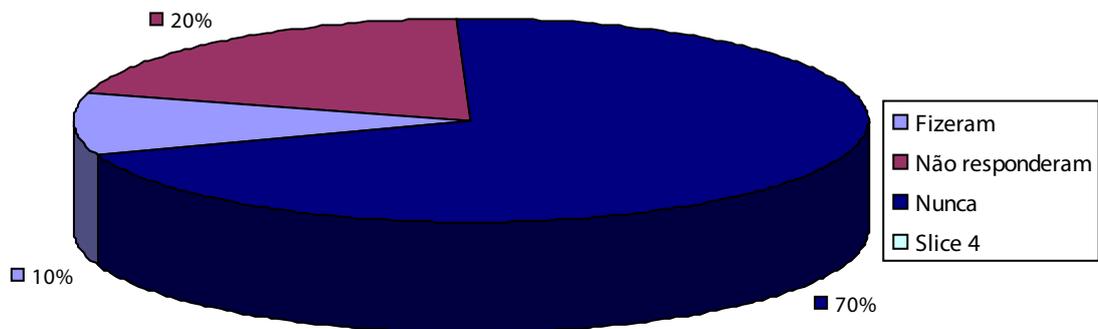


Gráfico 3 . Porcentagem de rastreamento relatado pelas mulheres, no período de janeiro a julho de 2017.

Fonte: dados da pesquisa 2017.

Frente a isso é importante enfatizar que o controle e rastreamento das tricomoníases é importante tendo em vista a elevada incidência de infecções agudas, complicações e sequelas (ALVAREZ, 2009). No diagnóstico de *T. vaginalis* pode ser usada a observação microscópica da secreção vaginal, que é um valioso meio por ser barata e de fácil execução (VAN DER POL et., al 2013).

Quando questionadas se já tiveram a tricomoníase, 9% afirmaram que já haviam

tido a infecção, 81% responderam que não e 10% preferiram não responder. Segundo BECKER et. al. (2011) a inflamação no epitélio do colo do útero causada por esta infecção, têm sido reconhecida como um dos cofatores predisponentes à carcinogênese cervical, assim, aumentando o risco de adquirir a infecção pelo papilomavírus humano.

Diante dos dados apurados em relação ao tratamento, todas as mulheres que relataram ter adquirido a infecção pelo *T. vaginalis*, afirmaram ter tratado, dentre elas 88,88% usaram Metronidazol e 11,11% outra medicação. O tratamento adequado com metronidazol apresenta altas taxas de cura, o fracasso no tratamento deve-se a recusa ao tratamento ou a reinfecção pelo parasita (PETRIN et al., 2011; CLELLAND, 2013).

Claramente a educação em saúde tem importante valor para a prevenção das IST's, tendo como objetivo conceitua-las e esclarecer as formas de transmissão e tratamento da infecção bem como medidas simples, porém de grande relevância, que a população pode adotar para evitar a propagação da mesma. Com base nisso foi idagado se as mulheres já haviam recebido alguma orientação ou participado de ações educativas que abordassem a tricomoníase, 20% responderam que participaram de ações ou receberam orientação e 80% negaram ter recebido qualquer tipo de esclarecimento.

#### 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após análise dos dados nota-se que há um baixo nível de conhecimento das usuárias da ESF de Guaxuma - Maceió-AL acerca da IST/Tricomoníase, tanto em seu conceito como em medidas que as mesmas podem tomar para prevenir a infecção. Tal resultado foi evidenciado através da amostra panorâmica da realidade da unidade pesquisada.

Além do baixo nível de conhecimento sobre a tricomoníase, observou-se que a medida de prevenção mais simples e eficaz, o preservativo, ainda é pouco aceita pelo grupo estudado. Convém destacar que também a importância do aconselhamento individual ou em grupo com as usuárias, sobre as práticas sexuais, onde as mesmas possam refletir e tirar suas dúvidas, de modo a torná-las mais conscientes e, sobretudo, sujeitas ativas no processo que envolve a prevenção da IST e o auto-cuidado.

Por fim nota-se que mesmo a tricomoníase sendo uma das principais IST's que mais acometem as mulheres, ainda há uma precariedade de informações provenientes dos profissionais de saúde, visto que não foi observado muitos relatos de mulheres que aleguem ter recebido algum tipo de orientação sobre a infecção e sua prevenção, sendo necessário uma melhor promoção em saúde, com palestras e ações educativas que abordem a infecção como seu foco principal. Nesse caso, o repasse de informações, e as estratégias voltadas para educação em saúde é de suma importância, conforme evidenciamos anteriormente.

## REFERÊNCIAS

- ALLSWORTH, J. E.; RATNER, J. A.; PEIPERT, J. F. Trichomoniasis and other sexually transmitted infections: results from the 2001-2004 National Health and Nutrition Examination Surveys. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 36, n. 12, p. 738-744, 2010.
- ALVAREZ, Hilda María Hernández; RAMOS Idalia Sariego; PÉREZ Jorge Sarracent. Infecção humana por *Trichomonas vaginalis* y su relación con otros agentes patógenos. **Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología**, v.35, n.4, p.108-117, 2009.
- BECKER, Débora L. Correlação entre Infecções Genitais e Alterações Citopatológicas Cervicais em Pacientes Atendidas no Sistema de Saúde Pública de Porto Alegre. **Jornal brasileiro de doenças sexualmente transmissíveis** v.23, n.3, p.116-119, 2011.
- BONFANTI, G.; GONÇALVES, T. L. Prevalência de *gardnerella vaginalis*, *candida spp.* e *trichomonas vaginalis* em exames citopatológicos de gestantes atendidas no Hospital Universitário de Santa Maria-RS. **Rev. Saúde, Santa Maria**, v. 36, n. 1, p. 37-46, 2014.
- BOWDEN, F. J.; GARNETT, G. P. *Trichomonas vaginalis* epidemiology: parameterising and analysing a model of treatment interventions. **Sex. Transm. Inf.** v. 76, n. 248-256, 2000.
- CLELLAND, R. S.; SANGARE, L.; HASSAN, W.; LAUREYS, L.; MANDALIYA, K.; KIARIE, J.; NBINYA-ACHOKA, J.; JAOKO, W.; BAGTEN, J.M. Infection with *Trichomonas Vaginalis* increases the risk of Hiv-1 acquisition. **Journal of Infectious Diseases**, USA, v. 195, N. 5 ,p. 698-702, 2015.
- FICHOROVA, R. N. Impacto of *Trichomonas vaginalis* infection on innate immune responses and reproductive outcome. **Journal of Reproductive Immunology**, USA, v. 83 ,n. 1-2, p. 185-189, 2010.
- FIGUEIREDO, L. A.; COSTA, C. Associação entre a infecção do aparelho genital e as intercorrências obstétricas dentre as grávidas atendidas em um hospital na cidade de Belém do Pará, v. 61, n. 1. p. 112-200, 2015.
- GONDO, D. C. A. F. Resultado perinatal de gestantes submetidas à busca ativa de infecção genital. 132 f. Dissertação (Doutorado em Enfermagem). Botucatu: **Universidade Estadual Paulista**: 2014.
- GRAMA, D. F. et al. Inquérito preliminar de *Trichomonas vaginalis* em população feminina e fatores de risco associados em Unidade de Atendimento público no município de Uberlândia-M. **Revista UFG**, v. 39, n. 2, p. 95, 2010.
- LICHTENSTEIN, D.; GOLDSTEIN, G.; MOURGEON, E. Comparative diagnostic performances of auscultation, chest radiography and lung ultrasonography in acute respiratory distress syndrome. **Anesthesiology**, v.19 ,n.10,p.100-109, 2015.
- MAINA, A. N.; KIMANI, J.; ANZALA, O. Prevalence and risk factors of three curable sexually transmitted infections among women in Nairobi, Kenya. **BMC Res Notes**, v.9 ,n.1,p.193, 2016.
- MANSHOORI, A.A Diagnostic and Symptomatology Study on Trichomoniasis in Symptomatic Pregnant Women in Rafsanjan, South Central Iran in 2012-13. Iran **J Parasitol**,v .10 , n. 3 , p. 490, 2015.
- MILLER, W. C.; SWYGARD, H.; HOBBS, M. M.; FORD, C. A.; HANDCOCK, M. S.; MORRIS, M.; SCHMITZ, J. L.; COHEN, M. S.; HARRIS, K. M.; UDRY, J. R. The prevalence of trichomoniasis in young adults in the United States sexually transmitted diseases, **RUSA**, v. 32, n. 10, p. 593-598, 2015.
- PETRIN, D.; DELGATY, K.; BHATT, R.; GARBER, G. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. **Clinical Microbiology Reviews**, Canadá, v. 11, n. 2, p. 300-317, 2010.

REGIS, C.G; BATISTA, N. B. O enfermeiro na área da saúde coletiva: concepções e competências. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v.68, n. 5, p 548-554, 2015

SCHWEBKE, J. R.; LENSING, S. Y.; SOBEL, J. Intravaginal metronidazole/miconazole for the treatment of vaginal trichomoniasis. **Sex Transm Dis**, v. 40 , n. 9 .p. 710, 2014.

SMITH, J. Trichomonas vaginalis infection induces vaginal CD4+ T-cell infiltration in a mouse model: a vaccine strategy to reduce vaginal infection and HIV transmission. **J Infect Dis**, v. 212 , n. 2 , p. 285, 2015.

SORVILLO, F.; SMITH, L.; KERNDT, P.; ASH, L. *Trichomonas vaginalis*, HIV, and African-Americans. **Emerg Infect Di**, v. 32 ,n.7 p.927, 2014.

STINGHEN, A. E. M.; NASCIMENTO, A. J.; LEONART, M. S. S. Método de Papanicolaou em material cérvico-vaginal para a triagem de infecção por *Candida sp.*, *Trichomonas vaginalis* e *Chlamydia trachomatis*. **Rev. Bras. Anal. Clin.** v. 36, n. 2, p. 111-115, 2004.

VILLELA, M. M; PIMENTA ,D.N; LAMOUNIER ,P.A; DIA,J.C.P. Avaliação de conhecimentos e práticas que adultos e crianças têm acerca da doença de Chagas e seus vetores em região endêmica de Minas Gerais, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, RJ, v.25, n.8, p. 1701- 10, 2009.

VAN DER POL, B.; KWORK, C.; PIERRE-LOUIS, B.; RINALDI, A.; SALATA, R. A.; CHEN, P. C.; VAN DE WIJGERT, J.; MMIRO, F.; MUGERWA, R.; CHIPATO, T.; MORRISON, C. S. *Trichomonas vaginalis* infection and human immunodeficiency virus acquisition in African women. **Journal of Infectious Diseases**, USA, v. 197, n. 4, p. 548-554. 2010.

WANGNAPI, R. Prevalence and risk factors for *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Trichomonas vaginalis* infection in pregnant women in Papua New Guinea. **Sex Transm Infect**, v. 91, n. 3. p. 194-200, 2015.

## CONTROLE DE QUALIDADE DE MEDICAMENTOS A BASE DE ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS

### **Mariana Ribeiro Gonçalves Cordeiro Cruz**

Faculdade Integral Diferencial – DeVry  
Teresina – Piauí

### **Bianca da Silva Cardoso**

Faculdade Integral Diferencial – DeVry  
Teresina – Piauí

### **Luiza Helena Nascimento Lopes**

Faculdade Integral Diferencial – DeVry  
Teresina – Piauí

### **Nadjanayra Soares Rodrigues**

Faculdade Integral Diferencial – DeVry  
Teresina – Piauí

### **Nathália Gonçalves Silva**

Faculdade Integral Diferencial – DeVry  
Teresina – Piauí

### **Thaís Silva Pires**

Faculdade Integral Diferencial – DeVry  
Teresina – Piauí

### **Táilson Taylon Diniz Ferreira**

Universidade Federal do Maranhão - UFMA  
São Luís - Maranhão

### **Maria dos Remédios Mendes de Brito**

Faculdade Integral Diferencial – DeVry  
Teresina – Piauí

### **Angélica Gomes Coelho**

Faculdade Integral Diferencial – DeVry  
Teresina – Piauí

um conjunto de operações que tem por finalidade analisar se o produto atende as especificações farmacopéicas, sendo de suma importância para garantia da qualidade dos medicamentos produzidos antes da liberação para a comercialização ou nas etapas de pré-comercialização, assim o objetivo do trabalho em questão foi avaliar a possível influência dos excipientes utilizados nos três grupos de medicamentos (referência, genérico e similar) nos testes físico-químico dos mesmos, avaliando com isso, a qualidade dos medicamentos oferecidos à população. Realizou-se um estudo experimental com abordagem qualitativa sendo analisadas quatro amostras de comprimidos de classes de medicamentos anti-inflamatórios (referência, genérico e similar) compreendendo medicamentos de Ibuprofeno 400 mg; Dipirona sódica 500 mg; Diclofenaco 50 mg e Nimesulida 100 mg. Os medicamentos foram adquiridos em drogarias de Teresina- Piauí, sendo realizados testes de peso médio, dureza, friabilidade e desintegração seguindo a metodologia descrita da Farmacopéia Brasileira. As amostras estavam de acordo com as especificações farmacopéicas quando relacionadas ao peso médio, friabilidade e dureza, entretanto quanto à desintegração encontrou-se uma amostra reprovada.

**PALAVRAS-CHAVES:** Equivalência; Medicamentos; Qualidade.

**RESUMO:** O controle de qualidade é

**ABSTRACT:** Quality control is a set of operations whose purpose is to analyze whether the product meets the pharmacopoeial specifications, being of paramount importance to guarantee the quality of the medicines produced prior to released for commercialization or in the pre-marketing stages, so the objective of the work in question was to evaluate the possible influence of the excipients used in the three groups of drugs (reference, generic and similar) in the physical-chemical tests of the same, evaluating with this, the quality of the medicines offered to the population. An experimental study with a qualitative approach was carried out and four samples of anti-inflammatory drug class tablets (reference, generic and similar) comprising 400 mg Ibuprofen medicines were analyzed; Dipyron sodium 500 mg; Diclofenac 50 mg and Nimesulide 100 mg. The drugs were purchased in drugstores in Teresina-Piauí, and tests of medium weight, hardness, friability and disintegration were performed following the methodology described in the Brazilian Pharmacopoeia. The samples were in agreement with the pharmacopoeial specifications when related to the average weight, friability and hardness, however in disintegration a reprobate sample was found.

**KEYWORDS:** Equivalence; Medicines; Quality.

## 1 | INTRODUÇÃO

Inúmeras variáveis conduzem a escolha e o uso dos medicamentos, nomeadamente variáveis sócio-demográficas, nível de conhecimento sobre os medicamentos, relação médico-doente, percepção de risco acerca dos efeitos posteriores, custo, esclarecimento por parte dos profissionais de saúde (médico e farmacêutico), gravidade da doença, dentre outros (FERNANDES, 2011).

Entretanto, a condição financeira do paciente tem um reflexo preocupante na adesão do mesmo ao tratamento. Visto que, ao equiparar diferentes níveis de renda, observou-se que a população com maior poder aquisitivo sempre busca por tratamentos mais eficazes, ou descobertos recentemente, os quais proporcionam mais qualidade de vida. Já os grupos de renda intermediária, são mais frágeis a variações de valores, mas por não saberem de alternativas acessíveis no mercado, os preços acabam por não influenciar na escolha do produto, mas intervém na adesão ao tratamento. Já a parcela da população de mais baixa renda, na maioria das vezes depende de medicamentos fornecidos pelo governo. Caso tenham que comprar a medicação, acaba fazendo uso de medicamentos de baixo custo (ISSI, 2011).

Um exemplo de medicamentos de fácil acesso a todas as classes econômicas são os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES), que são geralmente usados para reduzir a dor e inflamação resultantes de diversos tipos de lesões (BARBOSA, 2012).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o medicamento de referência é um produto inovador que foi registrado no órgão federal responsável pela vigilância sanitária e comercializado no País, cuja eficácia, segurança e qualidade foram comprovadas cientificamente junto ao órgão federal competente, de acordo com a determinação do inciso II, artigo 3º, da Lei n. 6.360, de 1976 (com

redação dada pela Lei nº 9.787 de 10 de fevereiro de 1999) (ANVISA, 2016).

Já os medicamentos genéricos são réplicas de medicamentos inovadores, comumente reproduzidos após o término ou renúncia da proteção patentária ou de outro direito de exclusividade. De modo consequente, como não há que se arcar com gastos em pesquisa e desenvolvimento (P&D), o custo é inferior aos dos medicamentos denominados de “referência”. Para considerar-se um medicamento genérico, o mesmo deve apresentar comprovações de qualidade, segurança e eficácia semelhante aos dos produtos de referência, aplicando-se rigorosamente os testes, antes de obter a aprovação das autoridades sanitárias do país para ser comercializado (NOVARETTI, 2014).

De acordo com a RDC 58 de 2014, que dispõe sobre a intercambialidade entre os medicamentos similares com os medicamentos de referência, aqueles que já tenham a comprovação da equivalência farmacêutica com o medicamento de referência da categoria, podem especificar na bula que são passíveis de substituição pelos mesmos. Apresentando na embalagem secundária os nomes fantasia, do princípio ativo e o da empresa que representa o medicamento. O qual é encontrado com um valor comercial normalmente inferior ao valor do medicamento genérico (BRASIL, 2014).

Contudo, equivalência farmacêutica envolve medicamentos que possuem o mesmo fármaco, isto é, o mesmo sal ou éster da mesma molécula terapeuticamente ativa, na mesma quantidade e forma farmacêutica, podendo conter, ou não, excipientes idênticos. Necessitando cumprir com as mesmas especificações atualizadas da Farmacopéia Brasileira e, na ausência destas, com as de outros códigos autorizados pela legislação vigente ou, ainda, com outros padrões aplicáveis de qualidade, relacionados à identidade, dosagem, pureza, potência, uniformidade de conteúdo, tempo de desintegração e velocidade de dissolução (BRASIL, 2003).

Tal fato, aliado ao respeito às Boas Práticas de Fabricação e Controle de Qualidade (BPFC), oferece as bases técnicas e científicas para a intercambialidade entre o medicamento genérico e o de referência, visto que ambos podem ser considerados equivalentes terapêuticos, já que apresentam a mesma eficácia clínica e potencial para gerar efeitos adversos (STORPIRTS, 2004).

Logo, o controle de qualidade faz parte das Boas Práticas de Fabricação (BPF), consistindo em um conjunto de operações que tem por finalidade analisar se o produto atende as especificações farmacopéicas, sendo de suma importância para garantia da qualidade dos medicamentos. A não conformidade expressa um somatório de transtornos para a empresa, resultando em perda de credibilidade e até na cassação da licença de funcionamento e do registro do produto. Dessa forma, o controle de qualidade torna-se indispensável para evitar infortúnios com o comprometimento da saúde do paciente, considerando que, medicamentos de qualidade inferior podem não apresentar eficácia terapêutica (MARIANO, 2015).

O objetivo do trabalho em questão foi avaliar a possível influência dos excipientes utilizados nos três grupos de medicamentos (referência, genérico e similar) nos testes

físico-químico dos mesmos, avaliando com isso, a qualidade dos medicamentos oferecidos à população de baixa renda.

## 2 | METODOLOGIA

Realizou-se um estudo experimental com abordagem qualitativa. As análises foram realizadas no laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade Integral Diferencial- FACID/ DeVry.

### 2.1 Amostras

Foram analisadas quatro amostras de comprimidos de medicamentos da classe anti-inflamatórios (referência, genérico e similar). As amostras compreenderam medicamentos princípios ativos de Ibuprofeno, de 400 mg; Dipirona sódica de 500 mg; Diclofenaco de 50 mg e Nimesulida 100 mg. Os medicamentos foram adquiridos em drogarias de Teresina- Piauí, sendo realizados testes de controle físico-químicos de qualidade como peso médio, dureza, friabilidade e desintegração

Todos os testes realizados seguiram a descrição na metodologia Farmacopéia Brasileira, 5<sup>o</sup> edição, volume 1.

### 2.2 Determinação do peso médio

Para a determinação do peso médio foi obtida uma média aritmética a partir da pesagem individual de 20 comprimidos em uma balança analítica Shimadzu modelo AY22. Os comprimidos utilizados nas pesagens foram retirados ao acaso.

### 2.3 Desintegração

Para a realização do teste de desintegração, foram utilizados 6 (seis) comprimidos de cada amostra. Submetidos a uma temperatura constante de 37°C e agitação constante, por um intervalo de tempo de 30 minutos, para comprimidos não revestidos e 45 minutos para comprimidos revestidos, no desintegrador da marca Ethiktechnology.

### 2.4 Friabilidade

Para a determinação da friabilidade foram utilizados 20 comprimidos de cada amostra no friabilômetro da marca Ethiktechnology, por um tempo de 5 minutos, com rotatividade de 15 RPM (Rotações por Minuto).

### 2.5 Dureza

Permite determinar a resistência do comprimido ao esmagamento ou à ruptura sob pressão radial. Para a determinação da dureza foram utilizados 10 (dez) comprimidos de cada amostra no durômetro da marca Ethiktechnology.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A monografia de um medicamento presente na farmacopéia determina os limites aceitáveis para os vários critérios de qualidade que devem ser obedecidos para que o produto seja aprovado. Quando isso acontece há máxima garantia de que será comercializado um produto farmacêutico seguro para a população (PUGENS, et al., 2008).

A tabela 1 mostra os valores de peso médio calculados para cada medicamento a partir da pesagem de 20 comprimidos.

MEDICAMENTOS	SIMILAR	GENÉRICO	REFERÊNCIA
<b>IBUPROFENO (400mg)</b>	0,619g	0,616g	0,814g
<b>DIPIRONA (500mg)</b>	0,584g	0,595g	0,527g
<b>NIMESULIDA (100mg)</b>	0,404g	0,411g	0,405g
<b>DICLOFENACO (50mg)</b>	0,219g	0,295g	0,215g

Tabela 1. Peso médio de comprimidos

FONTE: Dados da Pesquisa, 2016

De acordo com a tabela 1 demonstrada acima têm-se resultados satisfatórios para o peso médio dos comprimidos, uma vez que nenhuma das unidades pesadas exibiu valores fora dos limites farmacopeicos especificados, visto que de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010), para comprimidos não revestidos que possuam 80 mg ou menos, os limites de variação permitidos são de  $\pm 10\%$ , para comprimidos que possuam mais que 80 mg e menos que 250 mg respeita-se a variação de  $\pm 7,5\%$  e para comprimidos acima de 250 mg respeita-se a variação de  $\pm 5,0\%$ .

O tempo de desintegração de todos os comprimidos estão dispostos na tabela 2.

MEDICAMENTOS	SIMILAR	GENÉRICO	REFERÊNCIA
<b>IBUPROFENO</b>	Acima de 30	14:00 minutos	02:24 minutos
<b>DIPIRONA</b>	06:28 minutos	09:37 minutos	04:51 minutos
<b>NIMESULIDA</b>	01:38 minutos	02:42 minutos	02:12 minutos
<b>DICLOFENACO SÓDICO</b>	21:12 minutos	22:15 minutos	19:00 minutos

Tabela 2. Tempo de desintegração de comprimidos

Fonte: Dados da Pesquisa, 2016.

O diclofenaco sódico apresentou maior tempo de desintegração, devido conter revestimento. E de todas as amostras, apenas os comprimidos de Ibuprofeno similar, encontraram-se inadequados quanto à desintegração, visto que os mesmos não atingiram a desintegração total no tempo de 30 minutos.

Apesar do excipiente amido glicolato de sódio ter característica superdesagregante, o mesmo não apresentou resposta positiva no processo de desintegração do comprimido, visto que a formulação foi reprovada no teste por ter ultrapassado o tempo delimitado pela Farmacopéia Brasileira, 5<sup>o</sup> edição.

O uso do ácido esteárico (agente solubilizante) contido nas três amostras (similar, genérico e referência) não favoreceu a desintegração, tendo em vista que os comprimidos similares encontraram-se em desacordo quanto ao tempo especificado pela Farmacopéia Brasileira, diferindo das outras amostras (genérico e referência), que desintegraram no limite de 30 minutos

Segundo Figueiredo (2012), a povidona (agente absorvente) e o amido (agente desintegrante) que por ação higroscópica e propriedades de desintegração respectivamente, auxiliam no processo de decomposição dos comprimidos. No entanto, o uso deste excipiente não apresentou significância isolada, visto que, os comprimidos genéricos e de referência desintegraram em tempo inferior a 15 minutos.

Alguns dos excipientes presentes na formulação do medicamento dipirona 500 mg são o estearato de magnésio, povidona e o dióxido de silício. Esses excipientes não demonstraram alterar as propriedades físico-químicas dos comprimidos analisados.

De acordo com Villanova (2009), a quantidade do lubrificante estearato de magnésio nas formulações permite que a molhabilidade da massa encoberta pelo mesmo seja reduzida. Logo, afetaria o processo de desintegração. No entanto, as três amostras (similar, genérico e referência) dissolveram no tempo descrito pela Farmacopéia.

Segundo Figueiredo (2012), a povidona é um excipiente extremamente higroscópico, fator que auxilia na desintegração de comprimidos. No entanto, não mostrou uma resposta expressiva no processo, visto que a única amostra que o continha, apesar de ter desintegrado em tempo hábil, foi a amostra que mais demorou a desintegrar-se completamente.

De acordo com Fontes (2012), o dióxido de silício, é um agente dessecante que contribui na diminuição higroscópica. O que influenciou conseqüentemente, o processo de desintegração da amostra genérica de dipirona, considerando que era a única amostra que o apresentava.

Já o medicamento Nimesulida apresentou como adjuvantes o lauril sulfato de sódio e o polissorbato, que segundo a literatura específica apresentam interferência no processo de desintegração. A presença de lauril sulfato de sódio apesar de apresentar ação molhante não influenciou nos resultados de desintegração, visto que os intervalos de desintegração entre as amostras foram semelhantes.

Já o polissorbato de sódio pode estar relacionado com a desintegração das

amostras de Nimesulida similar, pois as amostras de comprimidos tanto genérico, quanto referência apresentaram maior tempo para desintegrar.

Segundo Mariano (2015) o estearato de magnésio coadjuvante presente na formulação do Diclofenaco 50 mg, por apresentar característica hidrofóbica pode influenciar na desintegração. Apesar de o mesmo não apresentar valores alterados para tempo de desintegração, foram os comprimidos com maior tempo de desintegração (21'12", 22'15" e 19'00" para os medicamentos similar, genérico e referência, respectivamente).

Quanto à friabilidade, os resultados obtidos encontram-se compilados na tabela 3.

MEDICAMENTOS	SIMILAR	GENÉRICO	REFERÊNCIA
IBUPROFENO	0,098%	0,040%	-
DIPIRONA	0,094%	0,35%	0,25%
NIMESULIDA	1,35 %	0,58%	1,35%
DICLOFENACO	-	-	-

Tabela 3. Resultado do teste de resistência de friabilidade dos comprimidos.

( - ) não se aplica, pois o comprimido em questão é um comprimido revestido.

Fonte: Dados da Pesquisa, 2016

No tocante ao teste de friabilidade, o valor máximo aceitável de perda é até 1,5%. Os resultados obtidos encontram-se dentro desse limite tido como aceitável, apresentando com maior porcentagem de perda o medicamento nimesulida similar e referência (1,35 % em ambos) e 0,58% no medicamento genérico. Essa verificação mostra-se importante, uma vez que determina a resistência mecânica, simula a possível perda de peso durante todo o percurso do fármaco desde indústria até a utilização do mesmo pelo paciente. Um comprimido com alta variação de friabilidade pode provocar perda do princípio ativo, prejudicando a qualidade do medicamento (CORDEIRO; CORDEIRO; SANTOS, 2012).

Segundo Bianchin et al. (2012), as alterações de friabilidade, assim como no aspecto e no peso médio, geram perda da dosagem correta em cada comprimido, comprometendo a eficácia terapêutica do medicamento. Essas variações podem interferir diretamente na aceitabilidade do tratamento pelo paciente, devido à presença de alterações como rachaduras e esfarelamento.

A tabela 4 ilustra os resultados decorrentes do teste de dureza ao qual foram submetidos os medicamentos.

MEDICAMENTOS	SIMILAR	GENÉRICO	REFERÊNCIA
IBUPROFENO	88,30 N	67,97 N	37,10 N
DIPIRONA	89,90 N	65,90 N	87,80 N
NIMESULIDA	43,25 N	61,20 N	24,40 N
DICLOFENACO	59,30 N	64,95 N	78,30 N

Tabela 4. Teste de resistência de dureza dos comprimidos

Fonte: Dados da Pesquisa, 2016

Os comprimidos dos quatro medicamentos apresentaram dureza superior aos 30 N, valor mínimo estabelecido pela ANVISA, o que permite afirmar que os mesmos estão de acordo com os padrões legais.

## 4 | CONCLUSÃO

Os resultados obtidos a partir dos dados em estudo nos permitem concluir que a qualidade dos medicamentos similares não causam prejuízos terapêuticos aos usuários. Fato que aliado ao seu baixo custo pode facilitar a adesão dos pacientes ao tratamento.

## REFERÊNCIAS

ANVISA. **Medicamentos de Referência**. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br/medicamentos/referencia/index.htm](http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/referencia/index.htm)>. Acesso em: 10 jun. 2016.

BARBOSA, A.R.R, SILVA, J. L. S.; SPÓSITO, P. A.; RODRIGUES, H. G. **Perfil do consumo de medicamentos isentos de prescrição em Montes Claros, M. Estudo das reações adversas e toxicológicas**. Revista Digital: Buenos Aires. n 164, 2012.

BIANCHIN, M.D., BLATT, C. R.; SOARES, A. S.; KÜLKAMP-GUERREIRO, I. C. **Avaliação da qualidade de comprimidos de propranolol e enalapril distribuídos no sistema público de saúde em uma cidade do sul do Brasil**. Revista de Ciência & Saúde Coletiva, v. 17 n.2, p.491-498, 2012.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 135, de 13 de maio de 2003**. Dispõe sobre os regulamentos técnicos para medicamentos genéricos. Diário Oficial da União, Brasília, 2003.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 58, de 10 de outubro de 2014**. Dispõe sobre as medidas a serem adotadas junto à Anvisa pelos titulares de registro de medicamentos para a intercambialidade de medicamentos similares com o medicamento de referência. Diário Oficial da União, Brasília, 2014.

CORDEIRO, M.S.F; CORDEIRO, R.P.; SANTOS, R.J. **Análise da Qualidade De Comprimidos de Ácido Acetilsalicílico (Aas) Comercializados em Caruaru-PE**. In: 52º Congresso Brasileiro de Química. Recife, 2012.

FERNANDES, J.A; COUTINHO, J.V; VALLE, M.G. **Aceitação do medicamento genérico em diferentes níveis de escolaridade e renda familiar do distrito federal.** Revista Cenarium Farmacêutico, n 4, p, 1-21, 2011.

FIGUEIREDO, L.P. **Análise de excipientes em comprimidos de fármacos comercializados.** 2012. 168f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós- Graduação em Nanociências e Materiais Avançados da Universidade Federal do ABC. São Paulo, 2012.

ISSI, K. F. **A indústria farmacêutica nacional e a importância dos medicamentos genéricos no seu desenvolvimento.** 2011. 83f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós- Graduação em Economia da Faculdade de Ciências Econômicas de UFRGS. Porto Alegre, 2011.

MARIANO, M.D.C.; NAVES, R. H. B.; FREITAS, T. A.; PINTO, M. V.; FERNANDES, C. K. C.; GONÇALVES JÚNIOR, A. F.; SOUZA, S. A. O. **Controle de qualidade físico-químico de comprimidos de dipirona sódica adquiridos em drogarias de São Luís de Montes Belos (GO).** Revista Faculdade Montes Belos (FMB), v.8, n 1, 2015.

NOVARETTI, M.C.Z; QUITÉRIO, L.M; PISCOPO, M.R. **DESAFIOS NA GESTÃO DE MEDICAMENTOS GENÉRICOS NO BRASIL: DA PRODUÇÃO AO MERCADO CONSUMIDOR.** IN: XXVIII Encontro da ANPAD. Rio de Janeiro. 13 a 17 de Setembro, 2014.

PUGENS, A. M., DONADUZZI, C. M.; MELO, E. B. **Controle de qualidade total e equivalência farmacêutica de três apresentações de captopril.** Revista Eletrônica de Farmácia, v. 5, n. 1, p. 32-45, 2008.

STORPIRTS, S. MARCOLONGO, R.; GASPAROTTO, F. S.; VILANOVA, C.M. **A equivalência farmacêutica no contexto da intercambialidade entre medicamentos genéricos e de referência: bases técnicas e científicas.** Revista Infarma, v.16, n 9-10, 2004.

VIEIRA, F.S; ZUCCHI, P. **Diferenças de preços entre medicamentos genéricos e de referência no Brasil.** Revista de Saúde Pública, v.40, n.3, p.444-9, 2006.

## DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DA SITAGLIPTINA POR CLAE

### **Bruna de Carvalho Mapa**

Universidade Federal de Ouro Preto, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Ouro Preto/MG

### **Jacqueline de Souza**

Universidade Federal de Ouro Preto, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Ouro Preto/MG

### **Iara Devula Tiso Tana**

Universidade Federal de Ouro Preto, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Ouro Preto/MG

### **Débora dos Santos da Silva**

Universidade Federal de Ouro Preto, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Ouro Preto/MG

### **Neila Márcia Silva-Barcellos**

Universidade Federal de Ouro Preto, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Ouro Preto/MG

**RESUMO:** O antidiabético oral (ADO) sitagliptina, um inibidor da dipeptidil peptidase 4, merece destaque entre as outras farmacoterapias do Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) por promover, além do controle glicêmico, baixa incidência de efeitos colaterais e a capacidade de estimular o crescimento das células  $\beta$ -pancreáticas e com isso regressão da doença. Para avaliar a qualidade e prever o comportamento in vivo de fármacos, a avaliação biofarmacêutica é uma

etapa de grande relevância. Neste sentido, a determinação da solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação orbital em frascos tem sua relevância reconhecida por diferentes agências regulatórias. Visando estudar a solubilidade da sitagliptina em diferentes condições de pH, torna-se necessário o desenvolvimento de método analítico adequado. Assim, este trabalho se propôs a desenvolver e validar método para quantificação da sitagliptina por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência para ser aplicado no estudo biofarmacêutico de determinação da solubilidade em equilíbrio.

**ABSTRACT:** The oral antidiabetic (ADO) sitagliptin, an inhibitor of dipeptidyl peptidase 4, is worth mentioning in pharmacotherapies of Type 2 Diabetes Mellitus. It promotes, in addition to glycemic control, a disease regression by stimuli of the growth of  $\beta$ -pancreatic cells, as well as a low incidence of side effects. To evaluate the drug quality and predict its in vivo behavior it is important a biopharmaceutical evaluation. In this sense, the determination of the solubility in equilibrium by the shake-flask method has its relevance recognized by different regulatory agencies. In order to study the solubility of sitagliptin in different pH conditions, it is necessary to develop an adequate analytical method. Thus, this work aimed to develop and validate a method for the

sitagliptin quantification by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) to be applied in the it's equilibrium solubility study.

## 1 | INTRODUÇÃO

O DM2 é uma das doenças de maior prevalência no mundo e as consequências sociais e econômicas devido a esse alto índice, à sua condição crônica, à gravidade de suas complicações e aos custos envolvidos no controle e tratamento apontam o alto ônus dessa patologia (ADA, 2017; IDF, 2015) e a necessidade de terapias eficazes, seguras e apropriadas ao uso a longo prazo (SBD,2017).

Além do manejo nos hábitos alimentares e na prática de atividade física, a terapia medicamentosa é essencial aos pacientes com DM2 (SBD,2017). Nesse sentido a sitagliptina, um representante da classe dos Inibidores da dipeptilpeptidase 4 (IDPP4) vem se destacando dentre as outras farmacoterapias do DM2 por promover, além do controle glicêmico (SCOTT, 2010; RETNAKARAN, 2010; RAZ , 2008; KIM, 2016), baixa incidência de efeitos colaterais (SCHWEIZER et al., 2007) e a capacidade de estimular o crescimento das células  $\beta$ -pancreáticas e com isso (ANSARULLAH et al., 2013) e com isso a possibilidade de regressão da doença.

No entanto, apesar de diversos benefícios associados ao uso da sitagliptina, grande parte da população não dispõe de recursos para ter acesso a esse medicamento, devido a seu alto custo, principalmente quando comparado aos ADOs clássicos.

Para avaliar a qualidade e prever o comportamento in vivo de diferentes medicamentos contendo Sitagliptina, os estudos biofarmacêuticos como solubilidade, permeabilidade e dissolução são uma etapa de grande relevância.

Nesse sentido, método da agitação orbital em frascos visando a determinação da solubilidade em equilíbrio do fármaco, é um dos métodos in vitro que simulam o comportamento in vivo do fármaco e tem sua relevância reconhecida por diferentes agências regulatórias (FDA, 2000; WHO, 2006; EMA, 2010; BRASIL, 2011).

Com o objetivo de contribuir com dados de solubilidade da sitagliptina em condições fisiológicas, torna-se necessário o desenvolvimento de método analítico, adequado a quantificação do analito nesta matriz, devidamente validado conforme todos parâmetros estabelecidos pela legislação vigente.

Foram encontrados na literatura poucos métodos analíticos de quantificação da sitagliptina, em especial por Cromatografia a Líquido de alta eficiência (CLAE) (LANGE, 2014; RAVANELLO, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2016). Esta técnica é realizada a partir de interações seletivas entre o analito, fase estacionária (FE) e fase móvel (FM). As substâncias que apresentam maior afinidade pela FE eluirão mais tardiamente quando comparadas às substâncias que exibirem menor afinidade pela FE (SNYDER, KIRKLAND, GLAJCH, 1973). Por meio dessa técnica é possível obter separação, identificação e quantificação de substâncias de maneira seletiva (SKOOG et al., 2006), o que traz maior confiabilidade aos resultados obtidos.

Neste contexto, um método analítico por CLAE foi desenvolvido e validado para quantificação do fosfato de sitagliptina nos experimentos de solubilidade em equilíbrio, visando contribuir para a previsão do seu comportamento in vivo a partir de dados in vitro (FDA, 2000; WHO, 2006; EMA, 2010; BRASIL, 2011).

## 2 | MATERIAIS

O padrão de referência e a matéria-prima de fosfato de sitagliptina (sitagliptina) foram obtidos da United States Pharmacopoeia (lote F030N0) e Xiamen (lote 123000-160101) respectivamente. Ácido acético glacial (Rio de Janeiro, Brasil), ácido clorídrico (Rio de Janeiro, Brasil), fosfato de potássio monobásico (Diadema, Brasil), acetato de sódio trihidratado (Rio de Janeiro, Brasil), cloreto de sódio (Rio de Janeiro, Brasil) hidróxido de sódio (Rio de Janeiro, Brasil). O grau HPLC de acetonitrila e metanol foram adquiridos à JTBaker (Xalostoc, México). A água obtida a partir de um sistema de purificação Millipore (Darmstadt, Alemanha).

## 3 | MÉTODOS

### 3.1 Desenvolvimento de método por CLAE para quantificação da sitagliptina

#### *Determinação das condições de análise*

Inicialmente foram analisados compêndios oficiais e publicações científicas com objetivo de selecionar métodos analíticos para quantificação por CLAE do fosfato de sitagliptina para serem usadas como referenciais no desenvolvimento do método aplicável à quantificação deste fármaco nos seguintes meios biorrelevantes Fluido gástrico simulado sem enzimas (FGSSE) pH 1,2; Tampão acetato (TA) pH 4,5 e Suco entérico simulado sem enzimas (SESSE) pH 6,8.

Após a determinação dos parâmetros de adequação do sistema cromatográfico nas diferentes condições experimentais foram selecionadas e definidas as condições analíticas que possibilitaram melhores resultados.

Todas as análises foram realizadas utilizando o cromatógrafo a líquido modelo UHPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Science®) com detector UV, coluna cromatográfica Zorbax C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm), da marca Agilent®, com forno na temperatura de 25°C e volume de injeção de 20 µL.

Foram utilizadas diferentes constituições e proporções de fases móveis (FM): Metanol: água; acetonitrila: água; Acetonitrila: Tampão fosfato de potássio (pH 2), nas proporções (50:50, 60:40, 70:30, 85:75 v/v), Acetonitrila: Tampão fosfato de potássio (pH 3), nas mesmas proporções e Acetonitrila: Tampão fosfato de potássio (pH 6,8), nas proporções 70:30 e 68:32. Para definição da fase móvel, foram avaliados o tempo

de retenção e a assimetria do pico do fosfato de sitagliptina. Foram também avaliadas vazões de fase móvel de 1,0 mL/min e 1,2 mL/min.

### *Preparo das soluções Estoque e diluídas e dos meios biorrelevantes*

Para a solução estoque (SE) foi obtida uma concentração 2,5 mg/mL de fosfato de sitagliptina diluída na FM escolhida.

Os seguintes meios tamponados: fluido gástrico simulado sem enzimas (pH 1,2), tampão acetato (pH 4,5) e fluido intestinal simulado sem enzimas (pH 6,8) foram preparados de acordo com a Farmacopeia Americana (United States Pharmacopoeia 37th edition) (USP, 2015).

As soluções diluídas foram preparadas a partir de diluição da SE nos meios biorrelevantes FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e SESSE (pH 6,8), filtradas unidades filtrantes Millex® de 0,45 µm e introduzidas em vials.

## **3.2 Validação do método analítico para quantificação da sitagliptina**

O método analítico foi validado conforme a Resolução RE 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA (BRASIL, 2003c) a qual estabelece a avaliação dos parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e de quantificação (teóricos) e robustez. Para tanto, foi utilizado fosfato de sitagliptina SQR e a determinação realizada em cada um dos três meios biorrelevantes em estudo, em triplicata e para análise dos cálculos foi utilizado o *software Microsoft Excel*® 2016.

### *Seletividade*

As soluções diluídas do fosfato de sitagliptina (150 µg/mL) nos meios biorrelevantes foram expostas ao calor seco (90°C por 24 horas), à hidrólise ácida (ácido clorídrico), e à hidrólise básica (hidróxido de sódio). Foi avaliada a pureza de pico no Cromatógrafo Waters Alliance 2695, com detector DAD.

### *Linearidade*

Para o critério de linearidade foram analisadas as curvas analíticas de 6 concentrações diferentes do fosfato de sitagliptina (50, 70, 90, 110, 130, 150 µg/mL) para cada um dos meios biorrelevantes FGSSE, TA e SESSE.

### *Precisão*

As precisões intracorrída e intercorrída foram avaliadas nos níveis de concentração: baixo, médio e alto (50, 110, 150 µg/mL) no entanto a precisão intrecorrída foi realizada em dois dias seguidos, totalizando 18 determinações. Foi realizado o cálculo do desvio

padrão relativo, o qual deve apresentar valor inferior a 5 % (BRASIL, 2003c).

### *Exatidão*

A exatidão foi determinada medindo-se a recuperação da substância de referência em triplicata, nos níveis de concentração baixo, médio e alto, nos 3 meios biorrelevantes e adotados como critério os resultados contidos entre 98% a 102% (JENKE, 1996; GREEN, 1996).

### *Limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD)*

Os limites de quantificação e detecção foram estimados através do cálculo preconiza RE 899 de 2003 da ANVISA (BRASIL, 2003c). Essa estimativa teve como embasamento a média das inclinações, utilizando os dados das curvas analíticas, e o desvio padrão do intercepto de três curvas analíticas obtidas.

### *Robustez*

A robustez foi avaliada conforme os seguintes fatores: variação na proporção dos constituintes da fase móvel - ACN: Tampão fosfato de potássio (pH 6,8) (67:33; 68:32 e 69:31 v/v), pH da fase móvel (6,7; 6,8; 6,9), e o fluxo da fase móvel (0,9 mL/min; 1 mL/min; 1,1 mL/min).

## **4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Desenvolvimento de método por CLAE para quantificação do fosfato de sitagliptina**

Após pesquisa em compêndios oficiais, somente a Farmacopeia americana (United States Pharmacopeia 39<sup>a</sup> ed., 2016) dispunha de método analítico para quantificação do fosfato de sitagliptina. Outros dois métodos para quantificação por CLAE foram encontrados em artigos científicos (LANGE, 2014; RAVANELLO, 2010). A partir da análise dos métodos encontrados, foram tomados como ponto de partida o volume de injeção de 20 µL e temperatura do forno de 25 °C.

A coluna cromatográfica utilizada em todos os experimentos foi C18 (150 mm x 4,6 mm; 5 µm) – Zorbax Agilent®. O comprimento de onda de 206 nm foi selecionado devido à maior intensidade de absorção em relação à 265nm e fluxo de 1,0 mL/min por mostrar-se mais adequada em função da obtenção de picos com maior tempo de retenção, devido a possibilidade da existência de sinais cromatográficos de eventuais produtos de degradação. Para a seleção da FM foram realizadas tentativas utilizando

componentes e proporções citados no item 3.1, e levando em consideração os valores de assimetria e o tempo gasto para realização das análises, a FM tampão fosfato de potássio pH 6,8 25mM: ACN (68:32v/v) mostrou-se a mais adequada. Os cromatogramas obtidos seguem na figura 1.

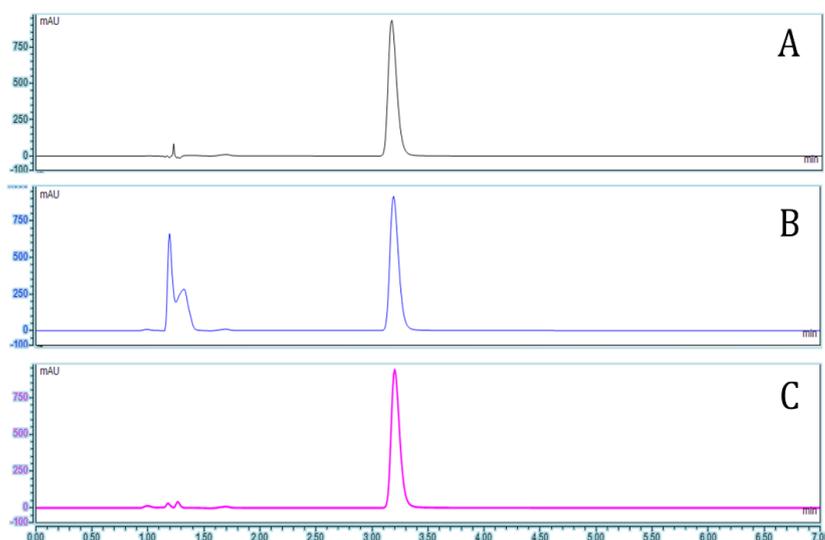


Figura 1 - Cromatogramas obtidos para a solução de fosfato de sitagliptina empregando FM tampão fosfato de potássio pH 6,8:ACN (68:32 v/v), volume de injeção de 20  $\mu$ L, fluxo de 1,0 mL/min e a 206 nm e SE diluída em meios FGSSE (pH 1,2) A, TA (pH 4,5) B e SESSE (pH 6,8).

#### 4.2 Validação do método analítico para quantificação do fosfato de sitagliptina

No Brasil, a validação de métodos analíticos é regida atualmente pela Resolução RDC nº 166, de julho de 2017, que estabelece novos critérios para a validação de métodos analíticos (BRASIL, 2017). A norma revoga a Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, que referenciava o referido assunto (BRASIL, 2003). O artigo 66 desta nova resolução, RDC 166, afirma que as validações de métodos analíticos realizadas conforme a Resolução RE nº 899/2003 serão aceitas, contando que tenham sido concluídas antes da data inicial de vigência da RDC 166. Os experimentos deste trabalho foram realizados baseados na RE nº 899, tendo em vista que a atual resolução não havia sido publicada.

##### *Seletividade*

Os cromatogramas relativos aos resultados da degradação forçada do fosfato de sitagliptina por calor a seco a 90°C, por 24 horas, seguem na figura 2.

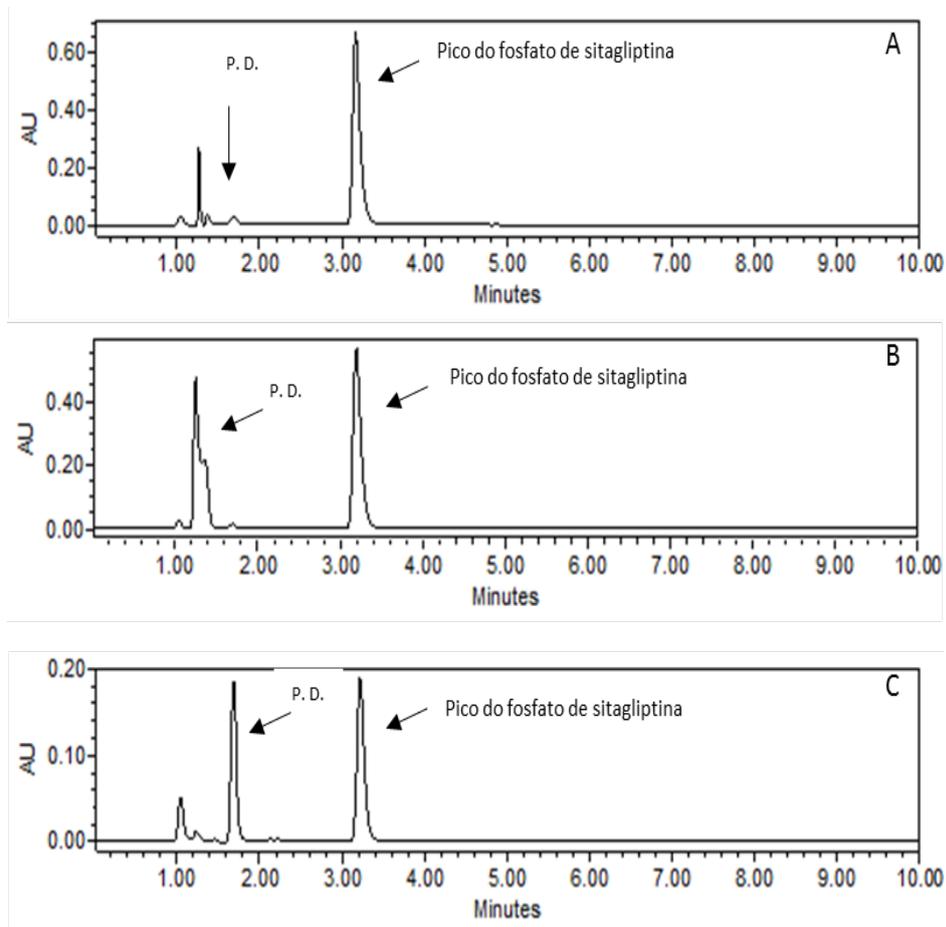


Figura 2 - Cromatogramas obtidos com a solução diluída do fosfato de sitagliptina no meio FGSSE (pH 1,2) A, TA (pH 4,5) B e SESSE (pH 6,8) C após exposição ao calor seco por 24 horas, com os respectivos picos de degradação (P.D.).

Analisando a figura 2, observa-se aparecimento dos picos de degradação nos cromatogramas A, B e C, e redução das áreas referentes aos picos do fosfato de sitagliptina quando comparados com as áreas das amostras recém-preparadas.

Para a hidrólise ácida e básica, não foi possível visualizar os picos de degradação no comprimento de onda selecionado, porém houve redução da área do pico do fármaco. Todas as soluções expostas à degradação foram avaliadas quanto a pureza do pico e os valores obtidos dos ângulos de pureza do fármaco foram inferiores aos ângulos limites em todas as análises. Estes resultados permitem atestar que o método desenvolvido é capaz de separar o pico da sitagliptina de outros sinais relativos aos seus produtos de degradação.

### *Linearidade*

Conforme segue na figura 3, todas as curvas analíticas apresentaram Coeficiente de correlação (R) e Coeficiente de determinação ( $R^2$ ) > 0,99, Portanto, atende ao requisito mínimo de linearidade preconizado pela RE 899 (BRASIL, 2003c).

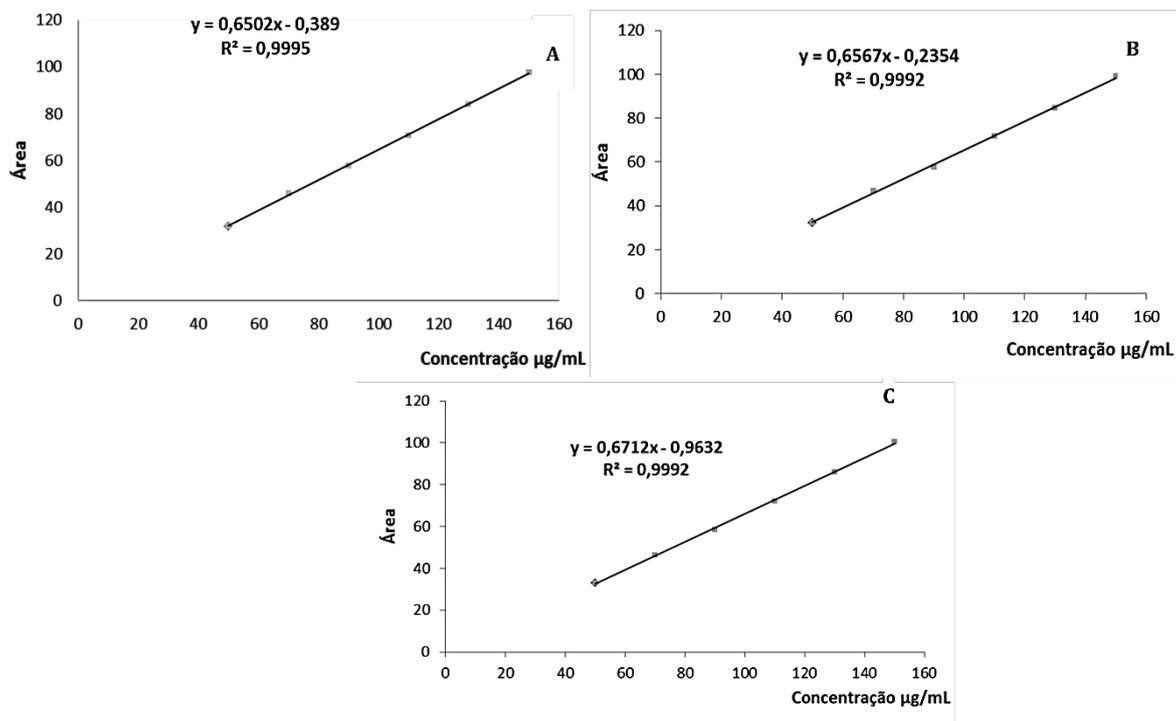


Figura 3 – Gráfico da regressão linear do método para quantificação do fosfato de sitagliptina no meio FGSSE (pH 1,2)A, SESSE (pH4,5)B e TA (pH6,8)C.

A significância da regressão foi avaliada por meio da ANOVA e em todas as análises, os valores de  $F$  calculados foram maiores que os do  $F$  crítico (Tabela I), o que confirma que os modelos são lineares e apropriados para quantificação da sitagliptina nas três matrizes avaliadas e no intervalo de concentração selecionado.

Meio	r	Significância da regressão	
		F calculado	F crítico
FGSSE (pH 1,2)	0,9997	19252,28	4,543
TA (pH 4,5)	0,9995	6123,95	4,600
SESSE (pH 6,8)	0,9997	1250,85	4,543

Tabela I - Coeficiente de correlação (r) e Significância das regressões obtidos nas análises da sitagliptina meios de pH 1,2, pH 4,5 e pH 6,8.

Onde  $F$  corresponde ao coeficiente calculado pela distribuição de Fisher Snedecor.

### Precisão

A precisão, avaliada quanto a repetibilidade e precisão intermediária, apresentou valores de desvio padrão relativo (DPR) entre 0,14% a 3,75% (Tabela II), indicaram concordância com o limite de 5% exigido RE nº 899 (BRASIL, 2003c) e a precisão do método para a faixa de concentração selecionada.

Meio	Concentração (µg/mL)	Precisão		Exatidão		
		Intra-dia 1 (DPR)	Intra-dia 2 (DPR)	Inter-dia (DPR)	Exatidão (%)	DPR
FGSSE pH 1,2	50	2,11	2,61	2,23	99,03	2,11
	110	0,15	2,04	1,42	99,50	0,14
	150	0,57	1,32	0,91	100,41	0,57
TA pH 4,5	50	1,99	0,95	1,41	100,23	1,99
	110	1,19	2,18	1,57	99,56	1,18
	150	1,69	1,44	1,71	100,80	1,69
SESSE pH 6,8	50	1,38	1,50	2,25	101,95	1,38
	110	1,35	3,75	2,62	99,18	1,35
	150	0,81	2,67	2,44	100,80	0,81

Tabela II - Precisão (intra-dia /inter-dia) e exatidão, obtidas nas análises da sitagliptina nos meios de pH 1,2, pH 4,5 e pH 6,8.

### Exatidão

Os resultados de exatidão para o método avaliado permaneceram na faixa de 99,03 a 101,95%, ou seja, dentro da faixa limite estabelecida de 98-102% (JENKE, 1996; GREEN, 1996), e os valores do DPR (%) foram inferiores a 5% (tabela II), portanto o método analítico desenvolvido foi considerado exato.

### Limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD)

Os limites de quantificação e detecção teóricos calculados, a menor concentração na faixa de trabalho foi maior que os valores de LQ apresentados, e as soluções de menores concentrações apresentaram precisão e exatidão aceitáveis (Tabela III).

Meio	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)
FGSSE (pH 1,2)	0,35	1,16
TA (pH 4,5)	2,02	6,75
SESSE (pH 6,8)	3,66	12,22

Tabela III - Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) calculados para o método de quantificação do fosfato de sitagliptina nos meios de pH 1,2, pH 4,5 e pH 6,8.

### Robustez

O método mostrou-se robusto às variações da proporção e pH da FM e susceptível às variações na velocidade de fluxo da FM.

A escolha pelo desenvolvimento e validação do método por CLAE aplicável aos estudos biofarmacêuticos, se deu principalmente, por ser um método que permite além da identificação, a separação e quantificação do fármaco de forma seletiva (SKOOG et al., 2006), o que traz maior confiabilidade aos resultados obtidos.

Conforme todos os resultados descritos, os parâmetros seletividade, linearidade,

intervalo, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez estabelecidos pela resolução 899 da ANVISA - guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos (BRASIL, 2003) foram cumpridos.

## 5 | CONCLUSÃO

O método analítico para quantificação da sitagliptina em meios biorrelevantes foi desenvolvido e validado, mostrou-se adequado na faixa de concentração de 50 a 150 µg/mL, para ser aplicado ao estudo da solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação orbital em frascos

## AGRADECIMENTOS

PPG-CIPHARMA, UFOP, EFAR, FAPEMIG, O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

## REFERÊNCIAS

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). **Pharmacologic approaches to glycemic treatment**. Diabetes Care, v. 40, p. S64 - S74, 2017.

ANSARULLAH LU Y, HOLSTEIN M, DERUYTER B, RABINOVITCH A, GUO Z. **Stimulating  $\beta$ -cell regeneration by combining a GPR119 agonist with a DPP-IV inhibitor**. PLoS One, v. 8(1), p. 53345, 2013.

BETHEL M. A, SAMUEL S. ENGEL, JENNIFER B. GREEN, ZHEN HUANG, ROBERT G. JOSSE, KEITH D. KAUFMAN, EBERHARD STANDL, SHAILAJA SURYAWANSHI, FRANS VAN DE WERF, DARREN K. MCGUIRE, ERIC D. PETERSON, RURY R. HOLMAN. **Assessing the Safety of Sitagliptin in Older Participants in the Trial Evaluating Cardiovascular Outcomes With Sitagliptin (TECOS)**. Diabetes Care, dc161135, p. 1-8, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 899, de 29 de maio de 2003. “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”**. Diário Oficial da União, Brasília, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC n. 166 de 25 de julho de 2017 que estabelece novos critérios para a validação de métodos analíticos**. Diário Oficial da União, Brasília, 2017. Disponível em: <https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>, acesso em janeiro de 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Resolução RDC Nº 37, de 3 de agosto de 2011. “Dispõe sobre o Guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência e dá outras providências”**. Diário Oficial da União. Brasília, 2011. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis>. Acesso em: 01 de dezembro de 2018.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for industry: waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms base on biopharmaceutics classification system** FDA, 1-13, 2000.

GREEN, J. M. **Practical Guide to Analytical Method Validation**. Analytical Chemistry, v. 68, p. 305A-309A, 1996.

GREEN J B, BETHEL MA, ARMSTRONG P W, BUSE J B, ENGEL S S, GARG J, JOSSE R, KAUFMAN K D, KOGLIN J, KORN S, LACHIN J M, MCGUIRE D K, PENCINA M J, STANDLE, STEIN P P, SURYAWANSHI S, WERF F V, PETERSON E D, HOLMAN R R. **Effect of Sitagliptin on Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes**. The New England Journal of Medicine, v. 373, p. 232-242, 2015.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF). **Diabetes Atlas**. Sétima Edição, 2015. Disponível em <http://www.diabetesatlas.org/>. Acesso em 10 fevereiro de 2019.

JENKE D R. **Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures**. II Guidelines for primary parameters. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, v. 19, n. 5, p. 737-757, 1996.

KIM S S, KIM I J, LEE K J, PARK J H, KIM Y I, LEE Y S, CHUNG S C, LEE S J. **Efficacy and safety of sitagliptin/metformin fixed-dose combination compared with glimepiride in patients with type 2 diabetes: A multicenter randomized double-blind study**. Journal of Diabetes, v. 9, p. 412-422, 2016.

LANGE C, BATISTEL A P, SFAIR L L, CARLOSSO J, VOLPATO N M, SCHAPOVAL E E S. **Sitagliptin phosphate: development of a dissolution method for coated tablets based on in vivo data for improving medium sensitivity**. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Dissolution Technologies, p. 17-22, 2014.

RAVANELLO A. **Desenvolvimento e Validação de metodologia para avaliação do fosfato de sitagliptina**. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2010.

RAZ I, CHEN Y, WU M, HUSSAIN S, KAUFMAN KD, AMATRUDA JM, LANGDON RB, STEIN PP, ALBA M. **Efficacy and safety of sitagliptin added to ongoing metformin therapy in patients with type 2 diabetes**. Journal Current Medical Research and Opinion, v. 24(2), p. 537-50, 2008.

RETNAKARAN R, QI Y, OPSTEEN C, VIVERO E, ZINMAN B. **Initial short-term intensive insulin therapy as a strategy for evaluating the preservation of beta-cell function with oral antidiabetic medications: a pilot study with sitagliptin**. Diabetes, Obesity and Metabolism, v. 12(10), p. 909-15, 2010.

SCHWEIZER A, COUTURIER A, FOLEY J E, DEJAGER S. **Comparison between vildagliptin and metformin to sustain reductions in HbA1c over 1 year in drug-naïve patients with Type 2 diabetes**. Diabetic Medicine, v. 24, p. 955–961, 2007.

SCOTT R, WU M, SANCHEZ M, STEIN P. **Efficacy and tolerability of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin as monotherapy over 12 weeks in patients with type 2 diabetes**. Expert Opinion Drug Metabolism Toxicology, v. 6, p. 1265-76, 2010.

SKOOG, D. A. *et al.* **Fundamentos de Química Analítica**. São Paulo - SP: Editora Thomson, 2006.

SNYDER, Lloyd R.; KIRKLAND, Joseph J.; GLAJCH, Joseph L. **Practical HPLC Method Development**. 2a ed. Estados Unidos da América: John Wiley & Sons, 542-3. 1973.

Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD). **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018**. São Paulo, Editora Clannad, 2017. Disponível em: <https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/2017/diretrizes/diretrizes-sbd-2017-2018.pdf>. Acesso em: fevereiro de 2019.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA THE NATIONAL FORMULARY, **USP 37<sup>a</sup> ed**, 2015.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA THE NATIONAL FORMULARY, **USP 39<sup>a</sup> ed.**, p. 5852, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Proposal to waive in vivo bioequivalence requirements for WHO Model List of Essential Medicines immediate-release, solid oral dosage forms.** Technical Report Series, No 937, 40th Report, Annex 8 of WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations, 2006. Disponível em: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s19640en/s19640en.pdf>, acesso em: dezembro de 2018.

## DETECÇÃO, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE DERMATÓFITOS EM UTENSÍLIOS DE CENTROS DE ESTÉTICA DA CIDADE DE MACEIÓ, ALAGOAS

**Bárbara Letícia Figueiredo Fonseca**

Centro Universitário CESMAC, Alagoas

**Marcus Vinícius de Andrade Silveir**

Centro Universitário CESMAC, Alagoas

**Caroline Fernanda Andrade Gomes**

Centro Universitário CESMAC, Alagoas

**Camila Neves de Melo Cavalcanti**

Centro Universitário CESMAC, Alagoas

**Aryanna Kelly Pinheiro Souza**

Centro Universitário CESMAC, Alagoas

**Gabriela Souto Vieira de Mello**

Centro Universitário CESMAC, Alagoas

**Marina Valdez dos Santos**

Universidade Federal de Alagoas (UFAL)

**Ana Paula de Almeida Portela da Silva**

Universidade Federal de Alagoas (UFAL)

Esses fungos também são classificados conforme o seu *habitat* natural/primário como: zoofílicos, geofílicos e antropofílicos. Atualmente, cerca de 30 espécies de dermatófitos já foram identificadas dentre os patógenos humanos. As espécies que se constituem como zoofílicas são responsáveis por 30% das dermatofitoses humanas, enquanto os outros 70% correspondem às espécies antropofílicas que provocam uma doença de evolução lenta e progressiva. (WHITE *et al.*, 2008; PERES *et al.*, 2010)

A transmissão das dermatofitoses ocorre por contato direto, através de animais e humanos infectados, ou por contato indireto por meio de fômites. As formas clínicas variam de acordo com o agente etiológico e o sítio anatômico acometido, logo, elas podem ser brandas ou severas, dependendo do estado imunológico do hospedeiro. Felizmente, na maior parte dos casos não ocorre invasão de tecidos subcutâneos ou órgãos internos. As lesões nas infecções de pele são características e apresentam-se de fundo claro com bordas eritematosas e altamente pruriginosas, sendo assim consequentes da ação direta do fungo ou de reações de hipersensibilidade ao microrganismo e/ou a seus produtos metabólicos (GHISI & SANTIN, 2011).

### 1 | INTRODUÇÃO

As micoses cutâneas estão entre as infecções fúngicas mais comuns, tendo como principais causadores os agentes filamentosos queratinofílicos, ou seja, aqueles que utilizam a queratina como nutriente durante a infecção de pele, cabelos e unhas. Esses fungos são denominados dermatófitos e estão classificados em três gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, de acordo com a formação e morfologia de suas estruturas reprodutivas.

Dados da Organização Mundial de Saúde mostram que as dermatofitoses afetam cerca de 25% da população mundial. Costumam ser mais comuns em países de clima quente e úmido, sendo que os de clima tropical e subtropical são os mais afetados. Acredita-se que o elevado crescimento do número de infecções fúngicas é devido ao grande número de pacientes imunossuprimidos e em uso de antibióticos indiscriminadamente (PERES,2010; SBD, 2018).

A onicomicose é uma das dermatofitoses mais frequentes, com uma prevalência variando de 7 a 10 %, sendo responsável por 15 a 40 % das alterações ungueais. Podem ser causadas por vários agentes, dentre eles: dermatófitos e leveduras - com destaque para o gênero *Candida*; assim como pelos fungos filamentosos não dermatófitos, evidenciados principalmente pelos gêneros *Aspergillus* e *Fusarium*. O diagnóstico é feito pela realização do exame micológico (microscópico direto e cultura) e o sucesso do tratamento vai depender do diagnóstico etiológico correto (GRUPTA, 2005; LIMA, 2007; SOUZA et al., 2014; MONTARIN et al., 2015).

Segundo a Sociedade Brasileira de Dermatologia, nas infecções de unha pode ocorrer o descolamento das bordas (sua forma mais frequente), o espessamento da região, o aparecimento de manchas branco-amareladas e a distrofia das unhas. Amicose faz com que a unha venha a adquirir um aspecto grosso, chamado popularmente de “unha de telha” ou “unha de gavião”. Embora as infecções causadas por dermatófitos sejam geralmente restritas às regiões superficiais da epiderme, esses fungos podem comportar-se de maneira invasiva, ocasionando infecção profunda e disseminada em pacientes imunocomprometidos. Além disso, alguns fatores de risco vêm sendo associados às onicomicoses, como idade, anomalias morfológicas nas unhas, fatores genéticos, condições de higiene inadequadas e algumas doenças como diabetes mellitus e quadros de imunodeficiência (RODWELL et al., 2008; PERES, 2010; SBD, 2018).

Diante da prevalência de onicomicoses e da possibilidade de transmissão via objetos contaminados, o objetivo deste trabalho foi avaliar a possibilidade de transmissão de fungos dermatófitos a partir de utensílios de centros de estética. Assim, com a visão de alertar e enfatizar a importância da esterilização adequada de fômites para evitar a transmissão de microrganismos potencialmente patogênicos, esta pesquisa vem aplicar a promoção de saúde nesses estabelecimentos, localizados em diferentes bairros da cidade de Maceió, Alagoas.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada com base em revisão bibliográfica, a respeito do tema, além da coleta de materiais e análises laboratoriais, conforme discriminado a seguir:

LOCAL DE EXECUÇÃO: o trabalho foi desenvolvido no laboratório multidisciplinar do Centro Universitário Cesmac, Campus I, Maceió/AL, sob as exigências da Comissão

de Biossegurança da Instituição.

LOCAIS DE COLETA DE AMOSTRAS: as amostras foram coletadas aleatoriamente em centros de estética localizados nos bairros do Jacintinho, Farol e Ponta Verde, da cidade de Maceió, Alagoas e então, trazidas para o laboratório para realização de procedimentos laboratoriais. Os nomes dos estabelecimentos foram mantidos em sigilo.

OBTENÇÃO DE AMOSTRAS: as amostras foram obtidas por meio de coleta com Swab (umedecido em solução salina a 0,9%) da superfície da tesoura, do alicate ou do espaçador de unha. Em seguida, o material foi trazido para o laboratório, onde se procedeu o isolamento.

ISOLAMENTO DE DERMATÓFITOS: o material foi transferido para tubos de ensaio contendo o caldo Sabouraud/Dextrose, onde ficou em repouso por 48 horas na estufa de crescimento à 37 °C. Passado esse período, a solução resultante passou por diluições sucessivas (até 10<sup>-3</sup>) e então, cada diluição foi semeada em placa de Petri contendo meio Sabouraud, com adição de ácido tartárico a 10% . As placas foram incubadas a 25±1°C, durante 7 dias. As colônias fúngicas foram detectadas e também transferidas para tubos de ensaio contendo meio Sabouraud para identificação (GHISI & SANTIN, 2011). Todo o experimento foi realizado com cinco repetições.

IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS: os isolados fúngicos foram identificados por meio de análise macroscópica (diâmetro, aspecto e coloração da colônia) e análise microscópica (observação de estruturas vegetativas e reprodutivas), com auxílio de chaves de identificação e confirmação de especialista.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

As coletas foram realizadas nos salões localizados nos bairros do Jacintinho (A e B), Farol (C e D) e Ponta Verde (E e F). Em cada local, foram coletadas três amostras dos seguintes utensílios: tesoura (amostra 1), alicate(amostra 2) e espaçador(amostra 3).

Após a coleta, o material foi imerso em um caldo nutritivo, a fim de auxiliar o processo de crescimento e revigoramento dos microrganismos presentes. A partir da análise do material obtido nas coletas foram detectados fungos dos gêneros: *Monillia*; *Aspergillus*; *Mycelia sterilia*; *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Acremonium*, *Penicillium* e *Microsporum* (Tabela 1) que possuem um potencial para causar onicomicoses.

Bairro	Tesoura	Alicate	Espaçador
<b>Jacintinho</b>			
<b>SALÃO A</b>	<i>Monillia</i>	<i>Penicillium</i>	-
<b>SALÃO B</b>	<i>Geotrichum</i> <i>Penicillium</i>	<i>Acremonium</i> <i>Penicillium</i>	<i>Mycellia sterillia</i>

TABELA 1. Fungos isolados de amostras coletadas de estabelecimentos no Bairro Jacintinho,

Bairro Farol	Tesoura	Alicate	Espaçador
<b>SALÃO C</b>	<i>Monillia sp</i> <i>Cladosporium</i> <i>cladosporioides</i>	<i>Aspergillus sp</i> <i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i> <i>Aspergillus</i>
<b>SALÃO D</b>	<i>Cladosporium</i> <i>cladosporioides</i>	<i>Aspergillus niger</i> <i>Monillia</i>	<i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i>

TABELA 2. Fungos isolados de amostras coletadas de estabelecimentos no Bairro Farol, Maceió, Alagoas.

Bairro Ponta Verde	Tesoura	Alicate	Espaçador
<b>SALÃO E</b>	<i>Mycelia sterilia</i>	<i>Cladosporium</i> <i>cladosporioides</i> <i>Penicillium</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<b>SALÃO F</b>	<i>Microsporium</i> <i>spp</i>	<i>Geotrichum</i>	<i>Mycelia sterilia</i>

TABELA 3. Fungos isolados de amostras coletadas de estabelecimentos no Bairro Ponta Verde, Maceió, Alagoas.

A distribuição dos agentes etiológicos coletados nas amostras foi disposta da seguinte forma: fungos filamentosos não dermatófitos com 60,86% (42/69), as leveduras com 17,39% (12/69), dermatófitos com 4,34% (3/69) e os fungos mitospóricos da classe *agnomycetes* com 17,39%(12/69) . Vale a pena ressaltar que através das diluições foram isolados 69 espécies de fungos, sendo que desses, apenas 3 são pertencentes ao gênero *Microsporium spp.*, capaz de causar de onicomicoses.

Dentre os fungos filamentosos não dermatófitos a espécie *Penicillium sp* liderou a maior parte das amostras com 28,57%(12/42), enquanto as demais tiveram *Aspergillus niger* com 16,66%(7/42), *Acremonium* com 11,9%(5/42), *Cladosporium sp* com 21,42%(9/42) e *Aspergillus sp* com 14,28%(6/42) .

Enquanto as leveduras pertenciam: 50% a espécie *Monillia sp* (6/12) e 50% a espécie *Geotrichum sp* (6/12). Já os fungos mitospóricos tiveram 100% do gênero *Mycelia sterilia* (12/12).

Dentre os fungos dermatófitos, 100% foram do gênero *Microsporium* (3/3).

Tipo de fungo	Número encontrado	% em relação ao total do grupo
<b>Leveduras</b>		
<i>Monillia</i>	6	50%
<i>Geotrichum sp</i>	6	50%
<b>Dermatófitos</b>		
<i>Microsporium spp</i>	3	100%
<b>Fungos filamentosos não dermatófitos</b>		
<i>Cladosporium sp</i>	9	21,42%
<i>Aspergillus niger</i>	7	16,66%

<i>Acremonium</i>	5	11,90%
<i>Aspergillus sp</i>	6	14,28%
<i>Penicillium</i>	12	28,57%
<b>Fungos mitospóricos</b>		
<i>Mycelia sterilia</i>	12	100,00%

TABELA 4. Fungos isolados de amostras coletadas e seu percentual de acordo com os seus respectivos grupos.

Os resultados demonstram que a presença de um fungo após o isolamento, sendo ele não-dermatófito ou uma levedura, pode ser resultado de contaminação ambiental, oriundo da manipulação das amostras, contudo, também podem ser agentes de uma infecção existente. Os testes de visualização direta positiva desses fungos filamentosos não-dermatófitos bem como do seu número de colônias são confiáveis e auxiliam na orientação do resultado. Apesar das dermatomicoses serem ainda raras nesses grupos, elas podem acontecer, e sua incidência é de importância clínica e epidemiológica.

As infecções causadas por leveduras estão associadas com regiões cutâneas, paroníquias e oníquias. O fungo *Monillia (Candida albicans)* geralmente está associado a onicólise das unhas das mãos em pacientes portadores de doença vascular periférica e Síndrome de Cushing. Apresenta-se com infecções cutâneas, paroníquias e candidíase mucocutânea, sendo muitas vezes considerada infecção secundária. No gênero *Geotrichum sp.* pode-se visualizar hifas são hialinas, septadas e ramificadas, que confunde-se muitas vezes com o fungo dermatófito *Trichosporon*,

Já o fungo *Mycelia sterilia* possui manifestações alérgicas induzidas pela inalação de alérgenos e pode provocar feo-hifomicose subcutânea. O gênero *Aspergillus* encontra-se isolado com frequência em onicomioses podais. A espécie *Cladosporium cladosporioides* geralmente se reserva a sintomas pulmonares. O gênero *Penicillium sp* não é comumente apontado como causa de doença em humanos, exceto em raros casos em que há circunstâncias atenuantes, como pessoas com sistemas imunológicos severamente suprimidos, como aqueles com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), muito embora pode-se encontrá-lo diante de uma infecção ungueal direta. O *Acremonium sp* está associado com infecções supurativas e granulomatosas crônicas que têm em comum a formação de fístulas cutâneas e subcutâneas.

E por fim, o gênero *Microsporum* é encontrado em cães, mas podem provocar a tinea corporis, que caracteriza-se por lesões em regiões que não possuem pelos acometendo, dessa forma, somente o extrato córneo e manifesta-se com: descamação entre os dedos, prurido e ardência.

#### 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do trabalho exposto, se conclui através dos resultados obtidos, que existe a

possibilidade de transmissão de fungos potencialmente causadores de onicomicoses, a partir de fômites utilizados em centros de estética, podendo ser devido à esterilização inadequada dos mesmos, bem como o seu uso inadequado.

Recomenda-se assim, uma melhor orientação aos profissionais do ramo de estética para minimizar assim, a frequência de onicomicoses e o uso de antifúngicos. Mesmo sendo uma incidência ainda não tão alta, a descrição de novas espécies emergentes, é uma realidade, o que se fazem necessários estudos mais aprofundados sobre essa problemática para compreender a prevalência e se dar maior importância a esse tipo de infecção.

## 5 | AGRADECIMENTOS

Agradecimentos sinceros ao Centro Universitário CESMAC por apoiar a causa, à professora Ariana pela ajuda com a visualização das lâminas e ao PIBIC do Programa Semente de Iniciação Científica por financiar todo o projeto. Esse capítulo é obra de todos.

## REFERÊNCIAS

GHISI, J.; SANTIN, N.C. Avaliação do possível crescimento de fungos em amostras de lixas de unha metálicas coletadas em centros de estética e residências do município de Campos Novos, SC. **Unoesc & Ciência**, 2(1):31-38, 2011.

GRUPTA, I.A. The incremental diagnosis of onychomycosis. **Journal American Academic Dermatology**, 52(3):495, 2005.

LIMA, K.M.; RÊGO, R.S.M.; MONTENEGRO, F. **Diagnósticos clínicos e laboratoriais das onicomicoses**. New Labs, 83 ed., 2007. Disponível em: [http://www.newslab.com.br/ed\\_anteriores/83/art02.pdf](http://www.newslab.com.br/ed_anteriores/83/art02.pdf)>. Acesso em: 14 junho 2015.

MONTARIN et al., 2015; Evolution of endemism on a young tropical mountain. **Nature**, 524:347-350, 2015.

PERES, N.T.A.; MARANHÃO, F.C.A.; ROSSI, A., MARTINEZ-ROSSI, N.M. Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 85(5):657-667, 2010.

Montarin et al., 2015.

RODWELL, G.E.; BAYLES, C.L.; TOWERSEY, L.; ALY, P. The prevalence of dermatophyte infection in patients infected with human immunodeficiency virus. **International Journal of Dermatology**, 47:339-343, 2008.

SOUZA, T.S.; PAULA, N.C.R.; SOUTO, R.C.F. Prevalência de micoses superficiais diagnosticadas em um laboratório de análises clínicas em Goiânia, Goiás. **Estudos**, 41(4):855-868, 2014.

WHITE, T.C.; OLIVER, B.G.; GRASER, Y.; HENN, M.R. Generating and testing molecular hypothesis in the dermatophytes. **Eukaryot Cell**, 7:1238-1245, 2008.

## DIVERSIDADE GENÉTICA DOS PAPILOMAVÍRUS HUMANOS DE ALTO RISCO 16, 53 E 66 EM ALAGOAS, BRASIL

### **Karwhory Wallas Lins da Silva**

Centro Universitário Cesmac  
Maceió – Alagoas

### **Márcia Adriana Pessoa de Oliveira Esteves**

Centro Universitário Cesmac  
Maceió – Alagoas

### **Sâmea Keise de Oliveira Silva**

Centro Universitário Cesmac  
Maceió – Alagoas

### **Velber Xavier Nascimento**

Centro Universitário Cesmac  
Maceió – Alagoas

**RESUMO:** O câncer do colo do útero é o segundo mais comum no mundo e o Papilomavírus Humano (HPV) está presente em 99% dos casos. O estudo de variantes moleculares assume grande importância, uma vez que dados epidemiológicos e moleculares sugerem que variantes de alguns tipos de HPV podem apresentar risco patogênico diferenciado. Buscou-se identificar a variabilidade genética do gene L1 do HPV-16, -53 e -66 em amostras oriundas de Alagoas. Foram obtidas vinte e quatro amostras de HPV provenientes de esfregaços cervicais de mulheres com diagnóstico positivo para HPV atendidas em um Hospital Universitário de Alagoas. Destas, dez isolados foram de HPV-

16, seis de -53 e oito de -66. Foi amplificado um trecho hipervariável do gene L1 do HPV, utilizando 35 ciclos de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Todos os 24 isolados de HPV-16, -53 e -66 previamente genotipados por *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)*, tiveram os tipos virais confirmados pelo sequenciamento do fragmento da região L1. Foram identificados dois variantes, sendo um do HPV-53 e um do HPV-66. Em relação ao HPV-53, o variante foi identificado em quatro das seis amostras analisadas. Em relação ao HPV-66, o variante esteve presente nos oito isolados analisados. Os três agrupamentos distintos formados pelos isolados de HPV-16, -53 e -66, mostraram valores significativos de *bootstrap*, 91%, 99% e 100%, respectivamente. A presença de variantes HPV-53 e -66 em Alagoas sugere a realização de estudos mais abrangentes entre a expressão de proteínas e sua associação com o possível efeito clínico.

**PALAVRAS-CHAVE:** Papillomaviridae. Gene L1. Neoplasias do colo do útero. Filogenia.

**ABSTRACT:** Cervical cancer is the second most common in the world and the human papillomavirus (HPV) is present in 99% of cases. The study of molecular variants assumes great importance, since epidemiological and molecular data suggest that variants of some types of HPV can introduce pathogenic risk. We

sought to identify the genetic variability of gene L1 of HPV-16,-53 and 66-in samples from Alagoas. Have been obtained twenty-four samples of HPV cervical smears from women with positive HPV diagnosis met in a University Hospital in Alagoas. Of these, ten were isolates of HPV-16, six-and eight of 53-66. Was amplified an excerpt hipervariável HPV L1 gene, using 35 cycles for polymerase chain reaction (PCR). All the 24 isolates of HPV-16,-53 and 66-genotipados by Restriction Fragment Length previously Polymorphism (RFLP), had confirmed viral types by sequencing of the fragment of the region L1. Two variants were identified, being one of the HPV-53 and one of the HPV-66. In relation to HPV-53, the variant was identified in four of the six samples analysed. In relation to HPV-66, the variant was present in the eight isolates examined. The three distinct groupings formed by isolates of HPV-16,-53-66, and showed significant bootstrap values, 91%, 99% and 100%, respectively. The presents of HPV variants-53 e-66 in Alagoas suggests broader studies between protein expression and your association with the possible clinical effect.

**KEYWORDS:** Papillomaviridae. L1 Gene. Cervix Neoplasias. Phylogeny.

## 1 | INTRODUÇÃO

O câncer do colo do útero é o segundo tipo de câncer mais comum no mundo, e o Papilomavírus Humano (HPV) está presente em 99% dos casos. A persistência viral por HPV de alto risco é considerada a principal causa para desenvolvimento deste câncer (IARC, 2006; BOUVARD et al., 2009).

Estima-se que existam mais de 200 tipos de HPV, sendo apenas 110 descritos até o momento. Entre cerca de 50 tipos de HPV que infectam os humanos, a *International Agency for Research on Cancer (IARC)* classificou 13 tipos como carcinogênicos, uma vez que eles estão associados epidemiologicamente ao desenvolvimento de câncer anogenital (HPV-16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, e -66) (IARC, 2006).

A taxonomia do HPV é baseada na sequência nucleotídica do gene L1 (BERNARD et al., 2006). Estudos filogenéticos mostraram que os papilomavírus podem ser agrupados dentro de gênero, espécies, tipos, subtipos e variantes (DE VILLIERS et al., 2004). Os HPV que infectam humanos pertencem ao gênero *Alpha-papillomavirus*, que estão associados a lesões mucosas e cutâneas em humanos e primatas, ainda podendo ser classificados em alto e baixo risco oncogênico. Essa classificação é baseada na frequência em lesões neoplásicas e no potencial de invasão do epitélio infectado. Os HPV de alto risco oncogênico estão associados a neoplasias intraepiteliais cervicais e ao carcinoma invasor. Enquanto os HPV de baixo risco são encontrados mais comumente em lesões benignas, como papilomas e verrugas simples, principalmente em condilomas (SILVA; AMARAL; CRUZ, 2003; IARC, 2006).

Os variantes são reconhecidos quando diferem menos que 2% na sequência das regiões codificadoras E6, E7, L1 e L2 e até 5% na região não codificadora *Long*

*Control Region (LCR)* (BERNARD et al., 1994; DE VILLIERS et al., 2004). O estudo de variantes moleculares assume atualmente grande importância, uma vez que dados epidemiológicos e moleculares sugerem que variantes de alguns tipos de HPV são biologicamente distintos e podem apresentar risco patogênico diferenciado (DE BOER et al., 2005; BERNARD et al., 2006; SICHERO et al., 2007). Além disso, a associação do HPV com neoplasias benignas e malignas tem levado a uma intensa pesquisa para compreender o impacto da diversidade genética desses vírus na carcinogênese, de modo que o diagnóstico, tratamento e controle das infecções possam ser otimizados.

Os tipos de HPV de alto risco envolvidos na carcinogênese anogenital estão classificados dentro de três grupos filogenéticos, denominados “Espécie”, dois dos quais estão associados com o HPV-16 e HPV-18 (Espécie 9 e 7, respectivamente), e o terceiro que inclui tipos pouco estudados, HPV-30, -53, -56 e -66 (Espécie de HPV 6) (DE VILLIERS et al., 2004). De acordo com Prado et al., (2005), é necessário investigar se os modelos de diversificação intra-tipos de HPV, construída em grande parte, sob os paradigmas do HPV-16 e -18, possivelmente apoiado pelo HPV-31 e -35, seria aplicável a todos os HPV genitais. Além disso, é importante o estabelecimento de uma base de dados para o futuro, envolvendo estudos epidemiológicos, etiológicos, farmacêuticos e de vacinação, com intuito de entender melhor como a diversidade genética afeta a oncogenicidade viral.

O presente estudo teve como objetivo identificar a variabilidade genética do gene do capsídeo viral L1 dos HPV-16, -53 e -66 em amostras de Alagoas, Brasil.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Amostras clínicas

As amostras incluídas no estudo foram obtidas de esfregaços cervicais de mulheres com diagnóstico citomorfológico e/ou histopatológico positivo para HPV, atendidas no Hospital Universitário, em Maceió, Alagoas. A coleta foi realizada com uma escova ginecológica, e em seguida a amostra foi estocada em uma solução tampão (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8). O DNA genômico foi extraído utilizando o *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) de acordo com as instruções dos fabricantes.

### 2.2 Amplificação da região L1 com *primers* degenerados e genotipagem viral

Fragmentos de cerca de 450pb do gene L1 de dez isolados de HPV-16, seis de HPV-53 e oito de HPV-66, foram amplificados com os *primers* degenerados MY09 e MY11 (Bernard et al., 1994). A reação de PCR continha 1  $\mu$ M de cada *primer*, 0,2mM de cada DNTP, 3mM de MgCl<sub>2</sub>, 20mM de tampão (pH 8), 1U de Taq DNA Polimerase (Ludwig Biotec, Rio Grande do Sul, Brasil) e 40ng de DNA. Trinta e cinco ciclos foram

executados na MJ Research PTC-100 Thermocycler com 94°C de desnaturação (30 segundos), 55°C de pareamento (60 segundos), 72°C de extensão (60 segundos) e ainda uma extensão final por 10 minutos. Os amplicons produzidos pela PCR foram analisados em gel de agarose 1,2%, em seguida, os que apresentaram o tamanho esperado foram analisados por *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)* para identificação do tipo viral (BERNARD et al., 1994).

### 2.3 Análise dos variantes de HPV

Os produtos de PCR de tamanho esperado foram automaticamente sequenciados no sequenciador Megabace System 500 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) usando o Kit DYEnamic™ ET Dye Terminator (MegaBACE™ Amersham Pharmacia Biotech), sendo obtidas as duas sequências de DNA, senso e anti-senso. As amostras foram sequenciadas diretamente sem haver necessidade de clonagem.

As sequências foram comparadas em relação à diversidade genética com outras sequências depositadas no *GenBank* e com as sequências de referência de cada tipo viral: HPV-16 (Nº de acesso: U31794), -53 (Nº de acesso: X74482) e -66 (Nº de acesso: K02718). As sequências foram alinhadas utilizando a ferramenta Blast (*basic local alignment search tool*) (Altschul et al., 1997) seguida pelo alinhador múltiplo CLUSTALW (THOMPSON et al., 1994).

Para identificação de mutações no HPV-16, -53 e -66, as sequências foram comparadas com outras já descritas na literatura e disponíveis no *GenBank* (WHEELER et al., 1997; CERQUEIRA et al., 2003; PRADO et al., 2005). Todas as sequências foram depositadas no GenBank, com os seguintes números de acesso: HQ437997 (isolado Mac-215); HQ437998 (isolado Mac-223); HQ437999 (isolado Mac-225); HQ438000 (isolado Mac-253); HQ438001 (isolado Mac-261); HQ438002 (isolado Mac-263); HQ438003 (isolado Mac-274); HQ438004 (isolado Mac-284); HQ438005 (isolado Mac-297); HQ438006 (isolado Mac-339); HQ438007 (isolado Mac-208); HQ438008 (isolado Mac-271); HQ438009 (isolado Mac-272); HQ438010 (isolado Mac-277); HQ438011 (isolado Mac-291); HQ438012 (isolado Mac-307); HQ438013 (isolado Mac-321); HQ438014 (isolado Mac-332); HQ438015 (isolado Mac-173); HQ438016 (isolado Mac-203); HQ438017 (isolado Mac-222); HQ438018 (isolado Mac-266); HQ438019 (isolado Mac-309); HQ438020 (isolado Mac-360).

### 2.4 Análise Filogenética

Árvores filogenéticas foram construídas utilizando sequências de 205pb da região L1 obtidas neste estudo com sequências de outras partes do mundo anteriormente analisadas e disponíveis no *GenBank*. Para construção das árvores, foram utilizadas no total 64 sequências, sendo 34 de HPV-16, 14 de HPV-53 e 16 de HPV-66. A análise filogenética foi realizada por meio do método *neighbour joining* utilizando o programa Mega 4.1 (TAMURA et al., 2007). A confiabilidade da árvore foi avaliada através da análise de 1000 réplicas.

## 2.5 Aspectos Éticos

O trabalho foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Alagoas, sob o nº 017021/2006-17, e todas as pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

## 3 | RESULTADOS

### 3.1 Variabilidade genética

Todos os 24 isolados de HPV-16, -53 e -66 previamente genotipados por *RFLP*, tiveram os tipos virais confirmados pelo sequenciamento do fragmento da região L1 produzido pelo par de iniciadores MY09 e MY11.

Foi analisado um fragmento nucleotídico de 205pb da região L1 de dez isolados do HPV-16, seis do HPV-53 e oito do HPV-66. Todos os 10 isolados do HPV-16 mostraram 100% de similaridade em relação à sequência referência. Em relação ao HPV-53, foi identificado um variante em quatro das seis amostras analisadas (**Tabela 1**). O variante foi caracterizado por três variações nucleotídicas pontuais em relação à sequência referência. Também foi identificado 1 variante nos 8 isolados analisados do HPV-66 (**Tabela 2**). Os variantes foram caracterizados por 4 variações nucleotídicas pontuais em relação à sequência referência. As variações nucleotídicas identificadas nos isolados do HPV-53 e -66 não geraram nenhuma alteração na composição de aminoácidos destes isolados.

HPV-53	Gene L1		
Isolados	6 7 4 0	6 7 9 7	6 9 0 8
X74482	A	T	G
Mac-173	G	C	A
Mac-266	G	C	A
Mac-309	G	C	A
Mac-360	G	C	A

Tabela 1. Diversidade do gene L1 de variantes do HPV-53: Mac-173, Mac-266, Mac-309 e Mac-360.

HPV-66	Gene L1			
Isolados	6 8 4 9	6 8 5 5	6 8 5 8	6 9 2 7

<b>U31794</b>	T	C	A	G
<b>Mac-208</b>	C	A	G	A
<b>Mac-271</b>	C	A	G	A
<b>Mac-272</b>	C	A	G	A
<b>Mac-277</b>	C	A	G	A
<b>Mac-291</b>	C	A	G	A
<b>Mac-307</b>	C	A	G	A
<b>Mac-321</b>	C	A	G	A
<b>Mac-332</b>	C	A	G	A

Tabela 2. Diversidade do gene L1 de variantes do HPV-66: Mac-208, Mac-271, Mac-272, Mac-277, Mac-291, Mac-307, Mac-321e Mac-332.

### 3.2 Análise filogenética

A análise filogenética foi realizada através do método *neighbour joining*, utilizando as sequências nucleotídicas do gene L1 descritas no presente estudo e outras disponíveis no *GenBank*. A análise filogenética obtida com todos os tipos em estudo evidencia o agrupamento característicos entre os tipos -16, -53 e -66. Representado por triângulos cinzas estão os variantes deste trabalho, por triângulos pretos as sequências referências de cada tipo viral, e os demais isolados são variantes depositados no *GenBank* (**Figura 1**). Os *clusters* formados com os isolados de HPV-16, HPV-53 e HPV-66 mostraram valores significativos de *bootstrap*, 91%, 100% e 99%, respectivamente. A árvore filogenética calculada com essas sequências e outras obtidas no *GenBank* mostrou ramificações profundas.

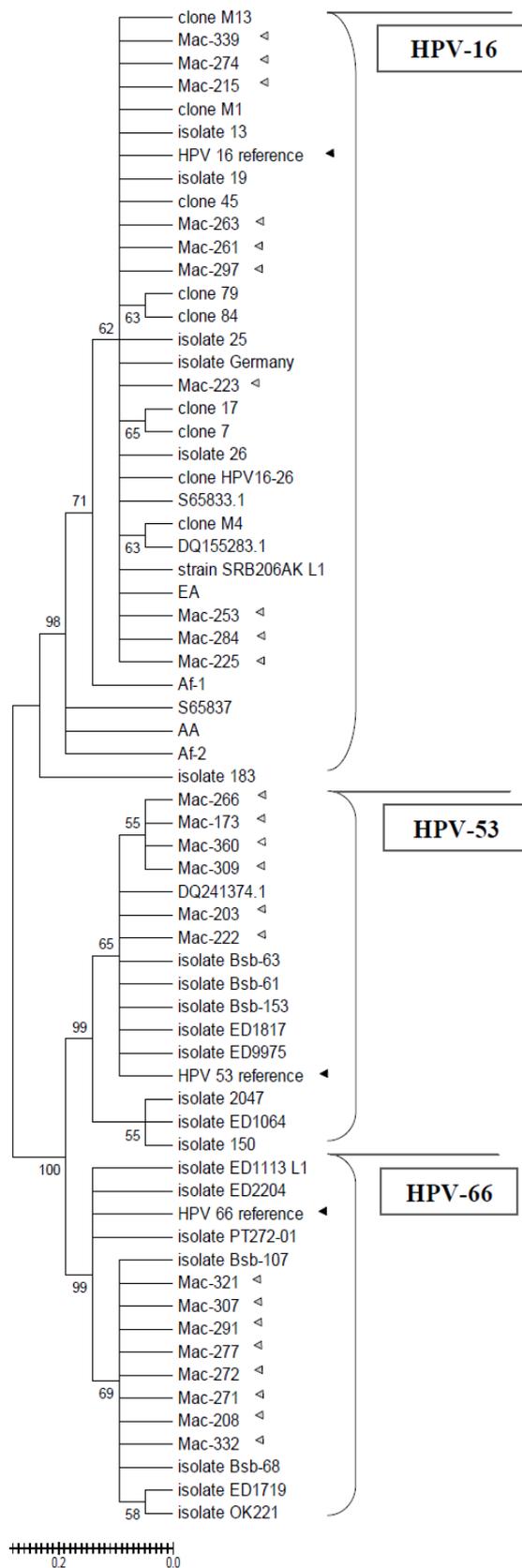


Figura 1. Diversidade intratipos do HPV Diversidade intra-tipos do HPV-16, -53 e -66, baseada em um fragmento de 205pb do gene L1.

Na análise do HPV-16, houve a formação de quatro ramos curtos, um deles é formado pelos isolados clone M4, DQ155283.1, Mac-223 e Mac-263, outro é composto pelos isolados Mac-297 e Mac-284, e os outros dois são formado apenas por isolados provenientes de outros estudos. Os isolados de HPV-16 obtidos neste estudo não

formaram nenhum ramo característico com os variantes étnicos (Af-1, Af-2 e AA).

Entre os isolados de HPV-53, os variantes aqui obtidos não formaram ramos característicos com outros isolados do mundo. Os 4 variantes (Mac-360, Mac-173, Mac-209, Mac-266) ficaram agrupados entre si. Na filogenia do HPV-66, houve a formação de dois ramos curtos. Um ramo contém o HPV-66 referência e 3 variantes do *GenBank* e o outro contém 12 isolados, sendo 4 variantes do *GenBank* e todos os 8 isolados do único variante de HPV-66 aqui obtido.

#### 4 | DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi identificar mutações no gene do capsídeo viral L1, dos HPV-16, -53 e -66, em Alagoas, Brasil. Variações nucleotídicas são bem documentadas para tipos mais prevalentes como HPV-6, -11, -16 e -18. Entretanto, poucos estudos envolvendo variantes moleculares de HPV menos prevalentes foram publicados (RAIOL et al., 2009). No Brasil, a maioria dos estudos referentes à prevalência de HPV de alto risco é proveniente da região sudeste (OLIVEIRA-SILVA et al., 2011). Até o momento, na região nordeste do Brasil não existe nenhum dado sobre identificação de variantes moleculares de HPV de alto risco menos prevalentes.

Diversos estudos biomoleculares de HPV de alto risco, indicam que mutações na região de controle LCR do HPV podem alterar as propriedades intrínsecas das proteínas E6 e E7 e seus níveis de expressão, ocasionando diferenças na patogenicidade dos variantes de HPV oncogênicos (BERNARD et al., 2006). Além disso, essas variações nucleotídicas podem afetar a montagem do vírus, a resposta imunológica, degradação da p53, imortalização e a regulação da transcrição (HILDESHEIM et al., 2001; PANDE et al., 2008).

O HPV 16 é o tipo mais comumente encontrado em câncer cervical e lesões intraepiteliais cervicais no mundo (50-70%) (SMITH et al., 2007). Diversos trabalhos no mundo evidenciam que variações genômicas no HPV-16 têm relevância na infectividade e patogenicidade viral (ZEHBE et al., 1998; HILDESHEIM et al., 2001; PANDE et al., 2008). Para Pista et al., (2007) estas variações poderiam influenciar na persistência da infecção e progressão para câncer invasivo, o que explicaria a alta prevalência do câncer cervical e suas patologias em alguns países.

O HPV-53 foi originalmente isolado de esfregaços cervicais em mulheres grávidas sem anormalidades clínicas e citológicas (GALLAHAN et al., 1989). Atualmente é encontrado associado a lesões cervicais de alto grau, e estudos epidemiológicos reportam prevalência de até 4,9% em neoplasias de alto grau (WHEELER et al., 2008). O HPV-66 considerado de alto risco foi detectado originalmente em biópsias de pacientes com carcinoma invasivo na cérvix uterina (TAWHEED et al., 1991), e hoje é encontrado em lesões neoplásicas de grau II e III e cânceres cervicais.

O variante identificado do HPV-53 neste trabalho foi caracterizado por três alterações nucleotídicas, sendo duas já descritas (CERQUEIRA et al., 2003; PRADO

et al., 2005) e uma nova mutação, no nucleotídeo 6797 (T por C). Todos os oito isolados do único variante de HPV-66 identificado compartilham quatro alterações nucleotídicas, também identificadas em outros variantes do mundo (CERQUEIRA et al., 2003; PRADO et al., 2005).

A análise filogenética mostrou os agrupamentos esperados, de acordo com DE VILLIERS et al., (2004), entre os tipos HPV-16 (Espécie 9) e HPV-53 e -66 (Espécie 6). Filogeneticamente neste trabalho não houve a formação de dicotomia profunda, apenas a formação de ramos curtos, típico de alguns variantes já estudados dos HPV-2, -5, -6, -11, -16, -18, -27 e -57 (DEAU et al., 1993; HO et al., 1993; ONG et al., 1993; HEINZEL et al., 1995; STEWART et al., 1996; CHAN et al., 1997; YAMANDA et al., 1997). Em relação à etnia, os isolados aqui obtidos não se agruparam com nenhum dos variantes étnicos, sendo classificados, portanto, como variantes europeus pela sua similaridade com o isolado europeu referência do HPV-16.

Na análise filogenética do HPV-53 e -66, os isolados não formaram ramos distintos com outros isolados do mundo. Todos os variantes do HPV-53 ficaram agrupados entre si, resultado da similaridade nucleotídica destes isolados.

Para Calleja-Macias et al., (2005), a limitada diversidade genômica intra-tipos de HPV é surpreendente., Isso muito provavelmente aconteceu pelo processo de deriva genética e eventos de expansão/redução, típico de um gargalo evolucionário. Apesar do reduzido número de amostras analisadas, essa limitada diversidade pode ser confirmada neste trabalho, uma vez que muitos isolados compartilham as mesmas alterações nucleotídicas, inclusive, em comparação com diversos isolados de todo o mundo.

A prevalência em algumas partes no mundo do HPV-53 e -66, associada a neoplasias de alto grau, é de 4,9% e 2,3%, respectivamente (WHEELER et al., 2009). Já no Brasil, os dados referentes aos tipos menos prevalentes não são conclusivos. De acordo com Krambeck et al., (2008), em um estudo realizado a prevalência no Brasil, a prevalência dos tipos HPV-53 e -66 foi de 4,0% e 4,5%, respectivamente. A identificação de variantes moleculares dos tipos HPV-53 e -66 na região nordeste do Brasil, com mutações encontradas em várias partes do mundo, até o momento é inédito. Porém estudos mais abrangentes são necessários, principalmente aqueles que envolvam a relação entre a caracterização genética, expressão de proteínas e associação com o possível efeito clínico (oncogenicidade e imunização). Com intuito final de tentar reduzir a mortalidade por câncer cervical no mundo, especialmente no Brasil onde este tipo de câncer ainda é um grave problema de saúde pública.

## 5 | CONCLUSÃO

Conclui-se que em Alagoas existem variantes moleculares dos tipos HPV-53 e HPV-66 com mutações encontradas em várias partes do mundo. Porém estudos mais

abrangentes são necessários, principalmente aqueles que envolvam a relação entre a caracterização genética, expressão de proteínas e associação com o possível efeito clínico (oncogenicidade e imunização).

## REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 1;25, n. 17, p. 3389-3402, set. 1997.

BERNARD H. U. et al. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment polymorphisms, nucleotide sequence and phylogenetic algorithms. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 170, n. 5, p. 1077-1085, nov. 1994.

BERNARD, H. U.; CALLEJA-MACIAS, I. E.; DUNN, S. T. Genome variation of human papillomavirus types: Phylogenetic and medical implications. **International Journal of Cancer**, v. 118, n. 5, p. 1071-1076, mar. 2006.

BOUVARD, V. et al. A review of human carcinogens – Part B: biological agents. **The Lancet. Oncology**, v. 10, n. 4, p. 321-322, abr. 2009.

CALLEJA-MACIAS, I. E. et al. Worldwide Genomic Diversity of the High-Risk Human Papillomavirus Types 31, 35, 52, and 58, Four Close Relatives of Human Papillomavirus Type 16. **Journal of Virology**, v. 79, n. 21, p. 13630-13640, nov. 2005.

CERQUEIRA, D. M. et al. Variants of Human Papillomavirus Types 53, 58 e 66 identified in Central Brazil. **Virus Genes**, v. 26, n. 1, p. 83-87, jan. 2003.

CHAN, S. Y. et al. Phylogenetic analysis of the human papillomavirus type 2 (HPV-2), HPV-27, and HPV-57 group, which is associated with common warts. **Virology**, v. 239, n. 2, p. 296-302, dez. 1997.

DE BOER, M. A. et al. Human papillomavirus type 18 variants: Histopathology and E6/E7 polymorphisms in three countries. **International Journal of Cancer**, v. 114, n. 3, p. 422-425, abr. 2005.

DE VILLIERS, E. M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17-27, jun. 2004.

DEAU, M. C. et al. Genetic heterogeneity of oncogenic human papillomavirus type 5 (HPV5) and phylogeny of HPV5 variants associated with epidermodysplasia verruciformis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 11, p. 2918-2926, nov. 1993.

GALLAHAN, D. et al. Human papillomavirus type 53. **Journal of Virology**, v. 63, n. 11, p. 4911-4922, 1989.

HEINZEL, P. A. et al. Variation of human papillomavirus type 6 (HPV-6) and HPV-11 genomes sampled throughout the world. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 7, p. 1746-1754, jul. 1995.

HILDESHEIM, A. et al. Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 93, n. 4, p. 315-318, fev. 2001.

HO, L. et al. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and movement of ancient human populations. **Journal of Virology**, v. 67, n. 11, p. 6413-6414, 1993.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER – IARC. Monographs on the Evaluation

of Carcinogenic Risks to Humans. França: Lyon. 2006. 689 p.

KRAMBECK, W. M. et al. HPV detection and genotyping as an earlier approach in cervical cancer screening of the female genital tract. **Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology**, v. 35, n. 3, p. 175-178, 2008.

OLIVEIRA-SILVA, M. et al. Human Papillomavirus in Brazilian women with and without cervical lesions. **Virology Journal**, v. 8, n. 1, p. 4, jan. 2011.

ONG, C. K. et al. Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. **Journal of Virology**, v. 67, n. 11, p. 6424-6431, nov. 1993.

PANDE, S. et al. Human Papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7, and L1 genes and Long Control Region in biopsy samples from cervical cancer patients in north India. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 1060-1066, jan. 2008.

PISTA, A. et al. Molecular Variants of Human Papillomavirus Type 16 and 18 and Risk for Cervical Neoplasia in Portugal. **Journal of Medical Virology**, v. 79, n. 12, p. 1889-1897, dez. 2007.

PRADO, J. C. et al. Worldwide genomic diversity of the human papillomaviruses-53, 56, and 66, a group of high-risk HPVs unrelated to HPV-16 and HPV-18. **Virology**, v. 340, n. 1, p. 95-104, set. 2005.

RAIOL, T. et al. Genetic Variability and Phylogeny of the High-Risk HPV-31, -33, -35, -52, and -58 in Central Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. 81, n. 4, p. 685-692, 2009.

SICHERO, L. et al. High-grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. **International Journal of Cancer**, v. 120, n. 8, p. 1763-1768, abr. 2007.

SILVA, A. M. T. C.; AMARAL, M. V. T.; CRUZ, A. D. O papel do papiloma vírus humano no câncer. **Biociência e Desenvolvimento**, v. 29, p. 48-54, 2003.

SMITH, J. S. et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. **International Journal of Cancer**, v. 121, n. 3, p. 621-632, 2007.

STEWART, A. C. et al. Intratype Variation in 12 Human Papillomavirus Types: a Worldwide Perspective. **Journal of Virology**, v. 70, n. 5, p. 3127-3136, maio 1996.

TAMURA, K. et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, ago. 2007.

TAWHEED, A. R. et al. Characterization of human papillomavirus type 66 from an invasive carcinoma of the uterine cervix. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 11, p. 2656-2660, 1991.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, nov. 1994.

WHEELER, C. M. et al. Human Papillomavirus Genotype Distributions: Implications for Vaccination and Cancer Screening in the United States. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 7, p. 475-487, abr. 2009.

WHEELER, C. M. et al. Human papillomavirus type 16 sequence variants: identification by E6 and L1 lineage-specific hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 11-19, jan. 1997.

YAMADA, T. et al. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: A worldwide perspective. **Journal of Virology**, v. 71, n. 3, p. 2463-2472, mar. 1997.

ZEHBE, I. et al. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. **Cancer Research**, v. 58, n. 4, p. 829-833, fev. 1998.

## **SOBRE OS ORGANIZADORES**

**LETÍCIA BANDEIRA MASCARENHAS LOPES** Farmacêutica, Graduada em Farmácia pelo Centro Universitário INTA (UNINTA). Especialista em caráter de Residência Multiprofissional em Urgência e Emergência (SCMS e UNINTA), especialista em Gestão e Logística Hospitalar pela Universidade Cândido Mendes (UCAM), pós - graduanda em Farmácia Clínica e Cuidados Farmacêutico, pela Escola Superior da Amazônia (ESAMAZ), pós - graduanda em Análises Clínicas e Microbiologia pela Universidade Cândido Mendes (UCAM).

**TIAGO SOUSA MELO** Possui graduação em FARMÁCIA pela Universidade Federal do Ceará (2009). Doutor em Biotecnologia em Saúde pela Rede Nordeste de Biotecnologia RENORBIO. Atualmente é professor dos Cursos de Farmácia e Odontologia e gestor de pesquisa do curso de Farmácia do Centro Universitário INTA. Também exerce atividade como tutor da Residência Multiprofissional em Urgência e Emergência da Santa Casa de Misericórdia de SobralCE. Tem experiência na área de Farmacologia Pré-Clínica de Produtos Naturais, com ênfase no estudo de plantas medicinais com ação em distúrbios metabólicos (diabetes, dislipidemia e obesidade) e Farmacologia Clínica.

Agência Brasileira do ISBN

ISBN 978-85-7247-323-1



9 788572 473231