

Ciências da Saúde

Saberes e práticas interdisciplinares

JOELMA ABADIA MARCIANO DE PAULA
VANESSA CRISTIANE DE SANTANA AMARAL
Organizadoras





**EDITORA UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE GOIÁS**

Presidente

Ivano Alessandro Devilla (Reitor)

Vice-Presidente

Everton Tizo Pedroso (Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação)

Coordenadora Geral

Elisabete Tomomi Kowata

Revisão Técnica

Thalita Gabriele Lacerda Ribeiro

Revisão Linguística

Marília Silva Vieira

Revisão Geral

Joelma Abadia Marciano de Paula

Vanessa Cristiane de Santana Amaral

Projeto Gráfico e Capa

Adriana da Costa Almeida

Conselho Editorial

Carla Conti de Freitas (UEG)

Elizete Beatriz Azambuja (UEG)

Francisco Ramos de Melo (UEG)

Glauber Lopes Xavier (UEG)

Joana D'arc Bardella Castro (UEG)

Joelma Abadia Marciano de Paula (UEG)

Léo Carrer Nogueira (UEG)

Luciana de S. Ondeí (UEG)

Luciana Rebelo Guilherme (UEG)

Maria Aurora Neta (UEG)

Murilo Mendonça Oliveira de Souza (UEG)

Simone de Magalhães Vieira Barcelos (UEG)

Thatiana Salgado (UEG)

Vanessa Cristiane S. Amaral (UEG)

Vandervilson Alves Carneiro (UEG)

Ciências da Saúde

**Saberes e práticas
interdisciplinares**



JOELMA ABADIA MARCIANO DE PAULA
VANESSA CRISTIANE DE SANTANA AMARAL

Organizadoras



Anápolis | 2019

© Editora UEG – 2019
© Autoras e autores – 2019

A reprodução não autorizada desta publicação, por qualquer meio,
seja total ou parcial, constitui violação da Lei no 9.610/98.

Depósito legal na Biblioteca Nacional, conforme decreto no 1.825,
de 20 de dezembro de 1907.

Catálogo na Fonte
Comissão Técnica do Sistema Integrado de Bibliotecas Regionais (SIBRE),
Universidade Estadual de Goiás

D569 Ciências da Saúde: saberes e práticas interdisciplinares / Joelma Abadia
Marciano de Paula; Vanessa Cristiane de Santana Amaral(Orgs.). –
Anápolis : Ed. UEG, 2019.
410 p.

ISBN: 978-85-5582-060-1 (E-book)

1.Biodiversidade. 2.Medicamentos Fitoterápicos 3.Sanidade Animal. 4.
Saúde Pública I. Título.

CDU: 614.78

A exatidão das referências, a revisão gramatical e as ideias expressas e/ou
defendidas nos textos são de inteira responsabilidade dos autores.



Editora filiada a ABEU

EDITORA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS

BR-153 – Quadra Área – CEP 75.132-903 – Fone: (62) 3328-1181 – Anápolis-GO

www.editora.ueg.br / e-mail: revista.prp@ueg.br/editora@ueg.br

PREFÁCIO

O livro **Ciências da Saúde: Saberes e Práticas Interdisciplinares** como o próprio nome diz, engloba conhecimento e interdisciplinaridade aplicados à saúde de forma geral. Dividido em quatro partes, ele descreve de forma sucinta e acessível a profissionais de diversas áreas, apresentando informações sobre biotecnologia, saúde física e mental, inovações em saúde e sanidade animal.

Para quem gosta de biotecnologia como eu, o leitor vai se surpreender com as novidades a respeito de tecnologias relacionadas a microrganismos e suas aplicações. Além disso, o livro traz também uma série de revisões com novidades sobre biofármacos, em especial os fitoterápicos, bem como suas diferentes formas de produção e a manutenção da qualidade. No decorrer de sua leitura, é difícil não trazer à tona o polêmico embate sobre o potencial que o Brasil tem com sua biodiversidade e o longo caminho que as futuras gerações terão que percorrer para preservá-la ao mesmo tempo em que aproveitam de tal potencial.

A segunda parte fala sobre saúde física e mental com uma boa revisão sobre a Vitamina D, sua importância, suas fontes e seu funcionamento, intercalando-a com um capítulo sobre prevenção da saúde e desenvolvimento da criança. Como vivemos em um mundo cercados de

informações cujas fontes nem sempre podem ser creditadas, a leitura embasada em artigos científicos como esta é um bom material para início de pesquisa para vários profissionais. Para quem gosta de dança, o leitor vai se deleitar com o assunto sobre dança como forma de terapia.

A terceira parte fala sobre inovações em saúde. Nela podemos ler sobre a síntese e atividades biológicas das chalconas, que são compostos de origem vegetal encontrados em várias partes das plantas. São demonstradas atividades antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatória deste composto além de técnicas de otimização de sua produção empregando tecnologias como o uso de ultrassom e micro-ondas. Para quem gosta de tecnologia de formação de imagens, esta parte traz também um capítulo especial sobre Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET) onde é apresentado o funcionamento do equipamento, uma lista de radioisótopos utilizados e suas aplicações, além das vantagens do PET em relação a outras formas de produção de imagem. As tecnologias para administração de drogas via mucosa e oral também são levantadas, assim como novos métodos para formular e avaliar o desempenho de mucoadesivos e fármacos de administração local nos pulmões.

Uma interessante revisão sobre alguns ensaios em animais para avaliar a toxicidade pode ser vista no final da terceira parte. Indiferentemente de sua área de trabalho ou profissão, o leitor vai gostar do levantamento histórico e da evolução da nossa sociedade com relação às pesquisas em animais.

A quarta parte trata de sanidade animal e saúde pública. Como muitos devem estar cientes, há uma preocupação iminente se continuarmos utilizando antibióticos de forma desordenada que possa levar a resistência de vários microrganismos a todos os antibióticos disponíveis. O problema se agrava ainda mais quando estes antibióticos são empregados na alimentação de animais com o interesse meramente de aumentar o lucro do produtor. É bom saber que já existem alternativas aos antibióticos que podem dar resistência imunológica aos animais e aumentar a produção. Este é o caso dos probióticos, prebióticos, enzimas e da lactulose. Esta parte do livro trata de uma boa revisão de seus

conceitos e dos resultados encontrados quando estes foram aplicados na alimentação de aves.

Portanto, concluo que a obra tem um significado histórico na produção do conhecimento baseado em pesquisas científicas relacionadas à saúde unindo vários ramos de conhecimento, tal como foi o seu propósito: saberes e práticas interdisciplinares.

Obrigado a vocês que permitiram que eu tivesse a oportunidade de tecer alguns comentários sobre obra tão preciosa.

Deixo a todos o meu estimado agradecimento.

Luis Eduardo Maggi

Doutor em Engenharia Biomédica pela
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Professor na Universidade Federal do Acre (UFAC)

Vice-coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental da UFAC

APRESENTAÇÃO

O livro **Ciências da Saúde: Saberes e Práticas Interdisciplinares** surge, em sua primeira edição, como fruto do esforço conjunto de docentes e discentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde da Universidade Estadual de Goiás e de colaboradores vinculados a outras instituições de ensino, com *expertise* nas áreas de abrangência da obra. O intuito é apresentar conteúdos que abarquem as diversas áreas da Saúde nas quais atuam os pesquisadores do Programa, de forma a subsidiar a apreensão dos fenômenos complexos no campo da Saúde sob um olhar interdisciplinar.

A enorme riqueza discursiva e prática da área da Saúde, bem como sua complexidade paradigmática, frutos de seus recentes avanços epistemológicos, demandam a resignificação e a articulação dos diferentes saberes da área. Nesse contexto, o paradigma interdisciplinar amplia a antiga noção dos saberes multidisciplinares na produção de conhecimentos justapostos no campo da Saúde, compreendendo a necessidade intrínseca de integrar os diferentes saberes.

A partir dessa perspectiva, os capítulos apresentados nesta obra foram organizados em quatro eixos principais: “Biotecnologia, Bioprodutos e Saúde: dos Micro-organismos às Plantas”, “Saúde Física e

Mental: Desafio Interdisciplinar”, “Pesquisa e Inovação em Saúde: da Tecnologia Farmacêutica aos Ensaio de Toxicidade em Animais” e “Sanidade Animal e Saúde Pública”.

No primeiro eixo, “Biotecnologia, Bioprodutos e Saúde: dos Micro-organismos às Plantas” são abordados temas tais como: estratégias de controle de biofilmes microbianos utilizando carvão ativado impregnado com prata; eficácia e segurança da planta medicinal *Pimenta pseudocaryophyllus*; tecnologias utilizadas no desenvolvimento de fitoterápicos; características e utilizações de exopolissacarídeos bacterianos; toxicidade, atividade antimicrobiana e fitoquímica de *Machaerium opacum*; lactonas e *Aeollanthus suaveolens*; obtenção de bioprodutos microencapsulados e enzimas hidrolíticas bacterianas utilizadas em biotecnologia.

No segundo eixo da obra, “Saúde Física e Mental: Desafio Interdisciplinar”, os autores oferecem aos leitores reflexões sobre a medicina e a ciência da dança; desenvolvimento da criança com foco na prevenção em saúde e promoção do crescimento; a vitamina D e a saúde pública, bem como a intervenção em oncologia para além dos produtos alopatícos, abordando a perspectiva da psicologia neste processo.

O terceiro eixo, “Pesquisa e Inovação em Saúde: da Tecnologia Farmacêutica aos Ensaio de Toxicidade em Animais”, apresenta temas como: definição, síntese, atividade biológica e estudos espectrométricos de chalconas; estratégias para a formulação de produtos farmacêuticos mucoadesivos; barreiras biológicas e desafios na administração pulmonar de fármacos; uso de tomografia por emissão de pósitrons no diagnóstico por imagem; utilização de nanobiopolímeros em produtos para saúde e testes de toxicidade em animais na pesquisa e desenvolvimento de produtos para saúde.

No quarto e último eixo, “Sanidade Animal e Saúde Pública”, os autores abordam o uso de produtos alternativos aos antimicrobianos na avicultura e o efeito do medicamento lactulose na saúde sistêmica de aves, com possíveis impactos na saúde pública.

Desse modo, buscamos, neste livro, abordar temas que podem interessar a estudantes, profissionais e pesquisadores que dialogam nas

diferentes interfaces do campo da Saúde. Biólogos, biomédicos, farmacêuticos, fisioterapeutas, médicos, nutricionistas, psicólogos, químicos, entre outros, que possuem em comum o interesse na pesquisa e desenvolvimento de produtos e serviços inovadores para saúde, poderão se beneficiar com a leitura e o estudo desta obra.

Convidamos o leitor para um mergulho dialógico nos diferentes temas aqui abordados e desejamos que este estudo culmine em parcerias e propostas de pesquisas interdisciplinares, com impactos positivos para a Saúde de nossa população.

Joelma Abadia Marciano de Paula
Vanessa Cristiane de Santana Amaral
Organizadoras

s 12 and DYS19 is not 11, one is a
member of haplogroup R1a.

12 and DYS19 is 11, one
is a member of haplogroup R1a.

DYS19

If DYS426 is 11, one is probab
a member of haplogroup G-1.

If DYS426 is 11 and DYS384 is 12, one
model haplotype for G show above.



SUMÁRIO

Prefácio	5
Apresentação	9

Parte I

BIOTECNOLOGIA, BIOPRODUTOS E SAÚDE: DOS MICRO-ORGANISMOS ÀS PLANTAS

1	Impregnação do carvão ativado com prata para controle de biofilmes microbianos	21
	Jéssica Pires Valle Sinara Pereira Brasil José Daniel Ribeiro Campos Plínio Lázaro Faleiro Naves	
2	Eficácia e segurança da espécie medicinal <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum (Myrtaceae): uma revisão.	39
	Bruce Soares Cardoso Vanessa Cristiane Santana Amaral	
3	Tecnologias aplicadas ao desenvolvimento de fitoterápicos.	59
	Alessandra Ribeiro Sartor Lima Edemilson Cardoso da Conceição Joelma Abadia Marciano de Paula	

4	Exopolissacarídeos bacterianos: características e utilização Lucas Leonardo da Silva Karina Freire d'Eça Nogueira Santos Plínio Lázaro Faleiro Naves Claudia Cristina Garcia Martin-Didonet	81
5	Avaliação da toxicidade em <i>Artemia salina</i> , atividade anti- microbiana e caracterização fitoquímica de extratos das folhas de <i>Machaerium opacum</i> Vogel (Fabaceae) Renato Gomes Santos Antônio Carlos Severo Menezes Plínio Lázaro Faleiro Naves	101
6	Uma breve revisão sobre <i>Aeollanthus suaveolens</i> e as lacto- nas δ -decalactona e γ -decalactona Eduardo Lopes de Paula Maísa Borges Costa	113
7	Microencapsulação: estratégia tecnológica na obtenção de bioprodutos de alta qualidade Deborah Gonçalves Bezerra Ivano Alessandro Devilla Joelma Abadia Marciano de Paula	129
8	Enzimas hidrolíticas bacterianas de interesse biotecnológico Larissa Batista da Silva Karina Freire d'Eça Nogueira Santos Enderson Petrônio de Brito Ferreira Claudia Cristina Garcia Martin-Didonet	149

Parte II

SAÚDE FÍSICA E MENTAL:

DESAFIO INTERDISCIPLINAR

- 9 Medicina & ciência da dança em uma perspectiva histórica e interdisciplinar 169
Cibelle Kayenne Martins R. Formiga
Rafaela Noleto dos Santos
Adriano Jabur Bittar
- 10 Prevenção em saúde e promoção do crescimento e desenvolvimento da criança 183
Martina Estevam Brom Vieira
Tânia Cristina Dias da Silva Hamu
Cibelle Kayenne Martins Roberto Formiga
- 11 A vitamina D e a saúde pública 203
Iris Iasmine de Rezende Araújo
Lucas Henrique Ferreira Sampaio
Cibelle Kayenne Martins Roberto Formiga
- 12 Produtos não alopáticos aplicados à saúde: a perspectiva da psicologia na intervenção em oncologia 225
Isabela Jubé Wastowski
Daniela Sacramento Zanini
Graziele Lopes Teles

Parte III

PESQUISA E INOVAÇÃO EM SAÚDE: DA TECNOLOGIA FARMACÊUTICA AOS ENSAIOS DE TOXICIDADE EM ANIMAIS

- 13 Chalcona: definição, síntese, atividade biológica e estudos
 espectrométricos 245
 Jaqueline Evangelista de Queiroz
 Giuliana Muniz Vila Verde
 Gilberto Lucio Benedito de Aquino
- 14 Estratégias para formulação de produtos farmacêuticos
 mucoadesivos 265
 Rayane Santa Cruz Martins de Queiroz Antonino
 Eliana Martins Lima
 Thais Leite Nascimento
- 15 Administração pulmonar de fármacos: barreiras biológicas
 e desafios a serem transpostos 283
 Ana Paula Bernardes Almeida
 Eliana Martins Lima
 Thais Leite Nascimento
- 16 Uso de tomografia por emissão de pósitrons no diagnóstico
 por imagem 303
 Renata Awad
 Erick de Oliveira Lemes
 Gilberto Lúcio Benedito de Aquino
- 17 Nanobiopolímeros aplicados em produtos para a saúde . . . 319
 Luciana Rebelo Guilherme
 James Teixeira Rodrigues
 Murillo Fernandes Ferreira
 Patrícia José Marques Tannús

18	Testes de toxicidade em animais experimentais voltados para a pesquisa e o desenvolvimento de produtos para a saúde.	335
	Bruce Soares Cardoso	
	Cátia Lira do Amaral	
	Vanessa Cristiane Santana Amaral	

Parte IV

SANIDADE ANIMAL E SAÚDE PÚBLICA

19	Uso de produtos alternativos aos antimicrobianos na avicultura	355
	Eliete Souza Santana	
	Maria Auxiliadora Andrade	
	Robson Rodrigues Santana	
20	Efeito do medicamento lactulose na saúde sistêmica de aves inoculadas experimentalmente com <i>Salmonella</i> Typhimurium	377
	Eliete Souza Santana	
	Maria Auxiliadora Andrade	
	Ana Caroline de Souza Barnabé	
	Sobre os autores	397

Parte I

Biotecnologia, bioprodutos e saúde

dos micro-organismos às plantas

1.

IMPREGNAÇÃO DO CARVÃO ATIVADO COM PRATA PARA CONTROLE DE BIOFILMES MICROBIANOS¹

JÉSSICA PIRES VALLE
SINARA PEREIRA BRASIL
JOSÉ DANIEL RIBEIRO CAMPOS
PLÍNIO LÁZARO FALEIRO NAVES

O carvão ativado é um material carbonáceo, poroso e hidrofóbico utilizado para purificar, desintoxicar, desodorizar, filtrar, descolorir ou modificar concentrações de uma infinidade de materiais líquidos e gasosos. Com intuito de aumentar suas propriedades adsorptivas, o carvão é submetido ao processo de ativação que eleva sua área superficial e, consequentemente, seu poder adsorptivo. Devido a essas propriedades, o carvão ativado pode ser utilizado em filtros de água. No entanto, micro-organismos presentes na água a ser filtrada podem formar biofilmes microbianos ao se alojar nas superfícies do carvão. Uma vez aí instalados, consomem a matéria orgânica, proliferam-se, secretam polissacarídeos e organizam-se, formando os biofilmes, que poderão provocar uma saturação prematura do filtro e a contaminação da água filtrada devido ao desprendimento de segmentos desse biofilme. Um biofilme pode ser composto por uma única espécie (biofilme monoespécie) ou por várias espécies, gêneros e até reinos diferentes (biofilme misto). As interações que podem ocorrer entre os micro-organismos podem ser dadas de

1 Capítulo vinculado ao projeto de pesquisa “Formação de biofilmes mistos de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* em carvão ativado de casca de *Orbignya phalerata* (babaçu) impregnado com prata”, financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG).

modo sinérgico ou antagonista. Uma alternativa industrial para evitar a contaminação da água por meio de micro-organismos é a impregnação do carvão ativado com prata, pois esta exibe propriedades físico-químicas e atividades bacteriostáticas.

Consequentemente, as suas aplicações estão sendo constantemente avaliadas. Sendo assim, o processo de impregnação de prata no carvão ativado tem como resultado a adsorção do material orgânico pelo carvão ativado e ação bactericida através da prata, inibindo a formação de biofilmes.

Carvão ativado e suas aplicações

O carvão ativado é extensivamente empregado na remoção de poluentes gasosos e efluentes líquidos, na purificação de produtos alimentares e como suporte de catalisadores. O aumento contínuo na demanda, assim como das diferentes aplicações, faz com que seja necessário empregar diferentes matérias-primas, principalmente de origem vegetal como, por exemplo, madeira, endocarpo de coco, casca de coco, resíduos de babaçu, etc. (JANKOWSKA et al., 1991; WILSON, 1981).

Por apresentar propriedades adsorptivas, o carvão ativado é utilizado para purificar, desintoxicar, desodorizar, filtrar, descolorir ou modificar a concentração de uma infinidade de materiais líquidos e gasosos, sendo essas aplicações de grande interesse em diversas áreas por representar um processo de baixo custo e de fácil operação (LYUBCHIK et al., 2004; ROCHA, 2006).

Devido a essas propriedades, o carvão ativado pode ser utilizado em filtros de água (SCHIMIDT, 2011). Contudo, é susceptível à formação de biofilmes microbianos, pois a água a ser filtrada pode estar contaminada com micro-organismos que se alojam na superfície do carvão ativado, consomem a matéria orgânica do meio e secretam polissacarídeos, formando, assim, o biofilme (DONLAN; COSTERTON, 2002).

Quando aderidos à superfície do carvão ativado, os biofilmes podem saturar de forma prematura o filtro e desprender-se durante o processo de filtração, contaminando a água filtrada. Uma alternativa

industrial para evitar a contaminação da água por micro-organismos é fazer a impregnação do carvão ativado com prata, pois ela possui atividade bacteriostática e pode inibir a formação de biofilmes (FONG; WOOD, 2006).

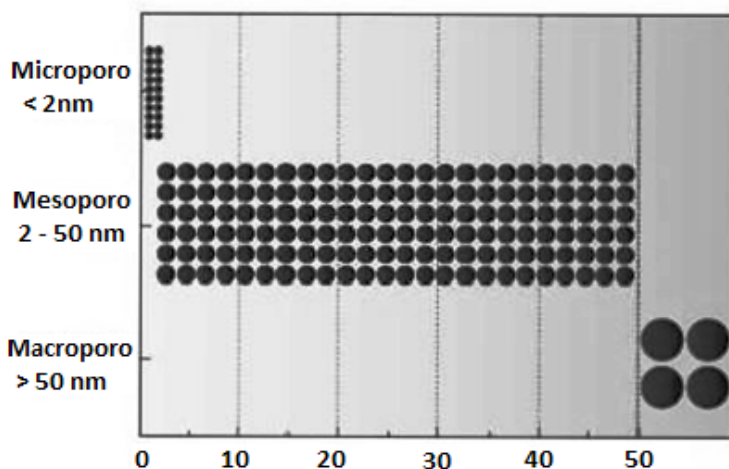
Carvão ativado e suas características

O carvão ativado é um material carbonoso altamente poroso, com grande área superficial e, conseqüentemente, com uma grande capacidade adsortiva (RAMOS et al., 2009). A maior parte dos materiais carbonáceos possui certo grau de porosidade, sendo que, no decorrer da ativação, a área superficial aumenta com a oxidação dos átomos de carbono. Após a ativação, o carvão pode apresentar área superficial na ordem de centenas de m^2/g (SHOAIB; AL-SWAIDAN, 2015).

O carvão ativado possui características como forma, tamanho de partícula, volume do poro, área superficial, estrutura, distribuição de poro e características físicas e químicas da superfície. Todos esses parâmetros podem ser modificados, obtendo-se diferentes tipos de carvão e de características melhoradas, o que lhes confere maior capacidade de adsorção (PIS et al., 1996; WANG et al., 2001).

A porosidade do carvão ativado é um dos aspectos mais importantes para a avaliação do seu desempenho. As diferenças mais características de adsorção estão relacionadas com a estrutura dos poros do material. Com base nas propriedades de adsorção, a *Internacional Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), propõe a seguinte classificação de poros (GREGG; SING, 1982) (Figura 1):

Figura 1 – Classificação dos poros conforme as dimensões apresentadas

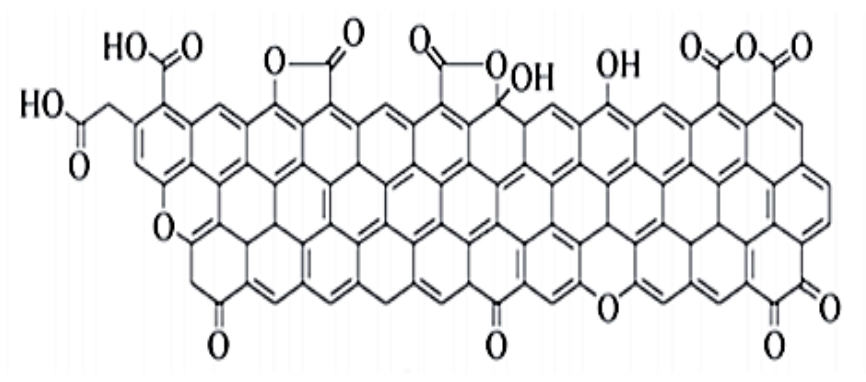


Fonte: Clark (2010).

- **Microporos:** diâmetro médio de poro menor que 2 nm; contribuem para a maioria da área superficial e proporcionam alta capacidade de adsorção para moléculas de dimensões pequenas, tais como gases e solventes comuns.
- **Mesoporos:** diâmetro médio de poros entre 2 e 50 nm; são importantes para a adsorção de moléculas grandes tais como corantes e proporcionam a maioria da área para carvões impregnados com produtos químicos.
- **Macroporos:** diâmetro médio de poros superior a 50 nm; sua função é servir como meio de transporte para as moléculas gasosas.

Constituindo-se basicamente de carbono, o carvão ativado forma estruturas gráficas, sendo que sua superfície contém grupos funcionais oxigenados, tais como álcoois, fenóis e ácidos carboxílicos (OZDEMIR et al., 2014), conforme mostra a Figura 2. A quantidade e os tipos de grupos funcionais dependem do tipo de ativação (NOWICKI et al., 2015).

Figura 2 – Esquema de grupos funcionais presentes na superfície do carvão ativado

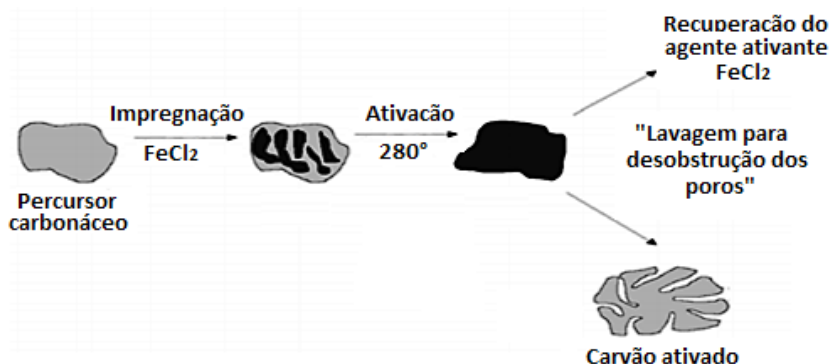


Fonte: Adaptado de Na et al. (2012).

Etapa indispensável para promoção de aumento de poros do carvão, a ativação consiste na retirada de componentes como naftas, alcatrão e resíduos orgânicos que possam obstruir os poros (OZDEMIR et al., 2014). São dois os tipos de processo de ativação: ativação física ou química (KATESA et al., 2013).

A ativação química pode ser dada a partir de ácidos ou bases, tais como: carbonato de potássio, hidróxido de potássio (OKMAN et al., 2014), cloreto de zinco (OZDEMIR et al., 2014), ácido fosfórico (GUO; ROCKSTRAW, 2007), cloreto férrico (PEREIRA et al., 2008), conforme ilustrado na Figura 3.

Figura 3 – Esquema da ativação química com FeCl_3



Fonte: Adaptado de Pereira et al. (2008).

Esses ácidos, bases e sais são responsáveis pela desidratação da matéria-prima carbonácea, a qual é impregnada com esses agentes desidratantes e submetidos a temperaturas que podem variar de 280 °C a 800 °C (OKMAN et al., 2014; PEREIRA et al., 2008; SAKA, 2012; YORGUN; YILDIZ, 2015). No final do processo, os agentes químicos são removidos do carvão ativado através de lavagem.

Na ativação física, são utilizados gases oxidantes tais como CO_2 (SHOAIB; AL-SWAIDAN, 2015) e vapor de água (SOUSA et al., 1994), podendo-se empregar temperaturas de 450 °C, 550 °C e 650 °C durante o processo (VELÁZQUEZ-TRUJILLO et al., 2010). A ativação física é ecologicamente adequada, quando comparada à ativação química, pois, no processo químico, são utilizadas substâncias cujos resíduos podem gerar impactos ao meio ambiente (SHOAIB; AL-SWAIDAN, 2015).

Mecanismos de ação da prata

A impregnação do carvão ativado com metais é empregada como uma estratégia para se aumentar a eficácia dos filtros devido à ação antimicrobiana da prata (XAVIER et al., 2010). Essa utilização foi proposta por Mitsumori e colaboradores (1977), que descreveram o tratamento do carvão ativado com prata com fins purificadores e processos de esterilização e remoção de bactérias na água. Porém, antes disso, a prata já

era impregnada no carvão ativado como catalisador na remoção de vapor de mercúrio (MANES, 1968).

Vários estudos demonstram que íons de prata são seletivamente tóxicos para micro-organismos procarióticos e exercem pequeno efeito sobre células eucarióticas (PARK; JANG, 2003). A prata tem um longo histórico de usos na medicina como agente antimicrobiano e tem sido empregada como um desinfetante de água desde os tempos dos gregos antigos, que o empregavam em jarros, em substituição aos tradicionais, feitos de cerâmica (ANGIOLETTO, 2003; LALLEY et al., 2014; TORTORA et al., 2012).

Zhao et al. (2013) demonstraram um efeito bactericida da prata (0,97% em massa) contra *Escherichia coli*. Em outro trabalho semelhante, Paiva et al. (2014) observaram a eficiência da combinação de 0,5% de prata com 0,5% do cobre contra o mesmo tipo de bactéria. O resultado foi superior a 99%, demonstrando que os metais combinados potencializaram o efeito oligodinâmico, apresentando sinergia e mecanismo de ação, com íons cobre se ligando à parede da célula e permitindo a entrada de íons prata.

No entanto, o mecanismo de ação inibitória da prata sobre os micro-organismos é parcialmente conhecido. Alguns relatos demonstram que a carga positiva sobre o íon da prata é de extrema importância para a ação antimicrobiana através da atração eletrostática entre a membrana celular carregada negativamente e as nanopartículas com carga positiva da prata (DIBROV et al., 2002; DRAGIEVA et al., 1999; HAMOUDA et al., 2000).

Amro et al. (2000) sugeriram que a depleção de metais pode alterar a permeabilidade da membrana do micro-organismo dada pela formação de cavidades de forma irregular em sua membrana externa, que é causada pela liberação progressiva de moléculas de lipopolissacarídeos e proteínas de membrana. Um mecanismo semelhante de nanopartículas de prata foi observado por Sondi e Salopek-Sondi (2004), quando avaliaram os efeitos contra *Escherichia coli* e comprovaram a degradação da estrutura da membrana celular bacteriana.

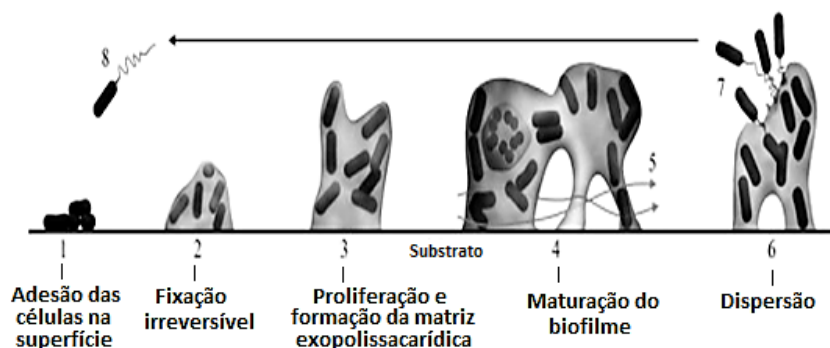
Biofilmes microbianos

O crescimento bacteriano era, em sua grande maioria, considerado como sendo planctônico, ou seja, suspensão em meio aquoso (DAVEY; O'TOOLE, 2000). No entanto, já há algum tempo, a maioria dos estudos reconhece que grande parte das populações bacterianas, independentemente do meio em que se encontrem (ambiental, alimentar ou médico), está propícia a formar agregados de várias espécies, constituindo comunidades de micro-organismos (COSTERTON et al., 1999; JACOBSEN; SHIRTLIFF, 2011).

Na natureza, as bactérias estão frequentemente presentes e associadas entre si na forma de biofilme, que constituem aglomerados de micro-organismos que formam comunidades compostas por múltiplas espécies ou, predominantemente, por um tipo específico, que aderem a um substrato abiótico ou substrato vivo (WRIGHT et al., 2013), podendo ser denominado como biofilme monoespécie ou biofilme misto (heterotípico) (BANDARA et al., 2009).

Essas comunidades, conhecidas como biofilmes, podem ser definidas como um conjunto de micro-organismos que crescem aderidos a uma superfície e se revestem de uma camada heterogênea de compostos extracelulares, definida como a matriz do biofilme (COSTERTON et al., 1999). A formação de um biofilme numa superfície envolve várias etapas, sendo as principais a adesão inicial à superfície, seguida da ligação intercelular, como demonstrado na Figura 4.

Figura 4 – Representação das etapas de desenvolvimento de um biofilme microbiano



Fonte: Adaptado de Menoita et al. (2012).

A etapa inicial da formação de um biofilme inicia-se com a adesão de colonizadores primários em uma superfície biótica ou abiótica que contenha matéria orgânica e umidade, ocorrendo, primeiramente, interações do tipo Van der Waals entre a superfície de fixação e o colonizador inicial (GU, 2014).

A fixação irreversível de bactérias Gram-negativas à superfície ocorre, aproximadamente, 2h após a adesão inicial em que há a formação de microcolônias. Essas microcolônias correspondem a um amontoado de células unidas e aderidas entre si, em determinada superfície. Nessa etapa, a morte dos micro-organismos é cessada (BOARI, 2008).

As células que se apresentam aderidas às superfícies são definidas como sésseis, enquanto aquelas que estão livres e dispersas na fase aquosa são definidas como planctônicas. Os colonizadores primários desenvolvem-se formando pequenas colônias que passam a sintetizar uma matriz exopolissacarídica que atua como substrato, auxiliando a aderência de outros micro-organismos, denominados colonizadores secundários em sua estrutura (DUNNE JUNIOR, 2002).

Durante o processo de maturação do biofilme, há um aumento pronunciado na quantidade de micro-organismos e materiais polissacarídicos secretados, sendo aumentada a espessura do biofilme

(HEYDORN et al., 2000). Quando o biofilme atinge uma determinada massa crítica e o equilíbrio dinâmico é alcançado, as camadas mais externas começam a liberar células em estado planctônico, dispersando-se e multiplicando-se rapidamente. Assim, colonizam novas superfícies e organizam biofilmes em novos locais (GUPTA, 2016).

Dentre os agentes patogênicos, estão a *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio spp.*, *Campylobacter jejuni* *Clostridium spp.*, *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa* (CHEW; YANG, 2016).

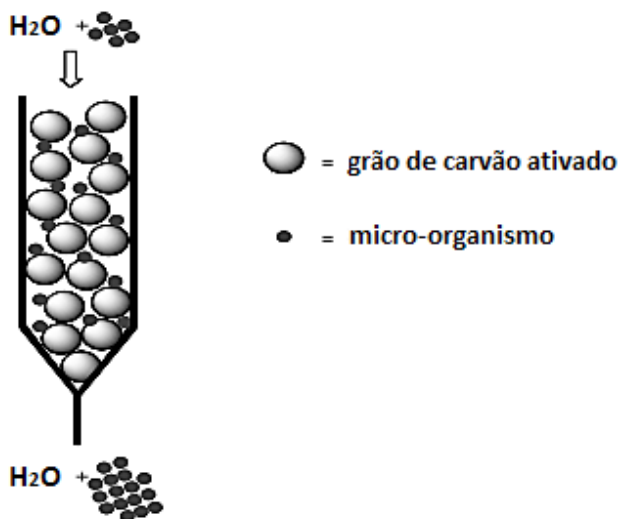
Formação de biofilmes no carvão ativado

A aplicabilidade do carvão ativado está relacionada à sua alta porosidade, adsorção rápida e estabilidade térmica (HESAS et al., 2013). Como consequência, são numerosas as aplicações, como na catálise (LIMA et al., 2013), na indústria de alimentos, na medicina (AWWAD et al., 2015), na proteção ambiental para o controle de tratamento de água (LIU et al., 2014) e efluentes (HAFTKA et al., 2004).

Filtros domésticos com carvão ativado são capazes de adsorver contaminantes (matéria orgânica) presentes na água de consumo e também removem cloro residual proveniente da estação de tratamento de água (ETA) (HENNING; VON, 2012). No entanto, o carvão ativado, em meio úmido, pode se tornar propício ao desenvolvimento de micro-organismos patogênicos (NANGMENYI et al., 2009).

A superfície do carvão ativado pode ser colonizada por micro-organismos, que podem estabelecer biofilmes. A colonização e proliferação bacteriana trazem prejuízos como a diminuição de tempo de vida útil do filtro e a contaminação da água filtrada por micro-organismos (GIBERT et al., 2013). A irregularidade, rugosidade e porosidade da superfície do carvão ativado fornecem um excelente ambiente para o desenvolvimento e crescimento de biofilmes (ISLAM et al., 2016) e, posteriormente, o desprendimento desses micro-organismos da estrutura do carvão ativado, contaminando a água filtrada, conforme ilustrado na Figura 5.

Figura 5 – Filtro de água de carvão ativado saturado com micro-organismo



Fonte: Próprios autores (2017).

Várias espécies bacterianas são capazes de formar biofilmes (COSTERTON et al., 1995). As bactérias *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* são um dos micro-organismos mais bem estudados quanto à formação de biofilme, sendo a segunda extensivamente utilizada como modelo para o estudo de biofilme (COSTERTON et al., 1999; WATNICK; KOLTER, 2000).

Acredita-se que *Pseudomonas aeruginosa* usa o sistema de *quorum sensing* que desempenha um papel crítico na formação de estruturas maduras e diferenciadas do biofilme (DONLAN; COSTERTON, 2002). De uma forma simplista, esse fenômeno baseia-se no fato de certos membros do biofilme utilizarem a secreção de compostos metabólicos que vão agir como sinais de comunicação para os restantes membros da comunidade do biofilme (KIRAN et al., 2008).

Assim, *Pseudomonas aeruginosa* parece ser capaz de formar biofilmes sob uma gama de condições diferentes, enquanto o biofilme de *Escherichia coli* é preferencialmente formado em condições específicas, com meios de cultura mínimos, suplementados com aminoácidos, ou

em meios pobres em nutrientes (WATNICK; KOLTER, 2000). São muitos os mecanismos que regulam a formação dessas comunidades (O'GARA, 2007; SMITH; SPATAFORA, 2012).

Tendo em vista a possível formação de biofilmes, Shih e Lin (2010) testaram a ação bactericida dos metais, impregnando-os na superfície do carvão ativado, com o intuito de prolongar sua vida útil. Os pesquisadores avaliaram íons de cobre e prata em um método de desinfecção contra biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* e outros, na distribuição de água hospitalar. O inóculo das suspensões bacterianas continha 3×10^6 ufc.mL⁻¹. As combinações dos metais Cu/Ag (mg.L⁻¹) foram: 0,2%/0,02%; 0,4%/0,04%; 0,8%/0,08%. A amostra contendo 0,8%/0,08% mg.L⁻¹ apresentou uma inibição de 99,9% nas primeiras 24 h. Os resultados comprovaram que a impregnação de tais metais em carvão ativado foi eficaz no controle de biofilme.

Perspectivas para o controle da formação de biofilmes no carvão ativado

O carvão ativado é extensivamente utilizado devido à sua alta capacidade adsorptiva. Entretanto, a formação de biofilmes em sua estrutura porosa é um dos principais limitantes para sua utilização. Dessa forma, a impregnação do carvão ativado com metais como a prata constitui-se em uma promissora alternativa no controle da formação de biofilmes (ZHAO et al., 2013).

Em um projeto de nossa equipe, concentrações de prata menores que as empregadas comercialmente (0,08%) foram impregnadas em amostras de carvão ativado de casca de coco de babaçu (*Orbignya phalerata* Mart., Arecaceae) nas concentrações de 0,02%, 0,03% e 0,05% em massa contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Resultados promissores foram encontrados, pois mesmo na menor concentração foi detectada inibição total da formação de biofilme nas condições testadas. Diante desses resultados, verifica-se que a impregnação do carvão ativado com metais representa uma interessante estratégia no controle da formação de biofilmes e no retardamento da saturação nos sistemas de filtragem domésticos e industriais por micro-organismos.

Referências

- ANGIOLETTO, E. **Desenvolvimento de processo de fabricação de cerâmicas com propriedades antimicrobianas**. Tese (Doutorado). 2003. 107 p. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2003.
- AMRO, NA.; KOTRA, LP.; WADU-MESTHRIGE, K.; BULYCHEV, A.; MOBASHERY, S.; LIU, G. High-resolution atomic force microscopy studies of the *Escherichia coli* outer membrane: structural basis for permeability. **Langmuir**, v. 16, p. 2789-2796, 2000.
- AWWAD, M.; AL-RIMAWI, F.; DAJANI, K. J.; KHAMIS, M.; NIR, S.; KARAMAN, R. Removal of amoxicillin and cefuroxime axetil by advanced membranes technology, activated carbon and micelle-clay complex. **Environmental Technology**, p. 1-34, 2015.
- BANDARA, H. M.; YAU, J. Y.; WATT, R. M.; JIN, L. J.; SAMARANAYAKE, L. P. *Escherichia coli* and its lipopolysaccharide modulate *in vitro* *Candida* biofilm formation. **Journal of Medical Microbiology**, v.58, p.1623-1631, 2009.
- BOARI, C. A.; ALVES, M. P.; TEBALDI, V. M. R.; SAVIAN, T. V.; PICCOLI, R. H. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 886-895, 2009.
- CHEW, S. C.; YANG, L. Biofilms. In: CABALLERO, B.; FINGLAS, P. M.; TOLDRÁ, F. (Eds.) **Encyclopedia of Food and Health**. Singapore: Elsevier, 2016. p. 407-415.
- CLARK, H. L. M. **Remoção de fenilalanina por adsorvente produzido a partir da torta prensada de grãos defeituosos de café**. 2010. 115 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia da UFMG. Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia, 2010.
- COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, p. 1318–1322, 1999.
- COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 711-745, 1995.
- DAVEY, M. O'TOOLE, G. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 847-867, 2000.
- DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 167-193, 2002.

DIBROV, P.; DZIOBA, J.; GOSINK, K.K.; HASE, CC. Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag(+) in *Vibrio cholerae*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 46, p. 2668-2670, 2002.

DRAGIEVA, I.; STOEVA, S.; STOIMENOV, P.; PAVLIKIANOV, E.; KLABUNDE, K. Complex formation in solutions for chemical synthesis of nanoscaled particles prepared by borohydride reduction process. **Nanostruct Materured**, v. 12, p. 267-270, 1999.

DUNNE Jr, W. M. Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 155-166, 2002.

FONG, J.; WOOD, F. Nanocrystalline silver dressings in wound management: a review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, n. 4, p. 441-449, 2006.

GILBERT, O.; LEFÈVRE, B.; FERNÁNDEZ, M.; BERNAT, X.; PARAIRA, M.; CALDERER, M.; MARTÍNEZ-LLADO, X. Characterizing biofilm development on granular activated carbon used for drinking water production. **Water Research**, v. 47, p. 1101-1110, 2013.

GREGG, S. J.; SING, K. S. W. **Adsorption, Surface Area and Porosity**. 2. ed. London: Academic Press, 1982.

GU, H. **Patterned biofilm formation to investigate bacteria-surface interactions** Dissertations – ALL. Paper 91. Syracuse University: Surface, 2014.

GUO, Y.; ROCKSTRAW, A. D. Physicochemical properties of carbons prepared from pecan shell by phosphoric acid activation. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1513-1521, 2007.

HENDRICK, D. W. **Water treatment unit processes: Physical and Chemical**. 1. ed. London: CRC Press, 2006.

GUPTA, P.; SARKAR, S.; DAS, B.; BHATTACHARJEE, S.; TRIBEDI, P. Biofilm, pathogenesis and prevention – a journey to break the wall: a review. **Archives of Microbiology**, v. 198, n. 1, p. 1-15, 2016.

HAFTKA, S.; EHLERS, J.; BARTH, C.; WANG, L. Activated carbon filter. **US Patent**, v. 6, p. 736-770, 2004.

HAMOUDA, T.; MYC, A.; DONOVAN, B.; SHIH, A.; REUTER, J.D.; BAKER, JR. A novel surfactant nanoemulsion with a unique non-irritant topical antimicrobial activity against bacteria, enveloped viruses and fungi. **Microbiological Research**, v. 156, n. 1, p. 1-7, 2000.

HENNING, K. D.; VON. K. H. Activated Carbon. Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry. **Carbon**, v. 6, n. 5, p. 788-791, 2012.

HESAS, R. H.; DAUD, W. M. A. W.; SAHU, J. N.; ARAMINIYA, A. The effects of a microwave heating method on the production of activated carbon from agricultural waste: a review. **Journal of Analytical and Applied pyrolysis**, v. 100, p. 1-11, 2013.

HEYDORN, A.; ERSBOLL, B.; HENZTZER, M. Experimental reproducibility in flow-chamber biofilms. **Microbiology**, v. 146, p. 2409–2415, 2000.

ISLAM M. S.; ZHANG, Y.; MCPHEDRAN, K. N.; LIU, Y.; EL-DIN, M. G. Mechanistic investigation of industrial wastewater naphthenic acids removal using granular activated carbon (GAC) biofilm based processes. **Science of the Total Environment**, v. 541, p. 238–246, 2016.

JACOBSEN, S. M.; SHIRTLIFF, M. E. *Proteus mirabilis* biofilms and catheter-associated urinary tract infections. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 460-465, 2011.

JANKOWSKA, H.; SWIATKOWSKI, A.; CHOMA, J. Active Carbon. **AIChE Journal**, Buffalo, NY, v. 38, n. 12, 1998.

JURADO-SÁNCHEZ, B., SATTAYASAMITSATHIT, S.; GAO, W.; SANTOS, L.; FEDORAK, Y.; SINGH, V. V.; OROZCO, J.; GALARNYK, M.; WANG, J. Selfpropelled activated carbon janus micromotors for efficient water purification. **Small**, v. 11, p. 499-506, 2015.

KATESA, J.; JUNPIROMAND, S.; TANGSATHITKULCHAI, C. Effect of carbonization temperature on properties of char and activated carbon from properties of coconut shell. **Suranaree Journal of Science and Technology**, v. 20, p. 269-278, 2013.

KIRAN, M. D.; ADIKESAVAN, N. V.; CIRIONI, O. GIACOMETTI, A.; SILVESTRI, C.; SCALISE, G.; GHISELLI, R.; SABA, V.; ORLANDO, F.; SHOHAM, M.; BALABAN, N. Discovery of a quorum-sensing inhibitor of drug-resistant staphylococcal infections by structure-based virtual screening. **Molecular pharmacology**, v. 73, n. 5, p. 1578-1586, 2008.

LALLEY, J.; DIONYSIOU, D. D.; VARMA, R. S.; SHANKARA, S.; YANG, D.; NADAGOUDA, M. N. Silver-based antibacterial surfaces for drinking water disinfectionan overview. **Current Opinion in Chemical Engineering**, v. 3, p. 25-29, 2014.

LIMA, S. B.; BORGES, S. M. S.; RANGEL, M. D.; MARCHETTI, S. G. Effect of iron content on the catalytic properties of activated carbon-supported magnetite derived from biomass. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 2, p. 344-354, 2013.

LIU, X. L.; GUO, J. X.; CHU, W. H.; LUO, D. M.; YIN, H. Q.; SUN, M. C.; YAVUZ, R. Desulfurization performance of iron supported on activated carbon. **Fuel**, v. 123, p. 93-100, 2014.

LYUBCHIK, S. I.; LYUBCHIK, A. I.; GALUSHKO, O. L.; TIKHONOVA, L. P.; VITAL, J.; FONSECA, I. M.; LYUBCHIK, S. B. Kinetics and thermodynamics of the Cr (III) adsorption on the activated carbon from co-mingled wastes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 242, n. 1-3 p. 151-158, 2004.

MANES, M. Pittsburgh. **Silver impregnated carbon**. C01B31/12. PA. US3374608 A. 30 ago. 1966. 26 mar. 1968. United States Patent Office, n. 575,989.

MENOITA, E.; SANTOS, V.; TESTAS, C.; GOMES, C.; SANTOS, A. S. Biofilms: knowing the entity. **Journal of Aging and Innovation**, v. 1, n. 2, p. 23-32, 2012.

MITSUMORI, N.; TAKEDA, C.; MIYASAKO, H. K. **Method of treating silver impregnated activated carbon**. B01J23/96. JPN. US4045553 A. 26 fev. 1975. 30 ago. 1977. United States Patent, n. 553, 244.

NA, L.; JIAN, Z.; QING-FANG, C. Activated carbon surface groups qualitative and quantitative analysis. **Chemical Journal of Chinese Universities**, v. 23, n. 3, p. 548-554, 2012.

NANGMENYI, G.; XAO, W.; MEHRABI, S.; MINTZ, E.; ECONOMY, J. Bactericidal activity of Ag nanoparticle impregnated fibreglass for water disinfection. **Journal Water Health**, v. 7, p. 657-663, 2009.

NOWICKI, P.; KAZMIERCZAK, J.; PIETRZAK, R. Comparison of physicochemical and sorption properties of activated carbons prepared by physical and chemical activation of cherry. **Stones Powder Technology**, v. 269, p. 312-319, 2015.

O'GARA, J. P. Ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 270, n. 1, p. 79-88, 2007.

OKMAN, I.; KARAGÖZ, S.; TAY, T.; ERDEMB, M. Activated carbons from grape seeds by chemical activation with potassium carbonate and potassium hydroxide. **Applied Surface Science**, v. 293, p. 138-142, 2014.

OZDEMIR, I.; SAHIN, M.; ORHAN, R.; ERDEM, M. Preparation and characterization of activated carbon from grape stalk by zinc chloride activation. **Fuel Processing Technology**, v. 125, p. 200-206, 2014.

PAIVA, G. R. R.; ALVES, C. L.; FRANCO, J. M.; YAMAGUCHI, N. U. **Eficiência bactericida e caracterização de carvão ativado impregnado com metais em filtros domésticos**. In: VII Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica, 2014, Maringá. Anais da VII Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica do Centro Universitário de Maringá. Unicesumar. Out de 2014.

PARK, S.; JANG, Y. Preparation and characterization of activated carbon fibers supported with silver metal for antibacterial behavior. **Journal of Colloid Interface Science**, v. 261, p. 238-243, 2003.

PEREIRA, E.; OLIVEIRA, L. C. A.; VALLONE, A.; SAPAG, K.; PEREIRA, M. Preparação de carvão ativado em baixas temperaturas de carbonização a partir de rejeitos de café: utilização de FeCl₃ como agente ativante. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1296-1300, 2008.

PIS, J. J.; CENTENO, T. A.; MAHAMUD, M.; FUERTES, A. B.; PARRA, J. B.; PAJARES, J. A.; BANSAL, R. C. Preparation of activated carbons from coal. Part I. Oxidation of coal. **Fuel Process Technology**, v. 47, p. 119-138, 1996.

RAMOS, P. H.; GUERREIRO, M. C.; RESENDE, E. C.; GONÇALVES, M. Produção e caracterização do carvão ativado produzido a partir do defeito preto, verde, ardido (PVA) do café. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1139-1143, 2009.

ROCHA, W. D. **Carvão ativado a partir de resíduos agrícolas e suas aplicações na adsorção de íons metálicos**. 2006. 126 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Minas. Departamento de Engenharia de Minas. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mineral, 2006.

SAKA, C. BET, T.G–DTG, FT-IR, SEM, iodine number analysis and preparation of activated carbon from acorn shell by chemical activation with ZnCl₂. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 95, p. 21 -24, 2012.

SCHIMIDT, C. G. **Desenvolvimento de filtros de carvão ativado para a remoção de cloro da água potável**. 2011. 90 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Escola de Engenharia. Departamento de Engenharia de Materiais. Programa de Pós-Graduação de Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais, 2011.

SHIH, H. Y.; LIN, Y. E. Efficacy of Copper-Silver Ionization in Controlling Biofilm– and Plankton-Associated Waterborne Pathogens. **Applied Environmental Microbiology**, v. 76, n. 6, p. 2032–2035, 2010.

SHOAIB, M.; AL-SWAIDAN, H. Optimization and characterization of sliced activated carbon prepared from date palm tree fronds by physical activation. **Biomass and Bioenergy**, v. 73, p. 124-134, 2015.

SINGH, P. K.; WELSH, M. J.; GREENBERG, E. P. Seattle. **Methods of inhibiting and treating bacterial biofilms by metal chelators**. A01N63/02. US. 20130210708 A1. 23. Apr. 2013. 15. Aug. 2013. United States Patent Application Publication, 13/706,042.

SMITH, E. G.; SPATAFORA, G. A. Gene regulation in *S. mutans*: complex control in a complex environment. **Journal of Dental Research**, v. 91, n. 2, p. 133-41, 2012.

SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 275, p. 177-82, 2004.

SOUSA, J. C.; PANA, J. B.; PAJARES, J. A.; PIS, J. J. Activated carbons from semianthracite by steam activation. Effect of coal preoxidation and burn-off. **Studies in Surface Science and Catalysis**, v. 87, p. 603-612, 1994.

TANG, H. Q.; FENG, H. J.; ZHENG, J. H.; ZHAO, J. A study on antibacterial properties of Ag⁺-implanted pyrolytic carbon. **Surface Coatings Tec**, v. 201, p. 5633– 5636, 2007.

TORTORA, G. J.; FUNKE, R. B.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2012.

VELÁZQUEZ-TRUJILLO, A.; BOLAÑOS-REYNOSO, E.; PLIEGO-BRAVO, Y. S. Optimization of activated carbon production from bamboo. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 9, n. 3, p. 359-366, 2010.

WANG, Z. M.; KANO, H.; KANEKO, K.; LU, G. Q.; DO, D. Structural and surface property changes of macadamia nut-shell char upon activation and high temperature treatment. **Carbon**, v. 40, p.1231 – 1239, 2002.

WATNICK, P.; KOLTER, R. J. **Bacteriology**, v. 182, p. 2675– 2679, 2000.

WILSON, J. Active carbons from coals. **Fuel**, v. 60, p. 823, 1981.

WRIGHT, C. J.; BURNS, L. H.; JACK, A. A.; BACK, C. R.; DUTTON, L. C.; NOBBS, A. H.; LAMONT, R. J.; JENKINSON, H. F. Microbial interactions in building of communities. **Molecular Oral Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 83-101, 2013.

XAVIER, R. N.; TRAGHETTA, D. G.; OLIVEIRA, C. M. R. Avaliação da eficiência de um reator de carvão ativado impregnado com prata no tratamento de águas residuárias geradas em laboratórios de análises clínicas. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais**, n. 15, p. 29-38, 2010.

YORGUN, S.; YILDIZ, D. Preparation and characterization of activated carbons from Paulownia wood by chemical activation with H₃PO₄. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 53, p.122-131, 2015.

ZHAO, Y.; WANG, Z.; ZHAO, X.; LI, W.; LIU, S. Antibacterial action of silver-doped activated carbon prepared by vacuum impregnation. **Applied Surface Science**, v. 266, p. 67– 72, 2011.

2.

EFICÁCIA E SEGURANÇA DA ESPÉCIE MEDICINAL *Pimenta pseudocaryophyllus* (GOMES) LANDRUM (MYRTACEAE): UMA REVISÃO

BRUCE SOARES CARDOSO

VANESSA CRISTIANE SANTANA AMARAL

A terapêutica baseada em plantas medicinais, uma das mais disseminadas práticas da medicina tradicional, tem mantido seu papel fundamental no atendimento às necessidades primárias de saúde pública nos países em desenvolvimento, enquanto ressurge nos países desenvolvidos como parte de uma medicina alternativa ou complementar às práticas alopáticas vigentes (OMS, 2014).

No Brasil, a criação do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) buscou promover o uso sustentável da biodiversidade da flora brasileira, a valorização e a preservação do conhecimento tradicional e o estímulo à pesquisa científica voltada para a elaboração de medicamentos fitoterápicos (BRASIL, 2009). Assim, ao colocar a pesquisa básica voltada para a bioprospecção de seus recursos naturais como uma política pública do Estado, o governo brasileiro estimulou centros de pesquisa privados e públicos a desenvolverem tecnologia que lhes permitisse explorar a riqueza da biodiversidade brasileira, cuja flora contém 22% das espécies de plantas superiores conhecidas no mundo (BRASIL, 2002). Dentre as espécies de interesse medicinal que têm sido muito estudadas, destaca-se a *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum, Myrtaceae, uma planta

típica do Brasil, que possui diversos usos atribuídos pela cultura popular e potenciais propriedades farmacológicas (D'ANGELIS, 2013).

A espécie *P. pseudocaryophyllus* é uma dentre as cerca de 1000 espécies de mirtáceas encontradas na flora brasileira, mas é a única representante do gênero *Pimenta Lindl.* nativa da América do Sul. Pode ser encontrada como uma árvore de pequeno e médio porte (Figura 1), embora menos frequentemente forme apenas arbustos (LANDRUM; KAWASAKI, 1997).

Figura 1 – *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum, São Gonçalo do Abaeté-MG



Fonte: Próprios autores (2013).

Tradicionalmente usada por comunidades caiçaras do litoral dos Estados de São Paulo e Paraná, as folhas de *P. pseudocaryophyllus* têm uso enraizado na cultura popular brasileira, seja na culinária, na aromatização de bebidas alcoólicas e refrescantes (LIMA et al., 2006),

seja no preparo de inalações, de soluções alcoólicas para massagens (MORGANTE et al., 2012) e, principalmente, de chás com ações diurética, afrodisíaca, antigripal (SANTOS, 2010), antidiarreica, antissifilica, antigonorreica, antirreumatoide, anti-helmíntica, antipirética (D'ANGELIS; NEGRELLE, 2014), calmante, digestiva e regulatória menstrual (LEGRAND; KLEIN, 1978 *apud* LANDRUM, 1986).

A investigação científica da espécie teve início no século XIX, com os primeiros esforços para identificação botânica e classificação taxonômica de *P. pseudocaryophyllus* e, só foi concluída em 1986 (Tabela 1) (LANDRUM, 1986).

Tabela 1 – Classificação taxonômica da espécie *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae)

Classificação taxonômica	
<i>Pimenta pseudocaryophyllus</i>	
Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Classe	Magnolipsida
Ordem	Myrtales
Família	Myrtaceae Juss.
Subfamília	Myrtoidea
Tribo	Myrtaea
Subtribo	Myrtinae
Gênero	<i>Pimenta</i> Lindl.
Espécie	<i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum

Fonte: Landrum (1986).

P. pseudocaryophyllus ainda apresenta três variedades regionais: *P. pseudocaryophyllus* var. *hoehnei* (Burret) Landrum; *P. pseudocaryophyllus* var. *fulvescens* (DC.) Landrum; *P. pseudocaryophyllus* var. *pseudocaryophyllus* e ao menos 3 quimiotipos: citral, (*E*)-cariofileno e (*E*)-metilisoeugenol (PAULA et al., 2011).

Os estudos fitoquímicos identificaram mais de 60 compostos voláteis apenas nos óleos essenciais (OEs) extraídos das folhas de *P. pseudocaryophyllus*, popularmente conhecida como craveiro ou cataia. Em sua maioria de natureza terpênica ou fenólica, substâncias como (*E*)-metiliso Eugenol, eugenol, geranial/neral, (*E*)-cariofileno e chavibetol destacam-se por estarem presentes como constituintes majoritários nesses OEs (PAULA et al., 2012).

Nos poucos estudos sobre a análise do extrato etanólico bruto (EE_B) ou de suas frações (EE_F) orgânicas e inorgânicas (CAMPANINI et al., 2014; PAULA et al., 2012), foram identificados flavonoides como a catequina, a quercitrina e a rutina, e taninos como os ácidos gálico, elágico e tânico. A presença de compostos terpênicos e fenólicos, como o lupeol e o eugenol, recorrentes nos óleos essenciais, foram confirmadas nas análises dos extratos brutos.

Até o momento, há descrições na literatura apenas da análise fitoquímica das folhas de espécimes de *P. pseudocaryophyllus* coletados nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e no Distrito Federal. A escolha da técnica de extração dos óleos essenciais por hidrodestilação com aparato de Clevenger foi unânime nos estudos, bem como a técnica de maceração, quando produzidos os extratos etanólicos brutos (Tabelas 2 e 3). Quando extraído o óleo essencial, a identificação de seus constituintes foi realizada pela combinação das técnicas de cromatografia gasosa (CG), seguida de espectrometria de massas (MS), enquanto os extratos etanólicos brutos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (CAMPANINI et al., 2014) ou purificados por cromatografia em coluna, tendo seus principais componentes caracterizados por ressonância magnética nuclear (RMN) (PAULA et al., 2012).

A identificação de compostos nos extratos etanólicos brutos e óleos essenciais e as prospecções fitoquímicas de *P. pseudocaryophyllus* não apenas fornecem valiosas informações que ajudam a compreender alguns usos etnofarmacológicos da espécie, como também ampliam e embasam o entendimento de seus efeitos farmacológicos e toxicológicos potenciais.

Perfil farmacológico da *P. pseudocaryophyllus*

Estudos realizados na última década têm identificado o amplo potencial farmacológico das folhas de *P. pseudocaryophyllus*, que inclui propriedades ansiolítica, antidepressiva (FAJEMIROYE et al. 2012a,b, 2013), antioxidante/anti-inflamatória (CAMPANINI et al., 2013, 2014), antinociceptiva/anti-inflamatória (PAULA et al., 2012), anti-hiperuricêmica (FERRARI et al., 2016), antibacteriana e antifúngica (CUSTÓDIO et al., 2010; EL ASSAL et al., 2014; FERNANDES et al., 2012; LIMA et al., 2006; PAULA et al., 2009; SANTOS, 2010; SUZUKI et al., 2014; YOKOMIZO; NAKAOKA-SAKITA, 2014).

Além do vasto potencial para exploração comercial pela indústria farmacêutica, estudos têm demonstrado que a espécie *P. pseudocaryophyllus* apresenta, ainda, aplicabilidade para a indústria química como um agente natural contra larvas e insetos (PAVARINI; ANSANTE; CACERES, 2010; RIBEIRO et al., 2015).

A atividade antimicrobiana das folhas de *P. pseudocaryophyllus* é a propriedade farmacológica mais descrita na literatura. Até o momento, diversos estudos analisaram as ações antibacteriana e antifúngica de seus OE e de seu extrato etanólico, como mostram as Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2 – Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais extraídos das folhas da espécie *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae)

Microrganismo	Método	CEPA	CIM (µg/mL) ou Halo (mm)	Referência
Bactérias Gram +				
<i>Staphylococcus aureus</i>	Microdiluição	ATCC 6538	>1000/250*	Paula et al. (2012)
	Microdiluição	ATCC 25923	>1000/125*	Paula et al. (2012)
	Microdiluição	ATCC 25923	17	Custodio et al. (2010)

Microorganismo	Método	CEPA	CIM (µg/mL) ou Halo (mm)	Referência
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Microdiluição	ATCC 25923	0,0015/47x10 ⁻⁶ **	Lima et al. (2006)
	Difusão em ágar	ATCC 25923	R	Santos (2010)
	Microdiluição	ATCC 12229	>1000/125*	Paula et al. (2012)
	Microdiluição	ATCC 12228	R	Suzuki et al. (2014)
<i>Corynebacterium xerosis</i>	Microdiluição	IAL 105	1000	Suzuki et al. (2014)
<i>Bacillus subtilis</i>	Microdiluição	ATCC 8272	17	Custodio et al. (2010)
<i>Micrococcus yunnanensis</i>	Microdiluição	ATCC 7468	500	Suzuki et al. (2014)
<i>Micrococcus luteus</i>	Microdiluição	ATCC 9341	>1000/125*	Paula et al. (2012)
<i>Micrococcus roseus</i>	Microdiluição	ATCC 1740	>1000/125*	Paula et al. (2012)
<i>Bacillus cereus</i>	Microdiluição	ATCC 14579	>1000/62,5*	Paula et al. (2012)
<i>Bacillus atrophaeus</i>	Microdiluição	ATCC 6633	>1000/125*	Paula et al. (2012)
Bactérias Gram -				
<i>Escherichia coli</i>	Microdiluição	ATCC 8739	>1000/>1000*	Paula et al. (2012)
	Microdiluição	ATCC 11229	>1000/>1000*	Paula et al. (2012)
	Microdiluição	ATCC 25922	17	Custodio et al. (2010)
	Microdiluição	ATCC 25922	0,048/0,048**	Lima et al. (2006)
	Difusão em ágar	ATCC 25922	21	Santos (2010)
<i>Enterobacter cloacae</i>	Microdiluição	CI	>1000/>1000*	Paula et al. (2012)

Microorganismo	Método	CEPA	CIM (µg/mL) ou Halo (mm)	Referência
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Microdiluição	ATCC 13048	>1000/>1000*	Paula et al. (2012)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Difusão em ágar	ATCC 29212	R	Santos (2010)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Microdiluição	ATCC 27483	>1000/>1000*	Paula et al. (2012)
	Microdiluição	CI	>1000/>1000*	Paula et al. (2012)
	Microdiluição	ATCC 27853	66	Custodio et al. (2010)
	Microdiluição	ATCC 9027	0,048/0,048**	Lima et al. (2006)
	Difusão em ágar	ATCC 27853	R	Santos (2010)
	Difusão em ágar	ATCC 110699	R	Santos (2010)
<i>Serratia marcescens</i>	Microdiluição	ATCC 14756	>1000/>1000*	Paula et al. (2012)
<i>Salmonella spp.</i>	Microdiluição	ATCC 19430	>1000/>1000*	Paula et al. (2012)
<i>Proteus hauseri</i>	Microdiluição	ATCC 13315	500	Suzuki et al. (2014)
Fungos				
<i>Candida albicans</i>	Microdiluição	CI	>500/500*	Paula et al. (2012)
	Microdiluição	CI	4	Custodio et al. (2010)
	Microdiluição	ATCC 10231	0.024/0,048**	Lima et al. (2006)
	Microdiluição	CI	>256	El Assal et al. (2014)
	Microdiluição	ATCC 90028	2250	Santos (2010)
	Microdiluição	ATCC 76615	2250	Santos (2010)
	Difusão em ágar	ATCC 90028	35	Santos (2010)
<i>Candida albicans</i>	Difusão em ágar	ATCC 76615	35	Santos (2010)

Microrganismo	Método	CEPA	CIM (µg/mL) ou Halo (mm)	Referência
<i>Candida parapsilosis</i>	Microdiluição	CI	>500/500*	Paula et al. (2012)
	Microdiluição	ATCC 22019	>500/500*	Paula et al. (2012)
	Microdiluição	ATCC 22019	2250	Santos (2010)
	Difusão em ágar	ATCC 22019	>35	Santos (2010)
<i>Candida krusei</i>	Microdiluição	CI	4	Custodio et al. (2010)
	Microdiluição	ATCC 6258	1125	Santos (2010)
	Difusão em ágar	ATCC 6258	38	Santos (2010)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Microdiluição	ATCC 28957	125/15,6*	Paula et al. (2012)
	Microdiluição	CI	250/62,5*	Paula et al. (2012)
	Microdiluição	CI	250/62,5*	Paula et al. (2012)

Legenda: * CIM (µg/mL) para o óleo essencial extraído do quimiotipo (*E*)-metilisoeugenol/ CIM (µg/mL) para o óleo essencial extraído do quimiotipo citral; ** CIM (µg/mL) para espécime coletado em Paranapiacaba, SP/ CIM (µg/mL) para espécime coletado em Ilha do Cardoso, SP;

Abreviaturas: CIM – Concentração inibitória mínima; CI – Clinicamente isolada; R – Resistente; IAL – Instituto Adolfo Lutz.

Ao analisar a atividade antimicrobiana dos OE de *P. pseudocaryophyllus* sobre fungos filamentosos clinicamente isolados utilizando o método de difusão em ágar, Custódio et al. (2010) verificaram que, na maior concentração de OE testada, que foi de 4 mg/placa, cerca de 40 e 80% do crescimento das micelas de *Botryosphaeria rhodina* e *Fusarium verticillioides* foi interrompido. Yokomizo e Nakaoka-Sakita, (2014), por sua vez, também analisaram o potencial antimicrobiano dos OE extraídos das folhas de dois espécimes de *P. pseudocaryophyllus* pelo método de difusão em ágar. Nesse estudo, verificou-se que o espécime procedente de Campos do Jordão – SP tinha atividade antimicrobiana bem superior ao espécime coletado em Itaquaquecetuba – SP, indicando a ocorrência de polimorfismo químico. Na média, os OE de *P. pseudo-*

caryophyllus apresentaram forte atividade contra a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e contra os fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium verrucosum*, sem, contudo, serem capazes de inibir expressivamente o crescimento de *Escherichia coli*.

Acredita-se que os diferentes níveis de atividade antimicrobiana apresentados pelos óleos essenciais extraídos da espécie *P. pseudocaryophyllus* estejam relacionados às variações na concentração de alguns de seus constituintes com propriedades antibacteriana e antifúngica conhecidas, como o eugenol (CUSTÓDIO et al., 2010; SUZUKI et al., 2014), o citral, o ácido oleanólico, o ácido elágico (PAULA et al., 2012) e os flavonoides catequina e quercitrina (El ASSAL et al., 2014).

Tabela 3 – Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos obtidos das folhas da espécie *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae)

Micro-organismo	Método	CEPA	CIM (µg/mL) ou Halo (mm)	Referência
Bactérias Gram +				
<i>Staphylococcus aureus</i>	Microdiluição	ATCC 6538	1000/500 ¹	Paula et al. (2012)
	Microdiluição	ATCC 25923	1000/500 ¹	Paula et al. (2012)
	Difusão em ágar	ATCC 29213	17/19/17 ³	Paula et al. (2009)
	Microdiluição	ATCC 29213	0,39/0,78/0,39 ⁴	Paula et al. (2009)
	Microdiluição	CI	0,78/1,56/0,78 ⁴	Paula et al. (2009)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Microdiluição	ATCC 12229	1000/1000 ¹	Paula et al. (2012)
<i>Micrococcus luteus</i>	Microdiluição	ATCC 9341	1000/500 ¹	Paula et al. (2012)
	Microdiluição	ATCC 9341	0,78/1,56/0,78 ⁴	Paula et al. (2009)

Micro-organismo	Método	CEPA	CIM (µg/mL ou Halo (mm)	Referência
<i>Micrococcus roseus</i>	Microdiluição	ATCC 1740	1000/500 ¹	Paula et al. (2012)
	Difusão em ágar	ATCC 1740	27/29/28 ³	Paula et al. (2009)
	Microdiluição	ATCC 1740	0,78/0,78/0,78 ⁴	Paula et al. (2009)
<i>Bacillus cereus</i>	Microdiluição	ATCC 14579	1000/500 ¹	Paula et al. (2012)
	Difusão em ágar	ATCC 14579	16/18/16 ³	Paula et al. (2009)
	Microdiluição	ATCC 14579	0,39/0,78/0,39 ⁴	Paula et al. (2009)
<i>Bacillus atrophaeus</i>	Microdiluição	ATCC 6633	1000/500 ¹	Paula et al. (2012)
	Difusão em ágar	ATCC 6633	14/16/14 ³	Paula et al. (2009)
	Microdiluição	ATCC 6633	1.56/1,56/1.56 ⁴	Paula et al. (2009)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Difusão em ágar	ATCC 1262	13/15/13 ³	Paula et al. (2009)
	Microdiluição	ATCC 1262	0,78/1,56/0,78 ⁴	Paula et al. (2009)
Bactérias Gram -				
<i>Escherichia coli</i>	Microdiluição	ATCC 8739	>1000/>1000 ¹	Paula et al. (2012)
	Microdiluição	ATCC 11229	>1000/>1000 ¹	Paula et al. (2012)
	Difusão em ágar	ATCC 8739	0/0/0 ³	Paula et al. (2009)
	Difusão em ágar	ATCC 25922	0/0/0 ³	Paula et al. (2009)
	Microdiluição	ATCC 8739	12,5/1,56/1.56 ⁴	Paula et al. (2009)
	Microdiluição	ATCC 25922	SE/25/25	Paula et al. (2009)
<i>Enterobacter cloacae</i>	Microdiluição	CI	>1000/>1000 ¹	Paula et al. (2012)
	Difusão em ágar	HMA/FT502	0/0/0 ³	Paula et al. (2009)
	Microdiluição	HMA/FT502	3,12/12.5/1.56 ⁴	Paula et al. (2009)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Microdiluição	ATCC 13048	>1000/>1000 ¹	Paula et al. (2012)
	Difusão em ágar	ATCC 13048	0/0/0 ³	Paula et al. (2009)
	Microdiluição	HMA/FT502	12,5/25/1.56 ⁴	Paula et al. (2009)

Micro-organismo	Método	CEPA	CIM (µg/mL ou Halo (mm)	Referência
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Microdiluição	ATCC 27483	1000/1000 ¹	Paula et al. (2012)
	Microdiluição	CI	1000/1000 ¹	Paula et al. (2012)
	Difusão em ágar	ATCC 9027	13/12/13 ³	Paula et al. (2009)
	Difusão em ágar	ATCC 27253	13/15/16 ³	Paula et al. (2009)
	Microdiluição	ATCC 9027	3,12/1,56/1.56 ⁴	Paula et al. (2009)
	Microdiluição	ATCC 27253	0,39/1,56/0,78 ⁴	Paula et al. (2009)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Microdiluição	CI	0,39/1,56/0,78 ⁴	Paula et al. (2009)
	Microdiluição	ATCC 27253	0,78/1,56/0,78 ⁴	Paula et al. (2009)
<i>Serratia marcescens</i>	Microdiluição	ATCC 14756	>1000/>1000 ¹	Paula et al. (2012)
	Difusão em ágar	ATCC 14756	15/14/15 ³	Paula et al. (2009) Paula et al. (2012)
<i>Salmonella spp.</i>	Microdiluição	ATCC 19430	1000/1000 ¹	
Fungos				
<i>Candida albicans</i>	Microdiluição	CI	125/62,5 ¹	Paula et al. (2012)
	Difusão em ágar	ATCC 1023	T/T/T ³	Paula et al. (2009)
	Microdiluição	ATCC 1023	0,19/0,19/0,19 ⁴	Paula et al. (2009)
	Microdiluição	CI	256	El Assal et al. (2014)
<i>Candida parapsilosis</i>	Microdiluição	CI	62,5/31,2 ¹	Paula et al. (2012)
	Microdiluição	ATCC 22019	62,5/31,2 ¹	Paula et al. (2012)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Microdiluição	ATCC 28957	15.6/15,6 ¹	Paula et al. (2012)
	Microdiluição	CI	125/7,8 ¹	Paula et al. (2012)
	Microdiluição	CI	125/15,6 ¹	Paula et al. (2012)

Micro-organismo	Método	CEPA	CIM (µg/mL) ou Halo (mm)	Referência
	Microdiluição	ATCC 32045	64 ²	Fernandes et al. (2012)
	Microdiluição	CI	64 ²	Fernandes et al. (2012)

Legenda: 1. CIM (µg/mL) para o extrato etanólico obtido do quimiotipo (*E*)-metiliseugenol/ CIM (µg/mL) para o extrato etanólico obtido do quimiotipo citral; 2 CIM de 64 µg/mL) tanto para *C. neoformans* melanizados, quanto não melanizados; 3. Halo, em mm, para o extrato I (coleta em Brasília, abril de 2005)/ para o extrato II (coleta em Brasília, setembro de 2005/ para o extrato III (coleta em São Gonçalo do Abaeté, Julho de 2000); 4. CIM, µg/mL, para o extrato I (coleta em Brasília, abril de 2005)/ para o extrato II (coleta em Brasília, setembro de 2005/ para o extrato III (coleta em São Gonçalo do Abaeté, Julho de 2000)

Abreviaturas: CIM – Concentração inibitória mínima; CI – Clinicamente isolada; T – Traços de inibição do crescimento; SE – Sem efeito.

Quando analisada a atividade antimicrobiana das frações hexano, diclorometano, acetato de etila e aquosa obtidas a partir do extrato etanólico bruto de dois quimiotipos de *P. pseudocaryophyllus*, (*E*)-metiliseugenol e citral, Paula et al. (2012) verificaram que apenas as frações diclorometano de ambos os quimiotipos apresentaram moderada ação antimicrobiana (CIM: 250 a 500 µg/mL) sobre as bactérias Gram-positivas testadas e nenhuma fração teve efeito sobre as bactérias Gram-negativas. Por outro lado, vários níveis de ação antifúngica sobre *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. neoformans* puderam ser identificados, com destaque para o potencial apresentado pelas frações hexano (CIM: 15,6 a 62,5 µg/mL) e aquosa (CIM: 7,8 a 62,5 µg/mL) do quimiotipo (*E*)-metiliseugenol e pelas frações acetato de etila (CIM: 7,8 a 31,2 µg/mL) e aquosa (CIM: 15,6 a 62,5 µg/mL) do quimiotipo citral. Tais propriedades antifúngicas também foram verificadas por El Assal et al. (2014), que observaram inibição do crescimento, redução na aderência às células epiteliais e na formação de hifas em 12 isolados de *C. albicans* e *C. parapsilosis* após exposição às frações aquosa e acetato de etila obtidas das folhas de *P. pseudocaryophyllus*, quimiotipo citral. Em resumo, as frações aquosa e acetato de etila, bem como o extrato bruto de *P. pseudocaryophyllus* demonstraram ação antifúngica, induziram alterações metabólicas, causaram lesões nas membranas e reduziram a expres-

são de fatores de virulência em fungos, podendo, portanto, ser fonte para desenvolvimento de novos agentes antimicóticos.

Além das propriedades antimicrobianas, estudo realizado por Paula et al. (2012) investigou a ação dos extratos etanólicos brutos obtidos das folhas de *P. pseudocaryophyllus* em modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético e de edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos. Como resultado, foi verificado que tanto o quimiotipo citral quanto o (*E*)-metilisoeugenol apresentaram propriedades anti-inflamatória e antinociceptiva, possivelmente atribuídas à presença de compostos analgésicos e anti-inflamatórios em seus extratos, como lupeol, α -amirina, β -amirina, quercetina, quercitrina e afzelina.

A ação anti-inflamatória do extrato etanólico bruto obtido das folhas de *P. pseudocaryophyllus* também foi descrita por Campanini et al. (2013, 2014), que testaram a capacidade de duas formulações tópicas lipídicas incorporadas ao extrato de *P. pseudocaryophyllus*, de reverter o processo inflamatório e oxidativo instalado na pele irradiada por raios ultravioleta B (UV-B). De forma significativa, as formulações contendo o extrato não só reduziram o edema, como também combateram o surgimento de diversos fatores pró-inflamatórios e oxidativos deletérios à pele dos camundongos testados, inibindo a atividade de mieloperoxidases e da matriz metaloprotease e a produção de interleucina-1 β e de ânion superóxido. Por fim, ambas as formulações testadas não só aumentaram a expressão de ácido ribonucleico mensageiro (RNA_m) para glutathione redutase, como também inibiram a depleção dessa enzima antioxidante.

Mais recentemente, Ferrari et al. (2016) mostraram que camundongos suíços tratados com os extratos aquosos das folhas e galhos de *P. pseudocaryophyllus* reduziram os níveis séricos de ácido úrico, demonstrando, assim, atividade anti-hiperuricêmica da espécie. A ação hipouricêmica de *P. pseudocaryophyllus* foi demonstrada pela inibição da atividade residual da xantina oxidase dosada no fígado desses animais.

A capacidade de o extrato etanólico bruto obtido das folhas de *P. pseudocaryophyllus* (EP_m), bem como de suas frações aquosas (FA), hexano (FH), diclorometano (FD) e acetato de etila (FAE) apresentarem

atividade sobre o sistema nervoso central (SNC) foi avaliada em estudo desenvolvido por Fajemiroye et al. (2012a). Nesse estudo, a avaliação do tempo de sono induzida por barbitúricos foi realizada pela administração de pentobarbital 40 mg/kg a camundongos suíços, 60 minutos após terem sido tratados com o extrato e suas frações por via oral (EP_{p_m}: 1g/kg; FA: 0,64 g/kg; FEA: 0,42 g/kg; FD: 0,25 g/kg; FH: 0,16 g/kg). Os resultados mostraram que apenas a FD não foi capaz de reduzir a latência do sono, enquanto o EP_{p_m}, a FA e a FD aumentaram o tempo de sono nos camundongos quando comparados ao grupo controle. No teste de campo aberto, também realizado 60 minutos após a administração de EP_{p_m} e suas frações, com as mesmas doses adotadas na avaliação do tempo de sono, a FA mostrou efeito sedativo verificado pela redução do número de cruzamentos totais e pelo aumento no tempo de congelamento. Por outro lado, os camundongos tratados com FD ficaram mais tempo no centro do campo aberto sem quaisquer sinais de incoordenação motora, um resultado indicativo de ação ansiolítica.

Em investigação subsequente do potencial ansiolítico da FD, administrada oralmente a camundongos suíços machos, nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg, Fajemiroye et al. (2012b) sugeriram que a atividade ansiolítica identificada pudesse ter sido mediada pela ação dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{1A}. Isso porque os camundongos tratados com FD exibiram comportamentos ansiolíticos nos testes do labirinto em cruz elevado e transição claro e escuro que não puderam ser bloqueados pelo tratamento prévio dos camundongos com flumazenil (2 mg/kg), 30 min antes da administração de FD e 90 minutos antes dos testes comportamentais. Por outro lado, o tratamento prévio com o antagonista serotoninérgico NAN-190, na dose de 0,5 mg/kg, reverteu completamente os efeitos ansiolíticos dessa fração. Diante desses resultados, Fajemiroye e colaboradores sugerem que os efeitos ansiolíticos da FD, obtida do extrato etanólico das folhas de *P. pseudocaryophyllus*, podem estar relacionados à neurotransmissão serotoninérgica, com envolvimento dos receptores do tipo 5-HT_{1A}.

Adicionalmente, em análise do efeito antidepressivo da FD, administrada por via oral a camundongos suíços machos nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg, Fajemiroye et al. (2013) verificaram uma redução significa-

tiva no tempo de imobilidade dos animais tratados com 125 e 250 mg/kg quando comparados ao grupo controle, tanto no teste de nado forçado, quanto no teste de suspensão pela cauda. Todavia, esse efeito não se mostrou diretamente relacionado com a dose, não sendo observado nos animais tratados com 500 mg/kg de FD. Importante ressaltar que os efeitos antidepressivos da FD observados no teste de nado forçado foram completamente revertidos em animais previamente tratados com paraclo-rofenilalanina, um agente depletor de monoaminas, como a serotonina. Por outro lado, no teste de campo aberto, os animais tratados com 500 mg/kg de FD reduziram significativamente o número de cruzamentos e levantamentos, assim como os animais tratados com diazepam (5 mg/kg), o que sugere atividade ansiolítica da FD.

Fica claro, portanto, que as contribuições de Fajemiroye e colaboradores fornecem um precioso exemplo de como o conhecimento científico pode confirmar potenciais usos farmacológicos de uma planta medicinal advindos da cultura popular. Desde os estudos de Legrand e Klein (1978), a ação calmante dos chás das folhas de *P. pseudocaryophyllus* já estava tradicionalmente indicada, mostrando como os conhecimentos etnofarmacológicos podem nortear a pesquisa científica.

Perfil toxicológico da espécie *P. pseudocaryophyllus*

Até o momento, é escassa a literatura científica destinada à caracterização do perfil de segurança da *P. pseudocaryophyllus*. A maior parte das informações disponíveis sobre a toxicidade dessa espécie limita-se a dados extraídos de estudos *in vivo* que investigaram propriedades farmacológicas, mas não o perfil de segurança do uso dessa planta medicinal.

Nos estudos realizados por Fajemiroye et al. (2012b, 2013), por exemplo, que investigaram a ação central da fração diclorometano do extrato bruto de *P. pseudocaryophyllus* em camundongos nas doses orais de 125, 250 e 500 mg/kg, não há descrição de efeitos neurotóxicos significativos atribuídos à espécie. Tampouco, Campanini et al. (2013, 2014) demonstraram quaisquer reações tóxicas de toxicidade em camundongos que receberam aplicações de formulações fotopro-

tetoras contendo o extrato etanólico bruto de *P. pseudocaryophyllus* em concentrações que variaram de 2-10%. No entanto, quando realizada a avaliação neurofarmacológica geral do extrato bruto de *P. pseudocaryophyllus*, Fajemiroye et al. (2012a) utilizaram as vias de administração oral, intraperitoneal e subcutânea e adotaram as doses de 500, 1.000 e 2.000 mg/kg. Contorções abdominais, redução da capacidade exploratória e alienação foram observadas após 10 minutos da administração intraperitoneal e 30 minutos após a administração oral das três doses testadas. A administração subcutânea do extrato bruto na dose de 2.000 mg/kg provocou redução na atividade motora espontânea e piloereção após 30 minutos. Após 60 minutos, os animais apresentaram ataxia. Os animais que receberam 2.000 mg/kg de extrato bruto pelas vias intraperitoneal e subcutânea foram a óbito em até 24h, enquanto aqueles que receberam essa mesma dose por via oral apresentaram tremores, convulsões e alterações comportamentais que podem estar relacionadas ao efeito geral depressor do extrato bruto de *P. pseudocaryophyllus*, como também podem ser interpretadas como sinais indicativos de neurotoxicidade. Por outro lado, Paula et al. (2012) também testaram doses orais de 500, 1.000 e 2.000 mg/kg em camundongos durante a realização de estudo que investigava as propriedades anti-inflamatória e antinociceptiva de *P. pseudocaryophyllus* e não observaram reações toxicológicas.

No único estudo toxicológico *in vivo* disponível na literatura, o extrato seco obtido das folhas de *P. pseudocaryophyllus*, (*E*)-metiliso Eugenol, foi administrado a ratas Wistar, por gavagem, nas doses de 2.000, 2.500 e 3.000 mg/kg, do dia gestacional (DG) 6 ao 15 (período da organogênese). Os resultados mostraram que, durante o período da organogênese, houve redução no ganho médio de massa corporal materna em todos os grupos tratados quando comparados ao controle. Todavia, o tratamento com o extrato não alterou o consumo de ração, nem o desempenho reprodutivo das progenitoras. Esses resultados sugerem que o extrato seco de *P. pseudocaryophyllus* apresenta toxicidade materna, sem, contudo, afetar a capacidade reprodutiva de ratas Wistar (CARDOSO et al., 2015, 2017).

Conclusão

O interesse científico pela espécie *P. pseudocaryophyllus* tem aumentado nos últimos anos devido ao aumento no número de publicações que investigam os aspectos botânicos e fitoquímicos, bem como as propriedades farmacológicas e toxicológicas dessa espécie medicinal brasileira. Todavia, a maioria das prospecções fitoquímicas analisou os óleos essenciais extraídos das folhas *P. pseudocaryophyllus*, fazendo-se, então, necessárias análises mais amplas envolvendo outros grupos de compostos vegetais e outras partes dessa planta medicinal. Os estudos farmacológicos, por sua vez, apontam para diferentes propriedades farmacológicas da espécie, embora a carência de estudos toxicológicos permaneça como uma grande lacuna na literatura dedicada à *P. pseudocaryophyllus*.

Referências

- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Biodiversidade brasileira. Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade dos biomas brasileiros.** Brasília, DF, 2002. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/chm/_arquivos/biodivbr.pdf>. Acesso em 01 nov. 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápico.** Brasília, DF, 2009. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/programa_nacional_plantas_medicinais_fitoterapicos.pdf>. Acesso em: 1 nov. 2014.
- CAMPANINI, M. Z.; PINHO-RIBEIRO, F. A.; IVAN, A. L.; FERREIRA, V. S.; VILELA, F. M.; VICENTINI, F. T. ; MARTINEZ, R. M.; ZARPELON, A. C.; FONSECA, M. J.; FARIA, T. J.; BARACAT, M. M.; VERRI, W. A. Jr; GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R. Efficacy of topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract against UVB-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 127, p. 153-160, 2013.
- CAMPANINI, M. Z.; CUSTÓDIO, D. L.; IVAN, A. L.; MARTINS, S. M.; PARANZINI, M. J.; MARTINEZ, R. M.; VERRI, W. A. Jr; VICENTINI, F. T.; ARAKAWA, N. S.; FARIA T. J.; BARACAT, M. M.; CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R. Topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract: in vitro antioxidant activity and in vivo efficacy against UV-B-induced

oxidative stress. **American Association of Pharmaceutical Scientists – PharmSciTech**, v. 15, n. 1, p. 86-95, 2014.

CARDOSO, B. S.; MACHADO, K. B.; SILVA, L. R. M.; PAULA, J. R.; PAULA, J. A. M.; CRUVINEL, W. M.; AMARAL, V. C. S. Reproductive toxicology evaluation of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum, (*E*)-methyl isoeugenol chemotype, in Wistar rats. In: 51st Congress of the European Societies of Toxicology – EUROTOX, 2015. Porto, Portugal. **Toxicology Letters**, v. 238. p. S368-S369, 2015.

CARDOSO, B. S.; MACHADO, K. B.; PAULA, J. R.; PAULA, J. A. M.; CRUVINEL, W. M.; AMARAL, V. C. S. Developmental toxicity evaluation of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum, (*E*)-methyl isoeugenol chemotype, in Wistar rats. **Birth Defects Research**, 2017. Aug 1. [Epub ahead of print]. doi: 10.1002/bdr2.1075.

CUSTÓDIO, D. L.; BURGO, R. P.; MORIEL, B.; BARBOSA, A. M.; REZENDE, M. I.; DANIEL, J. F. S.; PINTO, J. P.; BIANCHINI, E.; FARIA, T. J. Antimicrobial activity of essential oils from *pimenta pseudocaryophyllus* and *Tynanthus micranthus*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 6, p. 1363-1369, 2010.

D'ANGELIS, A. S. R. **Extrativismo e comercialização de Cataia – *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum (Myrtaceae) – na Ilha do Superagui (Guaraqueçaba, PR): situação atual, implicações e perspectivas**. 2013. 89 f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2013.

D'ANGELIS, A. S. R.; NEGRELLE, R. R. B. *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum: aspectos botânicos, ecológicos, etnobotânicos e farmacológicos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 3, p. 607-617, 2014.

EL ASSAL, F. E.; PAULA, J. A. M.; CAPELETTI, L. S.; ABRÃO, F. Y.; ATAÍDES, F. S.; SÁ, F. A. S.; COSTA, C. R.; ERNANDES, O. F. L.; SOUZA, L. K. H.; SILVA, M. R. R. *Pimenta pseudocaryophyllus* inhibits virulence factors and promotes metabolic changes in *Candida* yeast. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 5, p. 618-623, 2014.

FAJEMIROYE, J. O.; GALDINO, P. M.; ALVES, S. F.; PAULA, J. A. M.; PAULA J. R.; GHEDINI, P. C.; COSTA, E. A. Involvement of 5-HT1A in the anxiolytic-like effect of dichloromethane fraction of *Pimenta pseudocaryophyllus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, p. 872-877, 2012a.

FAJEMIROYE, J. O.; MARTINS, J. L. R.; BRITO, A. F.; GALDINO, P. M.; PAULA J. R.; PAULA, J. A. M.; COSTA, E. A. Central activities of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum. **International Journal of Medicine and Aromatic Plants**, v. 2, n. 1, p. 118-122, 2012b.

FAJEMIROYE, J. O.; MARTINS, J. L. R.; GHEDINI, P. C.; GALDINO, P. M.; PAULA, J. A. M.; PAULA, J. R.; ROCHA, F. F.; COSTA, E. A. Antidepressive-like property of dichloromethane fraction of *Pimenta pseudocaryophyllus* and relevance of monoamine metabolic enzymes. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, Article ID 659391, 2013.

FERNANDES, O. F. L. et al. Effects of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum, on melanized and non-melanized *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, v. 174, p. 421-428, 2012.

FERRARI, F. C.; LIMA, R. C. L.; FERRAZ FILHA, Z. S.; BARROS, C. H.; ARAÚJO, M. C. P. M.; GUIMARÃES, D. A. S. Effects of *Pimenta pseudocaryophyllus* extracts on gout: Antiinflammatory activity and anti-hyperuricemic effect through xantine oxidase and uricosuric action. **Journal of Ethnopharmacology**, v.180, p. 37-42, 2016.

LANDRUM, L. R. **Flora Neotropica: Monograph 45: Campomanesia, Pimenta, Blepharocalyx, Legrandia, Acca, Myrrhinium, and Luma (Myrtaceae)**. New York, NY: Organization for Flora Neotropica, 1986.

LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, v. 49, n. 4, p. 508-536, 1997.

LEGRAND, C. D.; KLEIN, R. M. Mirtáceas. In: REITZ, R. **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí, SC: Herbário Barbosa Rodrigues, 1978.

LIMA, M. E. L.; CORDEIRO, I.; YOUNG, M. C. M.; SOBRA, M. E. G.; MORENO, P. R. H. Antimicrobial activity of the essential oil from two specimens of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum (Myrtaceae) native from São Paulo State – Brazil. **Pharmacologyonline**, v. 3, p. 589-593, 2006.

MORGANTE, P. G.; SEBASTIÃO, I.; SILVEIRA, L. E. D.; MORI, G. M.; CONTE, M.; COFFANI-NUNES, J. V. Development of microsatellite markers for *Pimenta pseudocaryophyllus* (Myrtaceae), a wild South American species. **American Journal of Botany**, v.99, n.11, p. e434-e436, 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **WHO Traditional Medicine Strategy 2014-2023**. Genebra, Suíça, 2014. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js2200e/>>. Acesso em: 1 nov. 2014.

PAULA, J. A. M.; PAULA, J. R.; PIMENTA, F. C.; REZENDE, M. H.; BARA, M. T. F. Antimicrobial activity of the crude ethanol extract from *Pimenta pseudocaryophyllus*. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, n. 10, p. 987-993, 2009.

PAULA, J. A. M.; FERRI, P. H.; BARA, M. T. F.; TRESVENZOL, L. M. F.; SÁ, F. A. S.; PAULA, J. R. Infraespecific chemical variability in the essential oils of *Pimenta*

pseudocaryophyllus (Gomes) L. R. Landrum (Myrtaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, p. 643-650, 2011.

PAULA, J. A. M.; SILVA, M. R. R.; COSTA, M. P.; DINIZ, D. G. A.; SÁ, F. A. S.; ALVES, S. F.; COSTA, E. A.; LINO, R. C.; PAULA, J. R. Phytochemical analysis and antimicrobial, antinociceptive and anti-inflammatory activities of two chemotypes of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Myrtaceae). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, article ID 420715, 15 pages, 2012. doi:10.1155/2012/420715.

PAVARINI, R.; ANSANTE, T. F.; CACERES, D. P. Efeito do extrato aquoso de plantas sobre a broca da bananeira *Cosmopolites sordidus* Germar (Coleoptera: Curculionidae). **Nucleus**, v. 7, p. 203-208, 2010.

RIBEIRO, L. P.; ANSANTE, T. F.; NICULAU, E. S.; PAVARINI, R.; SILVA, M. F.; SEFFRIN, R. C.; VENDRAMIM, J. D. *Pimenta pseudocaryophyllus* derivatives: extraction methods and bioactivity against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology**, v. 44, n. 6, p. 634-642, 2015.

SANTOS, B. C. B. **Fitoquímica e ensaios biológicos de óleos essenciais de *Pimenta pseudocaryophyllus* e *Hedychium coronarium* da Mata Atlântica do Estado de São Paulo**. 2010. 92 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2010.

SUZUKI, E. Y.; BAPTISTA, E. B.; CARMO, A. M. R.; CHAVES, M. G. A. M.; CHICOUREL, E. L.; RAPOSO, N. R. B. Potential of the essential oil from *Pimenta pseudocaryophyllus* as an antimicrobial agent. **Acta Pharmaceutica**, v. 64, p. 379-385, 2014.

YOKOMIZO, N. K. S.; NAKAOKA-SAKITA, M. Atividade antimicrobiana e rendimento do óleo essencial de *Pimenta pseudocaryophyllus* var. *pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 3, p. 513-520, 2014.

3.

TECNOLOGIAS APLICADAS AO DESENVOLVIMENTO DE FITOTERÁPICOS

ALESSANDRA RIBEIRO SARTOR LIMA
EDEMILSON CARDOSO DA CONCEIÇÃO
JOELMA ABADIA MARCIANO DE PAULA

O desenvolvimento tecnológico de produtos fitoterápicos abrange múltiplas etapas, que percorrem desde a obtenção do insumo farmacêutico ativo vegetal até as ações de transformação farmacotécnica que viabilizam o medicamento fitoterápico (BASSANI; PETROVICK, 2017). O insumo farmacêutico ativo vegetal obtido na fase inicial de um trabalho será a base dos estudos de pré-formulação, formulação, estabilidade, transposição de escala produtiva e também estudos pré-clínicos e clínicos para obtenção de um medicamento fitoterápico. Dessa forma, é evidente a importância da qualidade do insumo desenvolvido, tanto no que diz respeito à segurança na sua administração terapêutica, quanto à sua *performance* no produto final (IZZIO et al., 2016).

O termo qualidade abrange as características variáveis que têm impacto significativo sobre um produto. Para fármacos à base de plantas, tais características variáveis incluem a origem da planta, sua identidade botânica, pureza, potência, estabilidade e teor de seus marcadores, podendo estender-se às boas práticas agrícolas e às boas práticas de fabricação que são também importantes e impactam diretamente na qualidade de fitoterápicos (CALIXTO, 2000; SHUKLA et al., 2009; ZHANG, 2012).

Neste capítulo serão abordadas as tecnologias aplicadas nos processos de obtenção e secagem de extratos vegetais e aspectos importantes sobre a padronização de extratos vegetais aplicáveis à produção de fitoterápicos.

Processos extrativos

O estudo das plantas medicinais começa com a pré-extração e extração, passos importantes no processamento dos constituintes bioativos. Métodos tradicionais, como maceração, percolação e extração de Soxhlet são comumente usados no ambiente de pesquisa ou até mesmo em pequenas empresas, porém apresentam limitações à produção de fitoterápicos, relacionadas ao seu rendimento, alto consumo de solvente e custo de produção. Essas limitações impulsionaram estudos que resultaram em importantes avanços no processamento de plantas medicinais, com o desenvolvimento de modernos métodos de extração. Dentre estes métodos, podem ser citados, a extração por micro-ondas (AZWANIDA, 2015), extração assistida por ultrassom (PAULA et al., 2016), extração com fluidos supercríticos (MUSHTAQ et al., 2014) e extração a quente com fluido pressurizado (CAMEL, 2001), as quais têm por objetivo comum aumentar o rendimento e diminuir o custo do processo extrativo. Além disso, as modificações nesses métodos são desenvolvidas continuamente, disponibilizando uma grande variedade de possibilidades extrativas.

Portanto, com a variedade de métodos existentes, a seleção do método de extração adequado requer uma avaliação meticulosa, que deve ir além da simples comparação dos rendimentos dos extratos brutos, gerando a necessidade de conhecer o fundamento e o impacto de cada técnica ao composto bioativo de interesse (GHOSH; HAQ; CHAKRABORTY, 2011; MUSHTAQ et al., 2014; PAULA et al., 2016; ZHOU et al., 2016).

Maceração

A maceração é uma técnica na qual a extração da matéria-prima vegetal (inteira ou em pó grosseiro) é realizada em um recipiente fechado

à temperatura ambiente, por um período prolongado de pelo menos três dias e sem renovação do líquido extrator. O processo visa suavizar e quebrar a parede da célula vegetal para liberar os compostos fitoquímicos solúveis, após o período de maceração a mistura é prensada e filtrada (HANDA, 2008).

A maceração não conduz ao esgotamento da matéria-prima devido à saturação do líquido extrator e ao equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula. Variações dessa técnica objetivam o aumento da eficiência de extração, entre elas, a digestão (maceração realizada com aquecimento entre 40 e 60 °C), maceração dinâmica (realizada sob agitação constante) e remaceração (onde a maceração é repetida utilizando a mesma matriz vegetal e o líquido extrator é renovado). Na maceração, a escolha do líquido extrator é determinante para o tipo de composto que se deseja extrair (BASSANI; PETROVICK, 2017; GHOSH; HAQ; CHAKRABORTY, 2011).

Percolação

A percolação é uma técnica dinâmica que consiste na utilização de um recipiente estreito, em forma de cone, aberto em ambas as extremidades (percolador), no qual a droga moída umedecida e intumescida é deixada em contato com o líquido extrator por 24 horas. Na sequência, o líquido extrator inicia a passagem através da droga empacotada no percolador. Então, o percolador é aberto e o líquido é deixado escorrer lentamente (PANDEY; TRIPATHI, 2014).

Tanto a maceração quanto a percolação são métodos de execução simples. No entanto, um grande volume de solventes é consumido, o que exige uma preocupação com o custo do processo e a gestão dos resíduos gerados durante a extração (AZWANIDA, 2015).

Extração de Soxhlet

Entre as técnicas tradicionais, a extração de Soxhlet é a mais citada em processos de otimização de novas técnicas extrativas, sendo considerada como referência devido a sua extração exaustiva (SULAIMAN et

al., 2011). O aparato de Soxhlet consiste em uma fonte de calor elétrica, um reservatório de solvente (frasco de destilação), que contém o solvente extrator, um corpo extrator (composto por um tubo que conduz o vapor ao condensador, um sifão e um cartucho poroso, que contém a amostra sólida) e um condensador de refluxo arrefecido com água. A amostra é colocada no cartucho, que é, então, posicionado no corpo do extrator. O solvente é vertido no frasco de destilação (reservatório de solvente) e o corpo extrator e o condensador são montados sobre o frasco, sequencialmente. O reservatório de solvente é, então, colocado sob aquecimento e, à medida que a temperatura aumenta, o solvente é vaporizado. Uma vez que o solvente chega ao condensador, condensa e escorre para baixo no corpo do extrator, entrando em contato com o cartucho que contém a amostra. À medida que o processo continua, a amostra é macerada com o solvente até atingir o volume desejado. No final de cada ciclo, aumenta-se a concentração do extrato no reservatório de solvente. Uma vez que o extrato tem uma temperatura de ebulição mais elevada do que o solvente, apenas o solvente puro atingirá o cartucho da amostra, aumentando, assim, a eficiência de extração. A característica inteligente desse método deve-se à pequena quantidade de solvente necessária para a realização de cada ciclo extrativo. Esse processo pode continuar durante vários ciclos (até 4 ciclos por hora dependendo do volume do solvente), enquanto que o tempo de extração total pode variar de 6 a 24 h, dependendo da matriz e da solubilidade dos compostos desejados (CASTRO; GARCÍA-AYUSO, 1998; SULAIMAN et al., 2011).

A extração de Soxhlet tradicional tem algumas vantagens, porque o aquecimento contínuo do solvente mantém a temperatura constante, evita o passo de filtração e permite que o rendimento de extração seja aumentado por corridas paralelas. As principais desvantagens incluem o longo período de extração e a possível degradação de compostos bioativos devido ao aquecimento contínuo do extrato no reservatório de solvente, além do que a amostra ideal para a extração Soxhlet é limitada a um sólido seco e finamente dividido. Muitos fatores do processo, como temperatura, relação solvente-amostra e

velocidade de agitação precisam ser avaliados para a melhor *performance* do método (AZWANIDA, 2015).

Por ser considerada um ponto de referência para outras técnicas de extração, há várias modificações da técnica para aumentar sua eficiência e superar seus inconvenientes, como a extração automática ou Soxtec e a extração Soxhlet assistida por micro-ondas, em que a energia provedora de calor é fornecida por micro-ondas ao invés do aquecedor elétrico (MUSHTAQ et al., 2014; PRIEGO-LÓPEZ et al., 2003; VIROT et al., 2007).

Extração assistida por micro-ondas

O método utiliza energia de micro-ondas para facilitar a partição de analitos da matriz da amostra para o solvente. A radiação de micro-ondas interage com dipolos de materiais polarizáveis (por exemplo, solventes e amostra), provoca aquecimento perto da superfície dos materiais e o calor é transferido por condução. A rotação de dipolo das moléculas induzidas por micro-ondas eletromagnéticas interrompe a ligação de hidrogênio, aumentando a migração de íons dissolvidos, e promove a penetração do solvente na matriz vegetal. Em solventes não polares, o aquecimento pobre ocorre quando a energia é transferida pelo dielétrico apenas por absorção. A extração por micro-ondas pode ser considerada um método seletivo que favorece moléculas e solventes polares com alta constante dielétrica (CAMEL, 2001; XIE et al., 2010).

Contudo, esse método está limitado a compostos fenólicos de pequenas moléculas, tais como ácidos fenólicos (ácido gálico e ácido elágico), quecertina, isoflavona e transresveratrol, porque essas moléculas são estáveis sob condições de aquecimento por micro-ondas até 100 °C, durante 20 minutos. Ciclos adicionais de extração em micro-ondas resultaram em diminuição drástica no rendimento de fenóis e flavanonas, causada principalmente pela oxidação de compostos (AZWANIDA, 2015; ESQUIVEL-HERNÁNDEZ et al., 2016; KARAMI et al., 2015; XU et al., 2017).

Como em qualquer tipo de método de extração, o solvente desempenha um papel importante na extração por micro-ondas e irá afetar a

eficiência do método. A escolha do solvente depende da interação do solvente com a matriz, da solubilidade do composto de interesse e da capacidade de absorção de micro-ondas. O solvente selecionado para esse método extrativo deve: ser compatível com a matriz da amostra; ser capaz de solubilizar o(s) compostos(s) alvo; ter capacidade de absorção de micro-ondas. A capacidade de absorção de micro-ondas dos solventes depende da sua constante dielétrica: em teoria, quanto maior a sua constante dielétrica, maior a sua capacidade de absorver energia e tornar-se quente (DEAN, 2009). Alguns solventes com suas constantes dielétricas correspondentes são mostrados na Tabela 1. A água tem a absorção de micro-ondas mais alta, enquanto que o hexano, o qual é literalmente transparente a micro-ondas, não aquece (TATKE; JAISWAL, 2011).

Os solventes podem ser utilizados separadamente ou em combinações, dependendo da natureza das extrações. As propriedades solventes podem ser modificadas utilizando misturas de diferentes polaridades e diferentes constantes dielétricas, para torná-las mais adequadas para diferentes compostos de interesse (MUSHTAQ et al., 2014).

Tabela 1 – Solventes comuns utilizados na extração por micro-ondas, pontos de ebulição e de fusão e constantes dielétricas (à 20 °C)

Solvente	Ponto de fusão (°C)	Ponto de ebulição (°C)	Constante dielétrica (K)
Acetona	-95	56	20,7
Acetonitrila	-44	82	37,5
Clorofórmio	-64	61	4,81
Hexano	-95	69	1,89
Etanol	-114	78	24,5
Metanol	-98	65	32,7
Água	0	100	80,1

Fonte: Mushtaq et al. (2014).

As áreas de aplicação da extração assistida por micro-ondas são extensas e abrangem uma ampla gama de produtos, sendo amplamente

aplicadas para extração de moléculas voláteis, tais como óleos essenciais, com o benefício de melhor qualidade e maior rendimento do óleo essencial obtido. Muitos trabalhos de pesquisa nesse campo exibiram aceleração de cinética e melhoria de qualidade, pois a composição química dos óleos essenciais se assemelha à da planta fresca, sem qualquer contaminação do processo (BERKA-ZOUGALI et al., 2012; ESQUIVEL-HERNÁNDEZ et al., 2016).

Extração assistida por ultrassom

Entre as técnicas mais recentes, a extração assistida por ultrassom (EAU) tem se destacado por ser uma alternativa barata, com menor consumo de solvente, simples e eficiente, e que tem sido amplamente aplicada na extração de produtos naturais. Seu mecanismo de extração envolve cavitação, forças mecânicas e impacto térmico (ILBAY; SAHIN; KIRBASLAR, 2013; PAULA et al., 2016; WANG et al., 2013; ZOU et al., 2013).

A sonicação promove a formação de cavidades, para onde os gases dissolvidos no sistema migram, formando microbolhas, que aumentam e diminuem de tamanho, gerando ciclos de expansão, compressão e implosão, liberando calor e exercendo elevada pressão nas regiões próximas à implosão (CÁRCEL et al., 2012). As colisões causadas por esse ciclo fazem com que a célula vegetal seja rompida, facilitando a difusão do solvente extrator para o interior da matriz (PATIST; BATES, 2008). Soma-se, ainda, a esse processo, o calor liberado pelas implosões, que aumenta a solubilidade do soluto e favorece o aumento da eficiência da extração, possibilitando, simultaneamente, agitar a mistura e extrair os compostos em um tempo muito curto e utilizando pequena quantidade de solvente (CHEMAT et al., 2011; VILKHU et al., 2008).

Há evidências de que a EAU facilita o processo de extração de uma variedade de componentes alimentares (por exemplo, óleos, proteínas, polissacarídeos), bem como ingredientes bioativos (por exemplo, antioxidantes) de recursos vegetais e animais (VILKHU et al., 2008).

Estudos de Wong-Paz e colaboradores (2015), para avaliação do uso da EAU de polifenóis de plantas nativas do deserto mexicano,

demonstraram a eficiência do método nas preparações antioxidantes, com tempo médio de extração de 40 minutos e uso de solução hidroetanólica 35% (v/v).

Conforme Pradal e colaboradores (2016), a técnica de EAU tem sido largamente aplicada para a extração de antioxidantes devido à sua elevada eficiência em termos de rendimento de recuperação e taxa de extração. O processo de EAU para a obtenção de um insumo antioxidante, proveniente de polifenóis da espécie *Cichorium intybus* L. var. *sativum* (Asteraceae), mostrou-se adequado. Durante estudos preliminares, foi possível identificar o tempo de extração, o teor de etanol no solvente, a temperatura e a energia de ultrassom, como os principais parâmetros que influenciam o processo de extração (PRADAL et al., 2016).

Pesquisas para a avaliação cinética do processo de EAU de polifenóis, a partir da casca de *Picea abies* Karst. (Pinaceae) característica da área dos Cárpatos (Roménia), demonstraram que o efeito do ultrassom no processo de extração melhora significativamente a taxa de extração, sendo o teor de fenólicos duplicado em relação ao processo de extração clássico sem ultrassom. Analisando os dados comparativos entre a EAU à 323 K (Kelvin), por 30 minutos e 333 K, por 45 minutos, observou-se que a quantidade recuperada de cada composto fenólico individual aumentou, em alguns casos, de 1% para 37%, com a elevação da temperatura de 323 para 333 K. Por outro lado, um maior tempo de exposição à ação de ultrassom provocou uma suave diminuição de fenóis, devido à possível ocorrência de processos de degradação (LAZAR et al., 2016).

Extração com fluidos supercríticos

O fluido supercrítico ou também chamado de gás denso é uma substância que compartilha as propriedades físicas do gás e do líquido em seu ponto crítico. Fatores como temperatura e pressão são os determinantes que levam uma substância à sua região crítica. O fluido supercrítico comporta-se como um gás, mas tem a característica solvatante de um líquido (ABBAS et al., 2008; PATIL et al., 2014). Um exemplo é o CO₂ que se torna um fluido supercrítico a mais de 31,1 °C e 7380 kPa, sendo um excelente solvente para compostos não-polares, prontamente

disponível a baixo custo e com baixa toxicidade. A grande vantagem desse método consiste na possibilidade de alteração da seletividade de extração por mudanças na temperatura ou pressão do gás (BASSANI; PETROVICK, 2017). Além disso, mesmo que o CO₂ supercrítico ainda tenha pouca solubilidade para os compostos polares, a modificação, como a adição de pequena quantidade de etanol e metanol, permite extrair compostos polares e também produz extratos concentrados, à medida que o CO₂ vaporiza a temperatura ambiente. Um grande inconveniente desse método é o custo inicial do equipamento, que é muito elevado (MUSHTAQ et al., 2014).

Poucas são as substâncias que podem ser utilizadas como solventes na extração por fluidos supercríticos, as quais estão listadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Propriedades críticas dos solventes utilizados para a extração por fluidos supercríticos

Solvente	TC (K)	PC (MPa)	VC (cm ³ /mol)
Amônia	405,4	11,35	72,5
CO ₂	304,1	7,37	94,1
Metanol	512,6	8,09	118,0
n-Hexano	507,5	3,02	368
Água	647,1	22,06	55,9

Fonte: Mushtaq (2014).

Abreviaturas: TC-Temperatura crítica, PC-Pressão crítica, VC-Volume crítico.

Extração a quente com fluido pressurizado

Denominada extração de fluido pressurizado, extração acelerada de solvente (Dionex[®]), extração líquida pressurizada, extração pressurizada de solvente ou extração melhorada de solvente, essa técnica deriva em parte da extração com fluido supercrítico. Contudo, na extração à quente com fluido pressurizado, o agente extrator é mantido no seu estado líquido e, para atingir temperaturas elevadas, aplica-se uma pres-

são dentro da célula de extração, alcançando temperaturas em torno de 100-200 °C com solventes orgânicos clássicos. Desse modo, nessas condições de temperatura e pressão, o solvente pode ser considerado como estando num estado subcrítico, com vantajosas propriedades de transferência de massa. Portanto, essa técnica proporciona a capacidade de realizar extrações rápidas e eficazes, pois o uso de temperaturas elevadas proporciona a diminuição da viscosidade do solvente, ajuda a interromper as interações soluto-matriz e aumenta os coeficientes de difusão. Além disso, a temperatura elevada favorece a solubilização dos compostos pelo solvente devido a uma alteração nos seus coeficientes de distribuição. Finalmente, a pressão favorece a penetração do solvente na matriz, o que novamente favorece a extração e o aumento da temperatura melhora a eficiência da extração devido ao aumento da taxa de transferência de massa e taxas de difusão (CAMEL, 2001; OSORIO-TOBÓN; MEIRELES, 2013).

A extração com fluido pressurizado é uma alternativa atraente, porque permite extração rápida e consumo reduzido de solventes, caracterizada por ser facilmente automatizada. Tem sido frequentemente utilizada na extração de vários compostos bioativos, tais como flavonoides, polifenóis e vários compostos antioxidantes a partir de matrizes naturais. Considerada uma alternativa mais econômica que a extração exaustiva por Soxhlet, permite alto rendimento em um tempo reduzido (GARCIA-MENDONZA et al., 2017; OSORIO-TOBÓN; MEIRELES, 2013).

Processo de secagem de extratos vegetais

O desenvolvimento tecnológico de extratos secos tem proporcionado uma crescente expansão de formas fitoterápicas sólidas. No Brasil, dos 512 medicamentos fitoterápicos registrados até outubro de 2007, 71,93% foram de formas farmacêuticas sólidas (CARVALHO et al., 2008). A matéria-prima para esses produtos é constituída, majoritariamente, por extratos secos, os quais possuem como vantagens a maior estabilidade química, físico-química e microbiológica, fácil padronização, maior concentração de compostos ativos e elevada capacidade de

transformação em diferentes tipos de formas farmacêuticas (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

Dentre as técnicas de secagem conhecidas, a secagem por aspersão ou atomização (*spray drying*) é uma das principais técnicas aplicadas a extratos vegetais (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010). Esse processo foi reconhecido pela primeira vez há 129 anos, mas os princípios básicos de operação permanecem essencialmente os mesmos, isto é, um processo de energia intensiva, contínua e escalável, que pode gerar partículas de tamanho nanométrico a micrométrico, com distribuição estreita em um período de tempo muito curto (HUANG et al., 2006).

Historicamente, a secagem por aspersão tem sido extensivamente utilizada na indústria química e de alimentos, porém, seu uso foi rapidamente estendido para outras áreas da indústria, incluindo a indústria farmacêutica, principalmente na obtenção de insumos farmacêuticos ativos e, a partir de então, sua aplicação tem aumentado ainda mais com a aplicação especializada para obtenção de microcápsulas, partículas de liberação controlada, micropartículas, nanopartículas e lipossomas (SINGH; MOOTER, 2015). Nessa técnica, pequenas gotas do extrato são geradas por atomização durante a alimentação líquida, o que aumenta a área superficial de contato do extrato líquido com um fluxo de ar quente, provocando uma evaporação muito rápida do solvente, evitando a degradação de compostos bioativos, preservando, portanto, a bioatividade do extrato (CORTÉS-ROJAS; SOUZA; OLIVEIRA, 2015).

A definição das condições de funcionamento e o *design* do secador dependem das características de secagem desejáveis ao produto final (extrato seco) e da especificação requerida do pó. O produto final deve geralmente respeitar padrões de qualidade precisos como, por exemplo, tamanho de partícula, distribuição do tamanho de partícula, massa e densidade das partículas, friabilidade, dispersibilidade e teor de umidade. A massa e a densidade das partículas são importantes, uma vez que têm uma influência sobre os custos de transporte, definição de embalagem e até mesmo sobre a cor geral do produto. O teor de umidade, o tamanho de partícula, a distribuição do tamanho de partí-

cula, a morfologia da partícula, a densidade aparente e fluidez do pó são, da mesma maneira, características importantes para a qualidade do pó obtido. A capacidade de controlar tais características é uma grande vantagem do processo de secagem por aspersão em relação a outros métodos de secagem, especialmente quando se trata de produtos de elevado desempenho. Muitas propriedades a granel em pó e em partículas estão relacionadas com a morfologia das partículas (WALTON; MUMFORD, 1999).

A introdução do conceito de difusão seletiva de Thijssen durante a década de 1970 levou a uma maior compreensão de como as variáveis do processo, como temperatura do ar de secagem, fluxo de alimentação, porcentagem de adjuvantes e condições de atomização podem ser otimizadas para dar maior retenção volátil, por exemplo, aroma e sabor de produtos alimentícios. Do mesmo modo, estudos morfológicos sobre partículas secas proporcionam uma visão valiosa dos fundamentos da secagem de gotículas, assim como das suas características físico-químicas. Esses estudos permitem a comparação das taxas de secagem entre diferentes produtos e permitem a seleção e melhoria das condições do processo, permitindo uma concepção e simulação do processo de secagem (WALTON; MUMFORD, 1999).

A secagem por aspersão é uma abordagem eficiente para a microencapsulação de bioativos (BAKAR et al., 2013; SOUKOULIS et al., 2014; SUN-WATERHOUSE et al., 2013). Porém, a aderência do pó após secagem é um importante problema de derivados vegetais, principalmente aos que apresentam altas concentrações de açúcares de baixo peso molecular e ácidos orgânicos (BHANDARI et al., 1997). Adjuvantes de secagem de elevado peso molecular, tais como a maltodextrina e o dióxido de silício coloidal, são frequentemente adicionados ao extrato líquido antes da secagem por pulverização para contornar esse problema, reduzindo, ao mesmo tempo, a higroscopicidade do pó (RIGHETTO; NETTO, 2005; SAÉNZ et al., 2009).

As maltodextrinas, que compreendem unidades de D-glicose ligadas principalmente através de ligações glicosídicas (1→4), são consideradas seguras pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos

EUA e têm sido amplamente utilizadas nos processos de secagem por *spray drying* para produtos alimentícios (BAKAR et al., 2013; VILLACREZ et al., 2014).

Sun-Waterhouse e Waterhouse (2015), em seu trabalho para o desenvolvimento de um processo por *spray drying* para dispersos do suco de kiwi verde e dourado, descreveram o método de secagem por aspersão como eficaz para preservar, através da encapsulação *in situ*, os pigmentos e antioxidantes incluindo vitamina C, fenólicos e carotenoides do sumo de kiwi, produzindo pós com densidade desejável para embalagem (isto é, 0,40-0,57 g/cm³), propriedades satisfatórias de reconstituição em água (eficiência de dissolução 21-28 s, viscosidade 2-23 mPa.s) e boa vida útil (ou seja, baixo risco de deterioração microbiana devido a valores de atividade de água de 0,22-0,28). A maltodextrina foi o adjuvante de secagem escolhido neste estudo, utilizado em quantidade mínima, visando a melhores propriedades físico-químicas, de segurança e salutaras do produto final (SUN-WATERHOUSE; WATERHOUSE, 2015).

O dióxido de silício coloidal, que apresenta elevada superfície específica e alto poder sorvente, é extensivamente empregado como adjuvante de secagem e apresenta excelentes resultados na obtenção de produtos secos por aspersão a partir de soluções extrativas de diferentes espécies vegetais (CAMPOS, 1996; SOUZA, 1997; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010). Porém, conforme a Notificação da Determinação GRAS (*Generally Recognized As Safe*) do dióxido de silício, quando adicionado diretamente ou indiretamente a alimentos humanos, emitida pelo FDA, esse adjuvante apresenta perfil de toxicidade aguda de moderado a baixa, sendo seu uso aprovado e classificado como seguro em concentrações de até 2% (p/p) em alimentos, o que limita em muito o emprego do dióxido de silício como adjuvante em processo de secagem de extratos com baixo teor de sólidos.

A influência da concentração de dióxido de silício coloidal foi analisada na secagem de soluções extrativas de *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reissek. (Celastraceae). A adição desse adjuvante a 10% e a 20%, em relação ao teor de sólidos na solução extrativa, causou redução

significativa na higroscopicidade dos produtos secos, não ocorrendo formação de aglomerados (CARVALHO, 1997).

Em estudos com o extrato de *Bidens pilosa* L. (Asteraceae), Cortés-Rojas e colaboradores (2015) concluíram que o processo de secagem por aspersão foi eficaz na produção de extratos secos padronizados, obtendo pós com maior teor de compostos bioativos e maior atividade antioxidante a temperaturas de secagem de entrada menores e com maior fluxo de entrada. A temperatura de secagem mais baixa na saída aumentou o teor de umidade do produto, o que melhorou as propriedades de escoamento. No que diz respeito às composições de secagem, verificou-se que os menores tamanhos de partículas foram obtidos quando a proporção de dióxido de silício aumentou em relação à celulose microcristalina. Observou-se, ainda, maior recuperação do produto com maior proporção de dióxido de silício coloidal, maior temperatura de entrada e maior taxa de fluxo de alimentação do extrato (CORTÉS-ROJAS; SOUZA; OLIVEIRA, 2015).

Padronização de extratos vegetais

Em geral, todos os medicamentos, sejam eles sintéticos ou de origem vegetal, devem satisfazer os requisitos básicos de segurança e eficácia (BRASIL, 2014; EMEA, 2005; OMS, 1988, 1996, 1998, 2000). A matéria-prima vegetal está propensa a uma grande variação de seus constituintes, devido a vários fatores como local de coleta (ex. plantas nativas e naturalizadas), tempo e época de coleta, diferentes condições ambientais (causas primárias como luz e umidade), variações genotípicas e quimiotípicas e presença de xenobióticos (substâncias químicas estranhas encontradas dentro de um organismo que naturalmente não se espera que ocorram) (KULEN et al., 2012). Dessa forma, há necessidade de se estabelecer e executar testes de controle de qualidade para garantir a qualidade, tanto da droga vegetal quanto do medicamento fitoterápico, com cuidados desde a identificação adequada da planta, estação e local de coleta, métodos de extração e purificação (AHMED; HASAN, 2015).

A palavra padronização deve englobar todo o campo de estudo, desde o cultivo de plantas medicinais até a sua aplicação clínica, e focar

todos os aspectos da pesquisa com plantas medicinais, tais como a etnofarmacologia (uso medicinal tradicional), a utilização em doenças específicas, o isolamento e identificação de agentes ativos para avaliação da eficácia, segurança, formulação e avaliação clínica. A padronização é um código de conduta que visa garantir a substância correta em quantidade correta para o efeito terapêutico desejado (segurança, qualidade e eficácia). Descreve todas as medidas a serem tomadas durante o processo de fabricação e controle de qualidade de forma a se alcançar qualidade reprodutível de um determinado produto, confirmar a identidade da droga vegetal (autenticação) e determinar sua qualidade e pureza (SHUKLA et al., 2009).

O controle de qualidade de insumos farmacêuticos ativos vegetais necessita da avaliação constante de fontes de variabilidade para a qualidade química do insumo, de maneira que seja possível estabelecer especificações de concentrações para compostos que estejam relacionados ou que sejam indicativos da resposta clínica (SOARES; FARIAS, 2017). Padrões para fitoterápicos estão sendo desenvolvidos em todo o mundo, mas ainda não há consenso sobre como devem ser adotados. A padronização, a estabilidade e o controle de qualidade dessa classe de medicamentos são viáveis, mas difíceis de realizar (MATHEW; BABU, 2011).

O controle de qualidade de fitoterápicos é realizado através da aplicação de métodos químicos, físico-químicos e biológicos específicos, os quais devem ser aplicados em toda a cadeia produtiva, abrangendo a qualificação da matéria-prima, insumos e produto acabado. Essa avaliação compreende, principalmente, três fatores, que são: autenticidade, integridade e pureza. Nesse contexto, na avaliação da qualidade de um material vegetal, podem estar envolvidas análises para a caracterização organoléptica, identificação macroscópica e microscópica do órgão vegetal, pesquisa de materiais estranhos, contaminantes biológicos, umidade, cinzas totais, cinzas insolúveis em ácido e análises qualitativas e quantitativas dos marcadores químicos (compostos ou classe de compostos presentes na matéria-prima vegetal, correlacionado com o efeito terapêutico e utilizado como referência no controle de qualidade dos produtos derivados da espécie) (BRASIL, 2014; FONSECA et al., 2010; KULEN et al., 2012; ZOU, 2010).

Padronizar um extrato significa estabelecer a relação ideal entre droga vegetal x extrato e a relação extrato x marcador. Muitos extratos são comercializados sem ao menos apresentar a concentração dos princípios ativos. A utilização de extratos padronizados colabora significativamente para assegurar a eficácia de um fitoterápico, garantindo sua segurança e qualidade (ISAAC et al., 2008).

O uso de extratos padronizados centrados em grupos específicos de princípios ativos visando garantir a homogeneidade química do produto lote a lote, pode contribuir para a melhoria da qualidade das matérias-primas vegetais e, conseqüentemente, dos medicamentos assim elaborados (BARA, 2006; CALIXTO, 2000).

Referências

ABBAS, K.A.; MOHAMED, A.; ABDULAMIR, A.S.; ABBAS, H.A. A review on super-critical fluid extraction as new analytical method. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 4, p. 345-353, 2008.

AHMED, S.; HASAN, M.M. Standardization of crude drugs: precise review. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 4, p. 155-174, 2015.

AZWANIDA, N. N. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 4, p. 1-6, 2015.

BAKAR, J., EE, S.C., HASHIM, D.M.; ADZAHAN, N. Spray-drying optimization for red pitaya peel (*Hylocereus polyrhizus*). **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, p.1332-1342, 2013.

BARA, M.T.F.; RIBEIRO, P.A.M.; ARANTES, M.C.B.; AMORIM, L.L.S.S.; PAULA, J.R. Determinação do teor de princípios ativos em matérias-primas vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p. 211-215, 2006.

BASSANI, V.L.; PETROVICK, P.R. Desenvolvimento tecnológico de produtos farmacêuticos a partir de produtos naturais. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Org.) **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. p.129-145.

BERKA-ZOUGALI, B.; FERHAT, M.; HASSANI, A.; CHEMAT, F.; ALLAF, K.S. Comparative study of essential oils extracted from Algerian *Myrtus communis* L. leaves using microwaves and hydrodistillation. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, p. 4673-4695, 2012.

BHANDARI, B. R.; DATTA, N.; HOWES, T. Problems associated with spray drying of sugar-rich foods. **Drying Technology**, v. 15, p. 671-684, 1997.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília. Capítulo I, Seção III, 2014.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (Phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CAMEL, V. Recent extraction techniques for solid matrices-supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. **Analyst**, v.126, p.1182-1193, 2001.

CAMPOS, A.M. **Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de *Ilex paraguariensis* St. Hill. Aquifoliaceae (erva-mate)**. 1996. 149 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS. Porto Alegre, 1996.

CÁRCEL, J.A.; PÉREZ, J.V.G.; BENEDITO, J.; MULET, A. Food process innovation through new technologies: use of ultrasound. **Journal of Food Engineering**, v. 110, p. 200–207, 2012.

CARVALHO, E.L.S. **Desenvolvimento de produtos secos nebulizados de *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reissek – Celastraceae (espinheira-santa)**. 1997. 133 f. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS. Porto Alegre. 1997.

CARVALHO, A.C.B.; BALBINO, E.E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J.P.S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p. 314-319, 2008.

CASTRO, M.D.L.; GARCÍA-AYUSO, L.E. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. **Analytica Chimica Acta**, v.369, p. 1-10, 1998.

CHEMAT, F.; HUMA, Z.; KHAN, M.K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18 p. 813-835, 2011.

CORTÉS-ROJAS, D.F.; SOUZA, C.R.F.; OLIVEIRA, W.P. Optimization of spray drying conditions for production of *Bidens pilosa* L. dried extract. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 93, p. 366-376, 2015.

DEAN, J.R. **Extractions Techniques in Analytical Sciences**. Wiley: Chichester; UK, 2009.

EMA. European Medicines Agency. Guidelines on Quality of Herbal Medicinal Products/Traditional Medicinal Products. **European Agency for the Evaluation of Medicinal Products**, London, rev. 2, p.1-13, 2005. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/09/WC500113209.pdf

ESQUIVEL-HERNÁNDEZ, D.A.; LÓPEZ, V.H.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, J.; ALEMÁN-NAVA, G.S.; CUÉLLAR-BERMÚDEZ, S.P.; ROSTRO-ALANIS, M.; PARRA-SALDÍVAR, R. Supercritical Carbon Dioxide and Microwave-Assisted Extraction of Functional Lipophilic Compounds from *Arthrospira platensis*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 1-11, 2016.

FONSECA F.N.; SILVA A.H.; LEAL, L.K.A.M. *Justicia pectoralis* Jacq. Acanthaceae: preparation and characterisation of the plant drug including chromatographic analysis by HPLC-PDA. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 871-877, 2010.

GARCIA-MENDONZA, M.P.; ESPINOSA-PARDO, F.A.; BASEGGIO, A.M.; BARBERO, G.F.; JUNIO, M.R.M.; ROSTAGNO, M.A. Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from juçara (*Euterpe edulis* Mart.) residues using pressurized liquids and supercritical fluids. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 119, p. 9-16, 2017.

GHOSH, U.; HAQ, M.A.B.; CHAKRABORTY, S. Application of systematic technologies for the extraction of novel phytoconstituents from pharmacologically important plants. **International Journal of Chemical and Analytical Science**, v. 2, p. 1153-1158, 2011.

HANDA, S.S. An Overview of Extraction Techniques for Medicinal and Aromatic Plants. In: HANDA, S.S.; KHANUJA, S.P.S.; LONGO, G.; RAKESH, D.D. **Extraction Technologies for medicinal and Aromatic Plants**. United Nations Industrial Development Organization and High Technology, Trieste, 2008. p.21-52.

HUANG, L.X.; FILKOVÁ, I.; MUJUMDAR, A.S. Industrial Spray Drying Systems. In: MUJUMDAR, A.S. **Handbook of Industrial Drying**. 3th ed. New York: CRC Press, 2006.

ILBAY, Z.; SAHIN, S.; KIRBASLAR, S.I. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of rosehip (*Rosa canina* L.) with response surface methodology. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 2804-2809, 2013.

ISAAC, V.L.B.; CEFALI, L.C.; CHIARI, B.G.; OLIVEIRA, C.C.L.G.; SALGADO, H.R.N.; CORRÊA, M.A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicadas**, v. 29, p. 81-96, 2008.

IZZO, A.A.; HOON-KIM, S.; RADHAKHRISHNA, R.; WILLIAMSON, E. A critical approach to evaluating clinical efficacy, adverse events and drug interaction of herbal remedies. **Phytotherapy Research**, v.30, p. 691-700, 2016.

KARAMI, Z.; EMAM-DJOMEH, Z.; MIRZAEI, H.A.; KHOMEIRI, M.; MAHOONAK, A. S.; AYDANI, E. Optimization of microwave assisted extraction (MAE) and soxhlet extraction of phenolic compound from licorice root. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 3242-3253, 2015.

KULEN, O. F.; EGHAREVBA, H. O.; AHMADU, P. O. Standardization of herbal medicines – A review. **International Journal of Biodiversity and Conservation**, v. 4, p. 101-112, 2012.

LAZAR, I; TALMACIU, A.I.; VOLF, I.; POPA, V. Kinetic modeling of the ultrasound– assisted extraction of polyphenols from Picea abies bark. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 32, p. 191-197, 2016.

MATHEW, L.; BABU, S. Phytotherapy in India: transition of tradition to technology. **Current Botany**. v. 2, p. 26-30, 2011.

MUSHTAQ, M.Y.; CHOI, Y.H.; VERPOORTE, R.; WILSON, E.G. Extraction for Metabolomics: Access to the Metabolome. **Phytochemical Analysis**, v.25, p. 291-306, 2014.

OLIVEIRA, O.W.; PETROVICK, P.R. Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 641-650, 2010.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **The International Pharmacopeia, Quality Specifications for Pharmaceutical Substances, Excipients, and Dosage Forms**. 3rd ed. Geneva: World Health Organization, 1988. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/38009/3/9241545364.pdf>

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines**: WHO Technical Report Series. Geneva: World Health Organization, 1996. Disponível em: <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Jh2984e/>

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Basic Tests for Drugs, Pharmaceutical Substances, Medicinal Plant Materials and Dosage Forms**. Geneva: World Health Organization, 1998. Disponível em: <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/h1793e/h1793e.pdf>

OMS. Organização Mundial da Saúde. **General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine**. Geneva: World Health Organization, 2000. Disponível em: <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/whozip42e/whozip42e.pdf>

OSORIO-TOBÓN, J.F.; MEIRELES, A.A. Recent applications of pressurized fluid extraction: curcuminoids extraction with pressurized liquids. **Food and Public Health**, v. 3, p. 289-303, 2013.

PANDEY, A.; TRIPATHI, S. Concept of standardization, extraction and pre-phytochemical screening strategies for herbal drug. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 2, p. 115-119, 2014.

PATIL, A.A.; SACHIN, B.S.; WAKTE, P.S.; SHINDE, D.B. Optimization of supercritical fluid extraction and HPLC identification of wedelolactone from *Wedelia calendulacea* by orthogonal array design. **Journal of Advanced Research**, v. 5, p. 629-635, 2014.

PATIST, A.; BATES, D. Ultrasonic innovations in the food industry: from the laboratory to commercial production. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.9, p.147-154, 2008.

PAULA, J.A.M.; BRITO, L.F.; CAETANO, K.L.F.N.; RODRIGUES, M.C.M.; BORGES, L. L.; CONCEIÇÃO, E.C. Ultrasound-assisted extraction of azadirachtin from dried entire fruits of *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae) and its determination by a validated HPLC-PDA method. **Talanta**, v.149, p.77-84, 2016.

PRADAL, D.; VAUCHEL P.; DECOSSIN S.; DHULSTER P.; DIMITROV K. Kinetics of ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from food by-products: extraction and energy consumption optimization. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 32, p.137-146, 2016.

PRIEGO-LÓPEZ, E.; VELASCOB, J.; DOBARGANES, M.C.; RAMIS-RAMOS, G.; CASTRO, M.D.L. Focused microwave-assisted Soxhlet extraction: an expeditive approach for the isolation of lipids from sausage products. **Food Chemistry**, v.83, p.143-149, 2003.

RIGHETTO, A.M.; NETTO, F.M. Effect of encapsulating materials on water sorption, glass transition and stability of juice from immature acerola. **International Journal of Food Properties**, v. 2, p. 337-346, 2005.

SAÉNZ, C.; TAPIA, S.; CHÁVEZ, J.; ROBERT, P. Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). **Food Chemistry**, v.114, p. 616-622, 2009.

SHUKLA, S.S; SARAF, S.; SARAF, S. Approaches towards standardization and quality assessment of herbals. **The Journal of Research and Education in Indian Medicine**, v.15, p. 25-32, 2009.

SINGH, A.; MOOTER, G.V. Spray drying formulation of amorphous solid dispersions. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 100, p. 27-50, 2015.

SOARES, L.A.L.; FARIAS, M.R. Qualidade de insumos farmacêuticos ativos de origem natural. In: SIMÕES C.M.O. (Org.). **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. p.83-106.

SOUKOULIS, C.; BEHBOUDI-JOBBEHDAR, S.; YONEKURA, L.; PARMENTER, C.; FISK, I. Impact of milk protein type on the viability and storage stability of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 using spray drying. **Food and Bioprocess Technology**, v.7, p. 1255-1268, 2014.

SOUZA, K.C.B. **Desenvolvimento de metodologia analíticas e tecnológicas na obtenção de extratos secos nebulizados de *Passiflora edulis* forma *flavicarpa***. 1997. 141 f. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS. Porto Alegre. 1997.

SULAIMAN, S.F.; SAJAK, A.A.B.; OOI, K.L.; SUPRIATNO; SEOW, E.M. Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw vegetables. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 506-515, 2011.

SUN-WATERHOUSE, D., WADHWA, S.S., WATERHOUSE, G.I.N. Spray-drying microencapsulation of polyphenol bioactives: a comparative study using different natural fibre polymers as encapsulants. **Food and Bioprocess Technology**, v.6, p. 2376-2388, 2013.

SUN-WATERHOUSE, D.; WATERHOUSE, G.I.N. Spray-drying of green or gold kiwifruit juice–milk mixtures: novel formulations and processes to retain natural fruit colour and antioxidants. **Food Bioprocess Technology**, v. 8, p.191-207, 2015.

TATKE, P.; JAISWAL, Y. An overview of microwave assisted extraction and its application in herbal drug research. **Journal of Plant Research**, v.5, p. 21-31, 2011.

VILLACREZ, J. L.; CARRIAZO, J. G.; OSORIO, C. Microencapsulation of Andes berry (*Rubus glaucus* Benth.) aqueous extract by spray drying. **Food and Bioprocess Technology**, v.7, p. 1445-1456, 2014.

VILKHU, K.; MAWSON, R.; SIMONS, L.; BATES, D. Applications and opportunities for ultrasound-assisted extraction in the food industry-A review. **Innovative Food Science Emerging Technologies**, v. 9, p. 161-169, 2008.

VIROT, M.; TOMAO, M.; COLNAGUI, G.; VISINONI, F.; CHEMAT, F. New microwave-integrated Soxhlet extraction an advantageous tool for the extraction of lipids from food products. **Journal of Chromatography A**, v.1174, p. 138-144, 2007.

XIE, J.; XIE, M.; SHEN, M.; NIE, S.; LI, C.; WANG, Y. Optimisation of microwave-assisted extraction of polysaccharides from *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja using response surface methodology. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.90, p.1353-1360, 2010.

XU, D.; LI, Y.; MENG, X.; ZHOU, T.; ZHOU, Y.; ZHENG, J.; ZHANG, J.; LI, H. Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, p. 1-32, 2017.

WALTON, D. E.; MUMFORD C. J. Spray dried products characterization of particle morphology. **Institution of Chemical Engineers (ICHEME)**, v.77, p. 21-38, 1999.

WANG, X.; WU, Y.; CHEN, G.; YUE, W.; LIANG, Q.; WU, Q. Optimization of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from *Sparganii rhizoma* with response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, p. 846-854, 2013.

WONG-PAZ, J.E.; MÁRQUEZ, D.B.M.; ÁVILA, G.C.G.M.; CERDA, R.E.B.; AGUILAR, C.N. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from native plants in the Mexican desert. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, p. 474-481, 2015.

ZHANG, J.; WIDER, B.; SHANG, H.; LI, X.; ERNST, E. Quality of herbal medicines: Challenges and solutions. **Complementary Therapies in Medicine**, v.20, p. 100-106, 2012.

ZHOU, X.; CHOI, P.S.; YANG, JIA-MING; OR, P.M.Y.; HOI, P.M.; LEE, S.M.Y.; LEUNG, G.P.H; NAGAI, S.M.; KONG, S. K.; HO, H.P.; WONG, M.Y.M.; CHAN, S.W.; YEUNG, J. H.K.; KWAN, Y.W. Chemical and pharmacological evaluations on the extract of *Scutellaria baicalensis* Georgi (Huang-Qin) prepared by various extraction methods. **SpringerPlus**, v. 5, p.1438, 2016.

ZOU, T. B; JIA, Q.; LI, H.W.; WANG, C.X.; WU, H.F. Response surface methodology for ultrasound-assisted extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Marine Drugs**, v.11, p. 1644-1655, 2013.

4.

EXOPOLISSACARÍDEOS BACTERIANOS: CARACTERÍSTICAS E UTILIZAÇÃO¹

LUCAS LEONARDO DA SILVA
KARINA FREIRE D'EÇA NOGUEIRA SANTOS
PLÍNIO LÁZARO FALEIRO NAVES
CLAUDIA CRISTINA GARCIA MARTIN-DIDONET

Polissacarídeos são polímeros naturais constituídos por unidades monossacarídicas, produzidos por plantas, algas, animais e microrganismos. Devido à grande diversidade física e química observada em polissacarídeos de origem microbiana, este tem gerado grande interesse industrial, sendo foco de muitos estudos (LUVIELMO; SCAMPARINI, 2009; MACIEL et al., 2012).

Por apresentarem consistência viscosa em meio aquoso os polissacarídeos microbianos, são comumente conhecidos como gomas e podem ser classificados de acordo com sua localização em relação ao microrganismo, sendo: 1) intracelulares— polissacarídeos capsulares presentes dentro das células; 2) polissacarídeos de parede— associados à superfície das células, e 3) extracelulares — quando secretados para o meio externo, sendo denominados exopolissacarídeos (EPS) (MISHRA; JHA, 2013).

Com base na sua composição química, os EPS podem ser classificados como homopolissacarídeos, heteropolissacarídeos e polissacarídeos de estrutura irregular (MISHRA; JHA, 2013). Os homopolissaca-

1 Capítulo vinculado ao projeto de pesquisa “Caracterização bioquímica e molecular de bactérias associadas a *Oryza sativa* L. produtoras de biocompostos”, financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG).

rídeos são constituídos por um único tipo de monossacarídeo, como a dextrana, constituído apenas por D-glicose. Já os heteropolissacarídeos são compostos por duas ou mais moléculas de monossacarídeo em uma estrutura regular, como a gelana, formada por dois resíduos de β -D-glicose, um de α -L-ramnose e um de ácido β -D-glucurônico (ARANDA-SELVERIO et al., 2010; DONOT et al., 2012). Os EPS de estrutura irregular apresentam sequências variadas de monossacarídeos, como o alginato, constituído de ácidos α -L-gulurônicos e β -D-manurônicos em proporções distintas (MISHARA; JHA, 2013).

Foram identificados vários gêneros bacterianos produtores de EPS, que são utilizados biotecnologicamente nas indústrias (BARRETO et al., 2011; SAMPAIO, 2014; SUTHERLAND, 2001). Para a bactéria, a produção dos EPS está associada a diversas funções como: virulência, adesão e colonização de superfícies sólidas e proteção da célula microbiana contra ressecamento e outros estresses ambientais. Estes ainda podem participar da sinalização e interação entre planta-bactéria, além de fornecer proteção contra patógenos (BARRETO et al., 2011; LIU et al., 2013).

Dentre os grupos de polissacarídeos produzidos por bactérias, os EPS são os mais estudados, apresentando vantagens na obtenção, como menor número de etapas de purificação, por serem exsudados das células, produzindo, em geral, polissacarídeos em quantidade e qualidade com menor custo de obtenção (SHAH et al. 2000). Por essas características, têm sido preferidos quando comparados com EPS de outras fontes, por apresentam menor susceptibilidade às alterações climáticas com menor custo e tempo de produção (ERNANDES, GARCIA-CRUZ, 2005). Seu potencial biotecnológico tem sido demonstrado em diversos estudos, sendo utilizados em indústrias de alimento, farmacêutica, cosméticos, têxtil, petróleo, construção civil, entre outras (MORENO et al., 2000; SATHIYANARAYANAN; KIRAN; SELVIN, 2013; XIE et al., 2013).

Um dos passos iniciais no estudo dos EPS em bactérias é a identificação da capacidade de produção e, posteriormente, a determinação das melhores condições para sua síntese (MISHARA; JHA, 2013; SAMPAIO,

2014). Muitos autores têm demonstrado que alguns fatores podem contribuir de forma significativa para produção de EPS. Para algumas bactérias, a fonte de carbono é decisiva no processo de biossíntese do composto, determinando a quantidade e qualidade do produto sintetizado (GHARZOULI et al., 2012; RUAS-MADIEDO; DE LOS REYES, 2005). Assim, é possível, através de técnicas em meio de cultivo, manipular a composição, quantidade e qualidade de EPS. Outras condições de cultivo, como temperatura e pH, também podem ser utilizadas para determinar os parâmetros ideais para a produção e obtenção de polímeros específicos com baixo custo de produção (FERNANDES et al., 2010; GHARZOULI et al., 2012; MENESES et al., 2009).

A síntese dos polímeros requer, além das condições externas ideais, a presença de complexos enzimáticos específicos para cada espécie e composto, sendo a taxa de produção influenciada pelas condições ambientais (DE VUYST; DEGEEST, 1999). Desse modo, as moléculas produzidas podem apresentar grande diversidade de estrutura na composição monossacarídica, nas ligações entre as unidades da cadeia, na presença de cadeias laterais e na conformação estereoquímica (KUMAR; MODY, 2009; MISHARA; JHA, 2013).

Os processos de biossíntese dos diferentes tipos de polissacarídeos são bem complexos, envolvendo vários grupos de enzimas e proteínas. Em geral, podem ser observados quatro grupos dessas macromoléculas, envolvidas na: 1) absorção do substrato; 2) fosforilação do substrato; 3) polimerização; 4) nos passos de modificações pós-síntese e 5) proteínas de transporte e a exsudação (KUMAR; MODY, 2009). A síntese do EPS é controlada por genes localizados nos cromossomos ou elementos extracromossomais das bactérias, variando em função da espécie e/ou do polímero sintetizado (MISHARA; JHA, 2013).

No caso da produção de levanas e dextranas, homopolissacarídeos, a síntese ocorre extracelularmente, sendo necessária a presença de um substrato específico, em sua maioria, a sacarose. Durante a reação, uma glicosiltransferase promove a polimerização do EPS nas adjacências da parede celular, utilizando a energia resultante da hidrólise do substrato (CERNING, 1995). Já a síntese de heteropolissacarídeos requer um

maior gasto de energia e de várias unidades monossacarídicas formadas no citoplasma celular, sendo, posteriormente, translocadas para o meio extracelular, onde serão polimerizadas. Para os polissacarídeos de estrutura irregular, o processo de síntese assemelha-se à dos heteropolissacarídeos (DE VUYST, DEGEEST, 1999).

Como pode ser encontrada uma grande variação nos sistemas de biossíntese dos diferentes polímeros nos gêneros bacterianos, há estudos focando tanto a elucidação dos tipos dos biopolímeros, quanto dos diferentes mecanismos de síntese envolvendo vários grupos gênicos específicos para cada organismo (MISHARA; JHA, 2013).

Bactérias produtoras de exopolissacarídeos

Na natureza, vários grupos de bactérias são conhecidos como produtores de EPS, sendo, na maior parte, pertencentes à Classe Proteobacteria. Muitos estudos têm demonstrado que as rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) ou *Plant-Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR), pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Beijerinckia*, *Azotobacter*, *Xanthomonas* e *Erwinia*, entre outros, são capazes de produzir grandes quantidades de EPS. Dessas, os EPS de *Xanthomonas campestris* (xantana), *Acetobacter xylinum* (celulose) e *Rhizobium* sp. (succinoglucana) já são utilizados em escala industrial (BARRETO et al., 2011; SUTHERLAND, 2001; VERMANI; KELKAR; KAMAT, 1995).

As bactérias da Classe Firmicutes, que englobam os gêneros *Lactobacillus* e *Bacillus*, também produzem EPS com propriedades importantes e são utilizados na elaboração de produtos alimentícios. Quando empregado na composição de produtos lácteos, resulta em uma melhora das características sensoriais e do valor nutritivo desses produtos, além de elevar sua viscosidade (BADEL; BERNARDI; MICHAUD, 2011). Segundo a FDA (*Food and Drug Administration*), instituição responsável pelos critérios de classificação de risco dos agentes biológicos, esses gêneros abrangem bactérias reconhecidas como seguras (FDA, 2017), o que facilita o uso de seus biopolímeros na constituição de alimentos e na produção de agentes biologicamente ativos (FIALHO et al., 2008).

Para a aplicação e utilização em processos e produtos, a bactéria fonte de EPS deve ser analisada e preencher os critérios de segurança microbiológica. Os órgãos responsáveis para determinar os critérios de segurança desses produtos são específicos para cada país, devido aos fatores regionais que influenciam a sobrevivência do agente biológico e na sua endemidade (BRASIL, 2006). No Brasil, são estabelecidos pelo Ministério da Saúde critérios de classificação de risco dos agentes biológicos, os quais utilizam como base diversos aspectos como: virulência, modo de transmissão, estabilidade do agente, concentração e volume, origem do material potencialmente infeccioso, disponibilidade de medidas profiláticas eficazes, disponibilidade de tratamento eficaz, dose infectante, tipo de ensaio e fatores referentes ao trabalhador (BRASIL, 2006).

Os agentes biológicos que afetam o ser humano, os animais e as plantas são ainda distribuídos em classes de riscos. Grande parte das bactérias estão classificadas como baixo risco individual e para coletividade (classe de risco 1), incluindo os agentes biológicos que não provocam danos ao organismo humano ou animal (BRASIL, 2006).

Em contrapartida, nos Estados Unidos, qualquer produto químico ou substância utilizada como suplemento em alimentos, cosméticos, medicamentos, material biológico dentre outros, adquire o "status" de GRAS (*Generally Recognized as Safe*), pela designação da FDA (FDA, 2017). Dentre os EPS mais utilizados comercialmente, quatro já são aprovados pelo FDA como aditivo alimentar: curdlana, dextrana, gelana e xantana (PORTILHO, 2002).

Para EPS produzidos por várias bactérias já foram estudadas e determinadas a composição química e estrutural, assim como as propriedades e aplicações desses biopolímeros (Tabela 1).

Propriedades e aplicações de exopolissacarídeos bacterianos

Os EPS bacterianos apresentam grande diversidade química e estrutural, o que permite uma ampla aplicação, devido a suas propriedades reológicas, sendo utilizados como aditivos em inúmeros produtos de diversificados segmentos industrial (MISHARA; JHA, 2013).

Tabela 1 – Propriedades e aplicações de EPS produzidos por alguns gêneros bacterianos

Exopolissacarídeos	Gênero/espécie	Aplicações
Alginate Composição: Ácidos α -L-gulurônicos e β -D-manurônicos	<i>Azotobacter vinelandii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. mendocina</i> , <i>P. putida</i>	Agente espessante, estabilizante, encapsulação e geleificação
Celulose Composição: β -glicose	<i>Acetobacter xylinum</i> ¹ , <i>Agrobacterium</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Rhizobium</i> sp.	Agente dispersante, geleificante, emulsificador e tratamento de queimaduras
Curdiana Composição: D-glicose	<i>Agrobacterium radiobacter</i> , <i>Alcaligenes faecalis</i> var. <i>mixogenes</i>	Agente dispersante, geleificante e retenção de água em alimentos processados
Dextrana Composição: D-glicose	<i>Lactobacillus hilgardii</i> , <i>Leuconostoc dextranicum</i> , <i>L. mesenteroides</i> , <i>Streptococcus mutans</i>	Agente geleificante, espessante e matéria prima para fabricação de medicamento
Gelana Composição: β -D-glicose, α -L-ramnose e ácido β -D-glucurônico	<i>Aureomonas elodea</i> , <i>Sphingomonas elodea</i> , <i>S. paucimobilis</i>	Agente geleificante
Levana Composição: Frutose	<i>Acetobacter suboxydans</i> , <i>Actinomyces viscosus</i> , <i>Aerobacter levanicum</i> , <i>Bacillus polymyia</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Corynebacterium laevaniformans</i> , <i>Erwinia amylovora</i> , <i>E. herbicola</i> , <i>Gluconobacter oxydans</i> , <i>Rhanella aquatilis</i> , <i>Streptococcus</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Zymomonas mobilis</i>	Agente espessante, estabilizante e aditivo de alimentos funcionais
Succinoglucana Composição: Galactose e glicose	<i>Agrobacterium</i> sp., <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Rhizobium</i> sp., <i>Sinorhizobium meliloti</i>	Agente geleificante e matriz imobilizadora de drogas
Xantana Composição: Glicose, manose e ácido glucurônico	<i>Xanthomonas campestris</i>	Agente espessante, estabilizante e emulsificante

¹ Espécie classificada atualmente como *Komagataeibacter hansenii*.

Fonte: Adaptado de Satpute et al. (2009) e Mishara e Jha (2013).

O termo reologia vem do grego *rheo* (fluxo) e *logos* (ciência), sendo proposto para descrever as deformações de sólidos e a fluidez de líquidos (LABA, 1993). As características reológicas dos EPS são propriedades importantes a serem consideradas quando utilizados para fins biotecnol-

lógicos, sendo que, em geral, há a necessidade de adequações no comportamento reológico do produto proposto, a fim de atender a sua finalidade, como por exemplo, o EPS deve possuir certo grau de elasticidade ou viscosidade quando utilizado como aditivo alimentício (BRETAS; D'ÁVILA, 2005; LEONARDI; MAIA CAMPOS, 2001).

Pela estrutura e composição, os EPS podem ser classificados em oito tipos mais comuns: alginato, celulose, curdlana, dextrana, gelana, levana, succinoglicana e xantana. Recebem a nomenclatura geral de gomas, possuindo, cada uma, características físico-químicas específicas e aplicações derivadas de suas especificidades (Tabela 1).

Alginato

O alginato é um polímero linear constituído de ácido α -L-gulurônico e β -D-manurônico unidos por ligações tipo β (1 $\rightarrow$ 4), arranjados em diversas proporções (Tabela 1), sendo um produto comercial obtido a partir de algas marrons marinhas. Entretanto, a partir dos anos 60, foram identificadas várias bactérias produtoras desse mesmo polímero, como algumas dos gêneros *Pseudomonas* e *Azotobacter* de ampla ocorrência nos habitats (MÜLLER; SANTOS; BRIGIDO, 2011; REMMINGHORST; REHM, 2009).

Estudos têm revelado semelhanças entre os alginatos de algas com os de origem bacteriana, sendo possível a substituição da fonte de obtenção tradicional do polímero e suas respectivas aplicações biotecnológicas, principalmente pelo custo de produção, pois a bacteriana é menor (REMMINGHORST; REHM, 2006).

Devido às suas propriedades, o alginato tem sido utilizado com espessante, estabilizante de emulsões e de espuma, na geleificação e formação de filmes e fibras sintéticas (MÜLLER; SANTOS; BRIGIDO, 2011). Na indústria farmacêutica, é utilizado como biomaterial na encapsulação e liberação de medicamentos, na fabricação de curativos e implantes dentários (DRAGET; TAYLOR, 2009; REMMINGHORST; REHM, 2006). No setor agrícola, é utilizado na formulação de inoculantes, prevenindo o dessecamento de sementes e raízes de plantas (KUMAR; MODY, 2009; SIMSEK et al., 2009).

Celulose

A celulose é um homopolissacarídeo linear constituído unicamente por moléculas de glicose unidas entre si por ligações glicosídicas β (1 $\rightarrow$ 4) (Tabela 1). É considerada o polímero mais abundante do mundo, sendo sua produção estimada de 10^{14} toneladas por ano (DONINI et al., 2010; SHODA; SUGANO, 2006). Além das plantas, vários gêneros bacterianos produzem celulose, sendo essas denominadas de nanocelulose devido a sua cristalinidade e a formação de nanofibras (LEE et al., 2014). Esse biopolímero apresenta elevado grau de pureza, polimerização e estabilidade mecânica, além de apresentar elevada capacidade de absorção de água (GAMA; GATENHOLM; KLEMM, 2013).

Na indústria, a celulose é utilizada na produção de papel, tecidos, cosméticos, alimentos, como agente dispersante, geleificante e emulsificador. Na área médica, tem sido usada no tratamento de queimaduras e úlceras e como componente de implantes dentários, ósseos e de substituições vasculares, devido a sua estabilidade física no corpo humano e por não desencadear a resposta imune (DONINI et al., 2011; GAMA; GATENHOLM; KLEMM, 2013). Sua aplicabilidade já foi relatada também para tratamento de lixo, na reciclagem de minerais e óleos e purificação de esgotos urbanos (DONINI et al., 2011).

Curdiana

A curdlana é um polímero pertencente à classe das moléculas conhecidas como D-glucanas, sendo constituída por moléculas de D-glicose, unidas por ligações β glicosídicas (Tabela 1). Foi descoberta em 1961, no Japão, e recebeu essa denominação devido à sua habilidade de coagulação, quando aquecida em solução (CUNHA; GÓMEZ; AMORIM, 2003; YUKIHIRO et al., 1991). O polímero sintetizado por bactérias do gênero *Alcaligenes* e *Agrobacterium* foi introduzido no mercado para melhorar a textura e capacidade de retenção de água em alimentos processados (KIM et al., 2000; YUKIHIRO et al., 1991). Seu uso foi aprovado pela FDA, em 1996, sendo utilizada na indústria alimentícia como aditivo alimentar, principalmente em alimentos de

baixo valor calórico, como geleias (CUNHA; GÓMEZ; AMORIM, 2003; KUMAR; MODY, 2009).

Dextrana

A dextrana é uma classe de homopolissacarídeos bacterianos formado por unidades D-glicose com ligações α -glicopiranosil (1 $\rightarrow$ 6) (Tabela 1). A produção do polímero é mediada por diversas enzimas, como as dextranassacarases, glucanassacarases e glicosiltransferases. Dentre as bactérias produtoras de dextrana, destacam-se as da família *Lactobacillaceae*, sobretudo a espécie *Leuconostoc mesenteroides*, utilizada na produção em escala industrial (GIL et al., 2008; MEHVAR, 2000; VIET; BECK-CANDANEDO; GRAY, 2008).

A dextrana apresenta diversas aplicações industriais, sendo o principal uso voltado para a indústria clínica e farmacêutica, pois esse biopolímero é empregado como matéria-prima para fabricação de medicamentos, expansor e substituto do plasma sanguíneo, além de compor soluções para preservação de órgãos humanos em procedimentos cirúrgicos (RODRIGUES, 2003). Ainda tem aplicação na produção de géis para purificação e separação de moléculas, como proteínas e ácidos nucleicos, com diferentes graus de porosidade (NAESSENS et al., 2005). Na indústria de alimentos é empregado no preparo de sorvetes, geleias, doces, chicletes e xaropes, por suas propriedades como inibidor de cristalização, agente geleificante e espessante (KUMAR; MODY, 2009).

Gelana

A gelana é um heteropolissacarídeo bacteriano que contém repetição de dois resíduos de β -D-glicose, um de α -L-ramnose e ácido β -D-glucurônico, respectivamente, sintetizado especialmente por algumas espécies do gênero *Sphingomonas* (Tabela 1). Comparada aos outros EPS, a gelana possui propriedades com maior estabilidade termal em condições ácidas, sendo géis que possuem elasticidade e rigidez ajustável através da adequação da composição (FIALHO et al., 2008; JANS-SON et al., 1983).

Esse polissacarídeo é muito utilizado atualmente na indústria alimentícia, como agente geleificante e aditivos em produtos derivados do leite e bebidas (KIANI et al., 2010). Já na indústria farmacêutica, como agente de revestimento ou formador de matriz para liberação controlada (VILLANOVA et al., 2010).

Levana

A levana é um EPS constituído predominantemente por polímero de frutose formado por reações de transfrutossilacção, catalisadas pela enzima levanassacarase. Foi inicialmente descrita em 1943, em cepas de *Bacillus subtilis*, *B. polymyxa* e *Aerobacter levanicum* (ARVIDSON; RINEHART; GADALA-MARIA, 2006; SANTOS; CAVALCANTI; CELLIGOI, 2011; YAMAMOTO et al., 1985).

A levana possui ampla aplicação industrial, com destaque na indústria alimentícia, onde é utilizada como espessante em vários alimentos, estabilizante e fixador de sabores e cores, e ainda usada na elaboração de produtos dietéticos, pois o polímero de frutana possui baixa absorção (PAULA et al., 2008). Nos alimentos funcionais ou probióticos, como iogurte, a levana representa um eficiente aditivo, podendo influenciar de modo benéfico o funcionamento do trato intestinal e o balanço nutricional do organismo humano (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2005). Além disso, a levana produzida por *Zymomonas mobilis*, demonstra grande potencial terapêutico, por exemplo, ação anticarcinogênica (CALAZANS et al., 2000), anti-inflamatória (VIGANTS; RICKS; MARX, 2001), imunomoduladora (YOO et al., 2004) e hipocolesterolêmica (YAMAMOTO et al., 1999).

Succinoglucana

As succinoglucanas são heteropolissacarídeos ácidos compostos por repetições de octassacarídeos, de resíduos de galactose e glicose (Tabela 1), sendo polímeros estáveis em condições de alta temperatura, pressão e pH (SIMSEK et al., 2009). Sua produção é mais conhecida e estudada em bactérias associadas a plantas como as rizobactérias, promotoras de crescimento de plantas (RPCP), pois os EPS atuam

durante o processo de invasão da bactéria e formação do nódulo em leguminosas para que ocorra a fixação biológica do nitrogênio (SERRATO et al., 2008). Essas bactérias são consideradas seguras (classe de risco 1) e são capazes de sintetizar quantidades consideráveis em cultivo *in vitro* (ARANDA-SELVERIO et al., 2010; BRASIL, 2006;). As succinoglucanas têm importância na indústria alimentícia e farmacêutica como agente geleificante e matriz imobilizadora de drogas, respectivamente (KUMAR; MODY, 2009).

Xantana

A goma xantana é o EPS bacteriano mais bem estudado e caracterizado, produzido por bactérias do gênero *Xanthomonas*. Foi descoberta em 1950 e teve seu uso permitido em alimentos pela FDA em julho de 1969 (RINAUDO, 2008; ROTTAVA et al., 2009). A goma xantana é um heteropolissacarídeo formado por unidades repetidas de glicose, manose e um ácido glucurônico na proporção 2:2:1 (Tabela 1). É um polímero solúvel em água e possui capacidade de produzir géis de alta viscosidade, sendo estáveis a variações de temperatura e pH (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; NERY, 2007).

São produzidas por ano cerca de 50 mil toneladas, sendo 40% destinado à indústria alimentícia como espessante e emulsificante (MAYER et al., 2008; ROSALAM; ENGLAND, 2006). Nas indústrias farmacêutica e cosmética, é usada como retentor de água e estabilizador de produtos, como nos cremes hidratantes, loções, tinturas para cabelo e xampus, conferindo uniformidade ao produto (KATZBAUER, 1998).

Técnicas de produção

A produção de EPS bacteriano tem sido objeto de intensa pesquisa, tendo em vista todos os fatores já mencionados. Porém, a seleção de espécies que produzam EPS com propriedades funcionais e de interesse econômico, bem como estudos que buscam otimizar seu rendimento e sua produção é um desafio constante (BOZA, 2003).

Para determinar as características e o potencial biotecnológico de EPS bacterianos, assim como as condições ideais de produção, são necessários estudos de natureza bioquímica e molecular (MISHARA; JHA, 2013). Tais abordagens irão permitir identificar se a linhagem da bactéria em estudo representa uma nova espécie e se há informações sobre a síntese do produto para o gênero ou família da espécie identificada. Outros parâmetros a serem considerados como composição do meio de cultivo, temperatura e pH precisam ser delineados para possibilitar as melhores condições de produção e com otimização da síntese de produtos poliméricos (MISHARA; JHA, 2013; SAMPAIO, 2014).

O crescente interesse na análise estrutural e nas propriedades físico-químicas de EPS tem ampliado as técnicas de estudo, permitindo elucidar melhor essas características. Para tal, são empregados métodos como: cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC); cromatografia gasosa com espectrômetro de massa (GC-MS); espectroscopia de infravermelhos com transformadas de Fourier (FTIR); ressonância magnética nuclear (RMN); microscopia de força atômica (AFM); microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) (MISHARA; JHA, 2013). Abordagem com enfoque genético e molecular também tem sido citada em diversos estudos, visando ao aumento no rendimento e redução do tempo de fermentação, simplificando o processo de recuperação e purificação do produto (MISHARA; JHA, 2013; ROSALAM; ENGLAND, 2006). Além disso, o uso de ferramenta como a genômica, transcriptômica, metabolômica e proteômica pode contribuir para a compreensão e elucidação das condições mais eficazes e elaboração de estratégias biotecnológicas da produção de exopolissacarídeos bacterianos.

Considerações finais

Atualmente, há um interesse crescente em biopolímeros bacterianos devido às diversas características que apresentam. Muitos estudos têm permitido a elucidação das propriedades físicas e químicas deste grupo de polissacarídeos, visando otimizar o processo de produção e obtenção do produto com propriedades específicas. Desse modo, a

exploração dessa fonte de produção de biopolímeros poderá gerar inúmeros benefícios, principalmente para os processos que envolvem a biotecnologia, uma vez que há uma menor produção de poluentes ambientais e baixo custo de produção, sendo atrativo para diversos setores industriais.

Referências

- ARANDA-SELVERIO, G.; PENNA, A. L. B.; CAMPOS-SÁS, L. F.; SANTOS-JÚNIOR, O.; VASCONCELOS, A. F. D.; SILVA, M. L. C.; LEMOS, E. G. M.; CAMPANHARO, J. C.; SILVEIRA, J. L. M. Propriedades reológicas e efeito da adição de sal na viscosidade de exopolissacarídeos produzidos por bactérias do gênero *Rhizobium*. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 895-899, 2010.
- ARVIDSON, S. A.; RINEHART, B. T.; GADALA-MARIA, F. Concentration regimes of solutions of levan polysaccharide from *Bacillus* sp. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, p.144-149, 2006.
- BADEL, S.; BERNARDI, T.; MICHAUD, P. New perspectives for *Lactobacillus* exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 54-66, 2011.
- BARRETO, M. C. S.; FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; SILVA, M. L. R. B.; LIMA-FILHO, J. L. Produção e comportamento reológico de biopolímeros produzidos por rizóbios e caracterização genética. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 17, n. 24, p. 221-227, 2011.
- BOZA, Y. E. A. G. **Encapsulamento *Beijerinckia* sp utilizando Spray-drier**. Departamento de Ciência de alimentos (FEA). 2003. 138f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. **Classificação de risco dos agentes biológicos**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, p. 36, 2006.
- BRETAS, R. E. S.; D'ÁVILA, M. A. **Reologia de polímeros fundidos**. 2. ed. São Carlos: Ed UFSCar, 2005.
- CALAZANS, G. M. T.; LIMA, R. C.; FRANÇA, F. P.; LOPES, C. E. Molecular weight and antitumor activity of *Zymomonas mobilis* levans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 27, p. 245-247, 2000.
- CERNING, J. Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. **Lait**, v.75, p. 463-472, 1995.

CUNHA, M. A. A.; GÓMEZ, R. J. H. C.; AMORIM, E. S. Goma curdlana: um importante hidrocolóide microbiano. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 379-384, jul./dez., 2003.

DE VUYST, L.; DEGEEST, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, p. 153-177, 1999.

DONINI, Í. A. N.; SALVI, D. T. B.; FUKUMOTO, F. K.; LUSTRI, W. R.; BARUD, H. S.; MARCHETTO, R.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Biosynthesis and recent advances in production of bacterial cellulose. **Eclética Química**, v. 35, n. 4, p. 165-178, 2010.

DONINI, Í. A. N. **Desenvolvimento de métodos de cultivo de *Gluconacetobacter xylinus* para obtenção de compósitos à base de celulose bacteriana e colágenos tipo I adicionado *in situ***. 2011. 105f. Dissertação (Mestrado em biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2011.

DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J. C.; SCHORR-GALINDO, S. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 951-962, 2012.

DRAGET, K.; TAYLOR, C. Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 251-256, 2009.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Levana bacteriana: aspectos tecnológicos, características e produção. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 1, p. 71-82, jan./mar. 2005.

FDA – Food and Drug Administration. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/>>. Acesso em: 02 fev. 2017.

FERNANDES-JÚNIOR, P. I. ALMEIDA, J. P. S.; PASSOS, S. R.; OLIVEIRA, P. J.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Produção e comportamento reológico de exopolissacarídeos sintetizados por rizóbios isolados de guandu. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n.12, p.1465-1471, 2010.

FIALHO, A. M. L. MOREIRA, L. M.; GRANJA, A. T.; POPESCU, A. O.; HOFFMANN, K.; SÁ-CORREIA, I. Occurrence, production, and applications of gellan: current state and perspectives. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 79, p. 889-900, 2008.

GAMA, M.; GATENHOLM, P.; KLEMM, D. **Bacterial nanocellulose: a sophisticated multifunctional material**. Boca Raton: CRC Press, p. 282, 2013.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V.E.; CASAS, J.A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: Production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, v.18, p. 549-579, 2000.

RAZIKA, G.; AMIRA, B.; YACINE, B.; AMMAR, B; Influence of carbon source on the production of exopolysaccharides by *Rhizobium sllae* and on the nodulation of *Hedysarum coronarium* L. legume. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, p. 5940-5946, 2012.

GIL, E. C.; COLARTE, A. I.; GHZAOUI, A. E.; DURAND, D.; DELARBRE, J. L.; BATAILLE, B. A sugar cane native dextran as an innovative functional excipient for the development of pharmaceutical tablets. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Berlim, v. 68, p. 319-329, 2008.

JANSSON, P. L.; SANDFORD, P. Structural studies of gellan gum, and extracellular polysaccharides elaborated by *Pseudomonas elodea*. **Carbohydrate Research**, v.124, p.135-139, 1983.

KATZBAUER, B. Properties and applications of xanthan gum. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 81-84, 1998.

KIANI, H.; MOUSAVI, M. E.; RAZAVI, H.; MORRIS, E. R. Effect of gellan, alone and in combination with high-methoxy pectin, on the structure and stability of doogh, a yogurt-based Iranian drink. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 744-754, 2010.

KIM, M. K.; LEE, J. H.; KIM, K. T.; RHEE, Y. H.; PARK, Y. H. Residual phosphate concentration under nitrogen-limited conditions regulates curdlan production in *Agrobactium* species. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 25, p. 180-183, 2000.

KUMAR, A. S.; MODY, K. H. Microbial exopolysaccharides: variety and potential applications. In: REHM, B. H. A. (ed). **Microbial production of biopolymers and polymer precursors: applications and perspectives**. Norfolk: Caister Academic, 2009. p. 229-235.

LABA, D. **Rheological Properties of Cosmetics and toiletries**. New York: Marcel Dekker, 1993, 431p.

LEE, K. Y.; BULDUM, G.; MANTALARIS, A.; BISMARCK, A. More than meets the eye in bacterial cellulose: biosynthesis, bioprocessing and applications in advanced fiber composites. **Macromolecular Bioscience**, v. 14, p. 10-32, 2014.

LEONARDI, G. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Estabilidade de formulações cosméticas. **International Journal of Pharmaceutical Compounding**, v. 3, n. 4, p. 154-156, 2001.

LIU, S.; CHEN, X. L.; HE, H. L.; ZHANG, X. Y.; XIE, B. B.; YU, Y.; CHEN, B.; ZHOU, B. C.; ZHANG, Y. Z. Structure and ecological roles of a novel exopolysaccharide from the artic sea ice bacterium *Pseudolateromonas* sp. Strain SM20310. **Applied Environmental Microbiology**, v. 1, p. 224, 2013.

LUVIELMO, M. M.; SCAMPARINI, A. R. P. Goma xantana: produção, recuperação, propriedades e aplicação. **Estudos tecnológicos**, v. 5, p. 50-67, 2009.

MACIEL, J. C.; ANDRAD, P. L.; NERI, D. F. M.; CARVALHO-JUNIOR, L. B.; CARDOSO, C. A.; CALAZANS, G. M. T.; ALBINO-AGUIAR, J.; SILVA, M. P. C. Preparation and characterization of magnetic levan particles as matrix for trypsin immobilization. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, Amsterdam, v. 324, p. 1312-1316, 2012.

MAYER L.; VENDRUSCOO, C. T.; SILVA, W. P.; MOURA, A. B. Produção, propriedades reológicas e composição química da xantana produzida por *Xanthomonas axonopodis* pv phaseoli. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 2, p. 87-95, 2008.

MEHVAR, R. Dextrans for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents. **Journal of Controlled Release**, v. 69, p. 1-25, 2000.

MENESES, C. H. S. G.; SERRATO, R. V.; ROUWS, L. F. M.; ARAÚJO, J. L. S.; VIDAL, M. S.; BALDANI, J. I. Produção, extração e quantificação de exopolissacarídeos sintetizados por *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 em meio de cultivo líquido. **Comunicado Técnico Embrapa**, n.122, 2009.

MISHRA, A.; JHA, B. Microbial exopolysaccharides. In: ROSENBERG, E.; DELONG, E. F.; LORY, S.; STACHEBRANDT, E.; THOMPSON, F. (Eds). **The prokaryotes: applied bacteriology and biotechnology**. 4rd ed. New York: Springer Berlin Heidelberg. 2013. Cap. 5, p. 179-189.

MORENO, J.; VARGAS, M. A.; MADIEDO, J. M.; MUÑOZ, J.; RIVAS, J.; GUERRERO, M. G. Chemical and rheological properties of an extracellular polysaccharide produced by the Cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047. **Biotechnology & Bioengineering**, New York, v. 67, p. 283-290, 2000.

MÜLLER, J. M.; SANTOS, R. L.; BRIGIDO, R. V. Produção de alginato por microrganismos. **Polímeros**, v. 21, n. 4, p. 305-310, 2011.

NAESSENS, M.; CERDOBBEL, A.; SOETAERT, W.; VANDAMME, E. J. Review: *Leuconostoc* dextransucrase and dextran: production, properties and applications. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Hoboken, v. 80, p. 845-860, 2005.

NERY, T. B. R. **Produção e caracterização de goma xantana obtida com novas culturas liofilizadas de *Xanthomonas campestris* pv. utilizando resíduos industriais**. 2007. 117f. Dissertação (mestrado) – Escola Politécnica, Departamento de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA), 2007.

PAULA, V. C. PINHEIRO, I. O.; LOPES, C. E.; CALAZANS, G. C. Microwave-assisted hydrolysis of *Zymomonas mobilis* levan envisaging oligofructan production. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 7, p. 2466-2470, 2008.

PORTILHO, M. **Avaliação da produção de exopolissacarídeos insolúvel por duas linhagens de *Agrobacterium sp.*** 2002. 86f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de alimentos, Departamento de Ciências de Alimentos, UNICAMP, 2002.

REMMINGHORST, U. W. E.; REHM, B. H. A. Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 21, p. 1701-1712, 2006.

REMMINGHORST, U. HAY, I. D.; REHM, B. H. Molecular characterization of Alg8, a putative glycosyltransferase, involved in alginate polymerisation. **Journal of Biotechnology**, v. 140, p. 176-183, 2009.

RINAUDO, M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. **Polymer International**, v. 57, p. 397-430, 2008.

RODRIGUES, S. **Estudo da síntese enzimática de dextrana na presença de maltose como aceptor.** 2003. 259f. Tese (Doutorado em engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2003.

ROSALAM, S.; ENGLAND, R. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, n. 2, p. 197-207, 2006.

ROTTAVA, I.; BATESINI, G.; SILVA, M. F.; LERIN, L.; OLIVEIRA, D.; PADILHA, F. F.; TONIAZZO, G.; MOSSI, A.; CANSIAN, R. L.; LUCCIO, M.; TREICHEL, H. Xanthan gum production and rheological behavior using different strains of *Xanthomonas* sp. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 65-71, 2009.

RUAS-MADIEDO, P.; DE LOS REYES-GAVILÁN, C.G. Invited Review: Methods for the screening, isolation and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **Journal Dairy Science**, v. 88, p. 843-856, 2005.

SAMPAIO, M. G. V. **Produção e caracterização de um polissacarídeo bacteriano com vistas a seu potencial biotecnológico.** 2014. 92f. Dissertação (mestrado em biotecnologia industrial) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

SANTOS, F. L. F.; CAVALCANTI, O. A.; CELLIGOI, M. A. P. C. Production and use of exopolysaccharids: levan polysaccharide and the moderate permission potential of drugs. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 4, n. 2, p. 254-270, maio/ago. 2011.

SATHIYANARAYANAN, G.; KIRAN, G. S.; SELVIN, J. Synthesis of silver nanoparticles by polysaccharide bioflocculant produced from marine *Bacillus subtilis* MSBN17. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 13-20, 2013.

SATPUTE, S. K.; BANAT, I. M.; DHAKEPHALKAR, P. K.; BANPURKAR, A. G.; CHOPADEV, B. A. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. **Biotechnol Advances**, v. 28, p. 436-450, 2010.

SERRATO, R.V.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; CRUZ, L. M.; PEDROSA, F. O.; CHOUDHURY, B.; CARLSON, R. W.; LACOMINI, M. Structural characterization of an acidic exoheteropolysaccharide produced by the nitrogen-fixing bacterium *Burkholderia tropica*. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 73, n. 4, p. 564-572, 2008.

SHAH, V.; RAY, A.; GARQ, N.; MADAMWAR, D. Characterization of the extracellular polysaccharide produced by a marine cyanobacterium, *Cyanothece* sp. ATCC 51142, and its exploitation toward metal removal from solutions. **Current Microbiology**, v. 40, p. 274-278, 2000.

SHODA, M.; SUGANO, Y. Recent advances in bacterial cellulose production. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 10, n. 1, p. 1, 2005.

SIMSEK, S.; MERT, B.; CAMPANELLA, O. H.; REUHS, B. Chemical and rheological properties of bacterial succinoglycan with distinct structural characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, p. 320-324, 2009.

SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from gram-negative. **International Dairy Journal**, Barking, n. 11, p. 663-674, 2001.

VERMANI, M. V.; KELKAR, S. M.; KAMAT, M Y. Production and optimization of certain growth parameters for an exopolysaccharide from *Azotobacter vinelandii* MTCC 2460 isolated from a plant rhizosphere. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 80, n. 6, p. 599-602, 1995.

VIET, D.; BECK-CANDANEDO, S.; GRAY, D.G. Synthesis and characterization of blue dextrans. **Carbohydrate Polymers**, Nova Yorque, v. 74, p. 372-378, 2008.

VIGANTS, A.; HICKE, H.G.; MARX, S.P. A simple and efficient method for the purification of membrane bound levansucrase from *Zymomonas mobilis*. **Current Microbiology**, v. 42, p. 415-418, 2001.

VILLANOVA, J. C.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Pharmaceutical applications of polymers. **Polímeros**, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

XIE, P.; HAO, H.; MOHAMAD, O. A.; LIANG, J.; WEI, G. Comparative study of chromium biosorption by *Mesorhizobium amorphae* strain CCNWGS0123 in single and binary mixtures. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, p. 570-587, 2013.

YAMAMOTO, S.; LIZUKA, M.; TANAKA, T.; YAMAMOTO, T. The mode of synthesis of levan by *Bacillus subtilis* levansucrase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 49, n. 2, p. 343-349, 1985.

YAMAMOTO, Y.; TAKAHASHI, Y.; KAWANO, M.; IIZUKA, M.; MATSUMOTO, T.; SAEKI, S.; YAMAGUCHI, H. In vitro digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 10, p. 13-18, 1999.

YOO, S. H.; YOON, E. J.; CHA, J.; LEE, H. G. Antitumor activity of levan polysaccharides from selected microorganisms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 34, p. 37-41, 2004.

YUKIHIRO, N.; AKIRA, K.; TETSUYA, T.; TOSHIO, T.; HIROSHI, K.; JUN, T.; MAMORU, T. Curdlan: Properties and application to foods. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 3, p. 769-772, 1991.

5.

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE EM *Artemia salina*, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DE EXTRATOS DAS FOLHAS DE *Machaerium opacum* VOGEL (FABACEAE)

RENATO GOMES SANTOS
ANTÔNIO CARLOS SEVERO MENEZES
PLÍNIO LÁZARO FALEIROS NAVES

As atividades farmacológicas dos produtos naturais têm sido utilizadas no tratamento de doenças desde o início da história humana, ressaltando que, no começo do século XX, antes da “era da síntese”, 80% de todos os medicamentos eram provenientes de raízes, cascas e folhas, o que evidencia ainda mais a importância das atividades farmacológicas dos produtos naturais, as quais se estendem aos dias atuais, desempenhando um papel altamente significativo, principalmente no que concerne à descoberta de novos fármacos, que, muitas vezes, são provenientes dos produtos naturais ou derivados deles (MCCHESNEY; VENKATARAMAN; HENRI, 2007; NEWMAN; CRAGG, 2012).

Dentre os produtos naturais de origem vegetal, destaca-se a família Fabaceae, que apresenta inúmeros metabólitos secundários, cuja maioria demonstra algum tipo de atividade biológica, farmacológica ou toxicológica (WINK, 2013), constituindo uma das principais famílias de plantas medicinais (MOERMAN et al., 1999), o que justifica o contínuo e extenso estudo fitoquímico e farmacológico das plantas desta família.

Pertencente à família Fabaceae a espécie *Machaerium opacum* Vogel, gênero *Machaerium*, é popularmente conhecida como jacarandá,

jacarandá-tã-do-campo, jacarandá-do-campo, jacarandá-da-bahia, jacarandá cascudo e jacarandá-do-cerrado, que ocorre no campo sujo, campo cerrado, cerrado sentido restrito, cerradão e nas bordas de matas de galeria, no Distrito Federal e nos estados: BA, GO, MG, MT, MS, SP e TO. Em relação à sua fenologia e reprodução, encontra-se sempre verde, sendo a sua floração de outubro a janeiro, polinização realizada por abelhas, frutificação de janeiro a abril e dispersão pelo vento (LORENZI, 1998).

Embora sejam encontradas inúmeras atividades biológicas e medicinais descritas na literatura para as espécies (seiva, extratos e isolados) do gênero *Machaerium*, tais como *M. moritzianum* com atividade inseticida e tóxica contra *Artemia salina* (SOTO; GARCIA, 2000), *M. aris-tulatum* com atividade antitumoral (SEO et al., 2001), *M. multiflorum*, com atividade bactericida, antimalarial, fungicida e leishmanicida (MUHAMMAD et al., 2001, 2003), e *M. floribundum* com atividade contra bactérias que induzem acne, efeitos citoprotetor e antioxidante sobre fibroblastos (DÍAZ et al., 2011), não há relatos na literatura sobre o estudos biológicos relacionados à espécie *M. opacum*.

Contudo, no que se refere à caracterização fitoquímica dos constituintes de *M. opacum*, Ollis et al. (1978) relataram o isolamento e identificação de cinco compostos, três derivados benzênicos, 2,3-dimetóxi-fenol, pinosilvina monometiléter e dimetiléter, e dois flavonoides, mucronulatol e duartan.

Nesse contexto, devido à necessidade de se conhecer as aplicabilidades e potenciais biológicos de plantas, sobretudo de espécies do cerrado pertencentes à família Fabaceae, e com base em várias atividades biológicas de plantas do gênero *Machaerium*, objetivou-se, com o presente trabalho, realizar a caracterização fitoquímica das folhas, o estudo da toxicidade e da atividade antibacteriana dos extratos das folhas de *M. opacum*.

Material e método

Coleta e identificação do material vegetal

As folhas da planta *Machaerium opacum* Vogel (Fabaceae) foram coletadas no Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade Estadual de Goiás (CCET-UEG), tendo como coordenadas geográficas: latitude 16°22'42,2076" sul e longitude 48°56'53,8548" oeste, em setembro de 2015. Essa planta foi identificada pela Profa. Dra. Mirley Luciene dos Santos e a exsicata do material vegetal foi depositada no Herbário da Universidade Estadual de Goiás "HUEG", sob o registro 10.858.

Obtenção do extrato bruto etanólico

Para a obtenção do extrato bruto etanólico das folhas de *M. opacum*, foram coletados 4,4 kg de folhas frescas, que foram secas em estufa (MA035-Marconi) com circulação de ar a 45 °C durante 48 horas e pulverizadas a fino pó, em moinho Willey (MA-580). O material pulverizado (2,2 kg) foi, então, submetido a um processo de maceração a frio com etanol 96%, sendo o solvente evaporado em um rotaevaporador (TECNAL-120), obtendo-se o extrato bruto etanólico (384,32 g), conforme metodologia proposta por Matos (2009).

Ao extrato bruto etanólico obtido (364,06 g), adicionou-se celulose microcristalina D, cuja mistura resultante foi fracionada por meio de filtração a vácuo, utilizando-se como eluentes os seguintes solventes, por ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, obtendo-se os seguintes extratos: hexânico (68,66 g), diclometânico (8,04 g), acetato-etílico (2,71 g) e metanólico (120,63 g).

Caracterização fitoquímica

A análise fitoquímica do pó das folhas de *M. opacum* foi realizada em triplicada para a detecção dos metabólitos secundários mais relevantes, utilizando-se uma série de reações de caracterização fitoquímica para detecção de metabólitos secundários segundo adapta-

ções das metodologias propostas por Costa (2001), Matos (2009) e Simões et al. (2010).

Avaliação da toxicidade contra Artemia salina Leach

A avaliação da toxicidade contra *A. Salina* foi realizada segundo a metodologia de Molina-Salinas e Said-Fernández (2006), com algumas adaptações. Foi empregado o meio de água marinha sintética preparado com a dissolução de sal marinho (40 g.L^{-1}) em água destilada, suplementado com extrato de leveduras (6 mg.L^{-1}) e esterilizado em autoclave. O pH foi ajustado a 8,5 com solução de Na_2CO_3 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$.

Os cistos (100 mg) foram incubados por 36 horas em 1 L do meio com iluminação natural, temperatura ambiente ($20\text{-}25 \text{ }^\circ\text{C}$) e oxigenação constante, a fim de promover a eclosão dos cistos e liberação dos náuplios. Após a eclosão, os náuplios foram atraídos por fonte de luz, pipetados e transferidos para uma placa de Petri com 10 mL de meio fresco, para que então fossem transferidos para microplacas de poliestireno estéreis, com 96 poços. Os inóculos foram padronizados com 10 ± 1 náuplios por cada poço.

O extrato bruto etanólico das folhas de *M. opacum* e demais extratos fracionados foram solubilizados em solução salina e DMSO (dimetilsulfóxido) nas concentrações de 4000, 2000, 1000, 500, 250 e $125 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ e, em seguida, foram adicionados aos poços das microplacas, apresentando concentrações finais de 2000, 1000, 500, 250, 125 e $62,5 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$. Foram incluídos controles de viabilidade e de letalidade, utilizando diluições de $100 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, água salina e DMSO 2,5% (concentração máxima obtida após diluição seriada dos extratos). Todos os ensaios foram realizados em triplicatas independentes.

O cálculo das CL_{50} foi realizado pela contagem de náuplios mortos e vivos após 24 h de exposição aos compostos ($20\text{-}25 \text{ }^\circ\text{C}$) pelo método gráfico para dose-resposta – *Probit*, no programa *Statplus*® versão 5.7.8 – 2014 *professional (Analyst Soft)*, a partir da regressão linear obtida da relação entre a porcentagem de náuplios mortos e a concentração do extrato.

Para a classificação do nível de toxicidade, foi utilizado o critério proposto por Ngutaet al. (2011). Os autores consideram toxicidade forte para compostos com valores de CL_{50} de até $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, toxicidade moderada para CL_{50} entre 100 e $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, toxicidade baixa para CL_{50} entre $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, e não tóxico para valores acima de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Avaliação da atividade antimicrobiana

O teste de avaliação da atividade antimicrobiana foi realizado pelo método de difusão de disco em ágar, conforme preconizado pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), fascículo M1000-S21 (CLSI, 2014) e segundo adaptações dos trabalhos de Fonseca et al. (2014) e Matte, Deak e Mata (2015).

Para os testes de difusão em disco, discos de papel filtro (discos testes) de cinco mm de diâmetro foram esterilizados em autoclave, e individualmente impregnados com $20 \mu\text{L}$ do extrato bruto etanólico (MOFE) e extrato hexânico (MOFEH), diclometânico (MOFED), acetato-etílico (MOFEA) e metanólico (MOFEM), todos nas concentrações de 250, 500, 1000 e $2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

O preparo do extrato bruto e dos demais extratos nas concentrações mencionadas deu-se de duas formas, uma delas solubilizando-se os extratos: MOFE, MOFEH, MOFED e MOFEA em etanol e MOFEM em metanol. A outra, solubilizando-as em DMSO e em caldo Mueller Hinton. A solubilização das amostras deu-se dessas duas formas para que se averiguasse possíveis problemas de solubilidade para posterior impregnação nos discos, assegurando-se, assim, a acurácia dos ensaios realizados.

Os mesmos volumes ($20 \mu\text{L}$) de etanol P.A., metanol P.A. e DMSO 10% (quantidade máxima presente nas amostras após diluição em caldo Mueller Hinton) foram aplicados em discos de papel filtro para o preparo dos controles negativos. Os discos testes adicionais preparados foram, então, levados para a estufa até evaporação completa dos solventes. Os discos com etanol e metanol permaneceram por 30 minutos a $37 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, enquanto que os com DMSO por 4 horas à mesma

temperatura. Ressalta-se que também foram preparados discos-controle com esses mesmos solventes, sem que estes fossem evaporados, de modo a constatar sua interferência, ou não, na inibição dos microorganismos testados, atribuindo-se, assim, o efeito de possíveis inibições apenas no extrato bruto etanólico e demais extratos testados, e não nos solventes utilizados. Além desses, utilizaram-se como controles positivos discos de 10 µg de gentamicina.

Os discos testes foram analisados contra seis culturas padrões, três gram-positivas, *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), e três Gram-negativas, *Escherichia coli* (25312), *Klebsiella pneumoniae* (700603) e *Pseudomonas aeruginosa* (27853). As culturas bacterianas foram preparadas a partir de colônias isoladas de cepas reativadas e suspensas em 5 mL de solução salina estéril. A turvação da suspensão bacteriana foi padronizada comparando-se com a escala 0,5 de MacFarland, a qual corresponde à concentração de $1,5 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹, semeando cada suspensão bacteriana com o auxílio de um *swab* estéril sobre a superfície da placa contendo cerca de 40 mL de Ágar Mueller Hinton. Em seguida, as placas foram então incubadas por 24h a 37 °C ± 1 °C, medindo-se os halos de inibição produzidos, sendo todos os procedimentos realizados em câmara de fluxo (QUIMIS MOD PA310) e em triplicata.

Resultado e discussão

Caracterização fitoquímica

Com os resultados provenientes da prospecção fitoquímica, foi possível identificar como metabólitos principais presentes nas folhas de *M. opacum*: flavonoides, triterpenos, antraquinonas, cumarinas, taninos e esteroides (Tabela 2). Tais resultados reforçam ainda mais os estudos relacionados com esse gênero, sendo, os flavonoides, seguidos dos triterpenos e esteroides os metabólitos mais comumente isolados e estudados, o que pode ser evidenciado no trabalho de Amen et al. (2015), sendo esses metabólitos, provavelmente, os principais responsáveis pela maioria das atividades biológicas desse gênero.

Tabela 2 – Metabólitos Secundários pesquisados nas de folhas de *M. opacum*

Metabólitos	Resultados
Flavonoides	+
Antraquinonas	+
Cumarinas	+
Taninos	+
Esteroides	+
Triterpenoides	+
Alcaloides	-
Saponinas	-

Legenda: sinal (+) indica presença e (-) ausência de constituinte químico.

Avaliação da toxicidade contra *Artemia salina* Leach

Os resultados demonstraram que o extrato etanólico de *M. opacum* apresentou $CL_{50} = 620 \mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto os extratos hexânico e metanólico, $CL_{50} > 2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, diclorometânico, $CL_{50} = 1115 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e acetato-etílico, $CL_{50} = 904 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 3).

Tabela 3 – Toxicidades do extrato bruto e demais extratos de *M. opacum* expressados como CL_{50} (Concentração Letal média em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para 50% da população) contra *Artemia salina*

Extrato bruto e frações	CL_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Classificação da toxicidade
MOFE	620	Baixa
MOFEH	> 2000	Atóxica
MOFED	1115	Atóxica
MOFEA	904	Baixa
MOFEM	> 2000	Atóxica

Legenda: MOFE = *Machaerium opacum* Folhas Etanol -Extrato brutoetanólico; MOFEH =*Machaerium opacum* Folhas Etanol- Hexano – Extrato Hexânico; MOFED =*Machaerium opacum* Folhas Etanol- Diclorometano -Extrato diclorometânico; MOFEA =*Machaerium opacum* Folhas Etanol- Acetato de Etila – Extrato acetato-etílico; MOFEM =*Machaerium opacum* Folhas Etanol- Metanol – Extrato metanólico.

De acordo com os critérios propostos por Nguta et al. (2011) para a classificação do nível de toxicidade, observou-se que os extratos hexânico, metanólico e diclorometânico foram atóxicos contra *A. salina*, enquanto o extrato acetato-etílico e extrato etanólico apresentaram toxicidade fraca.

Soto e Garcia (2000) estudaram a bioatividade de *M. moritzianum* e observaram que o extrato bruto e o extrato acetato-etílico apresentaram toxicidades bem mais elevadas, $145 \mu\text{g.mL}^{-1}$ – moderada e $0,036 \mu\text{g.mL}^{-1}$ – alta, respectivamente, segundo os mesmos critérios de Nguta et al. (2011). Enquanto isso, os extratos de éter de petróleo e água-etanol apresentaram CL_{50} de $1050 \mu\text{g.mL}^{-1}$, fraca.

Esses mesmos autores realizaram estudos da atividade inseticida contra *Alconeura* sp e detectaram que o extrato bruto apresentou CL_{50} de $6,903 \mu\text{g.mL}^{-1}$, acetato etílico de $4,113 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e éter de petróleo, com $11,745 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Esses extratos também apresentaram atividade fagoinibidora contra *Atta cephalotes* L. Tais resultados correlacionaram-se com os ensaios preliminares, bem como as doses utilizadas, demonstrando a importância da realização de ensaios preliminares com *A. salina* para seleção de plantas com vistas ao estudo de diferentes bioatividades (SOTO; GARCIA, 2000).

Avaliação da atividade antimicrobiana

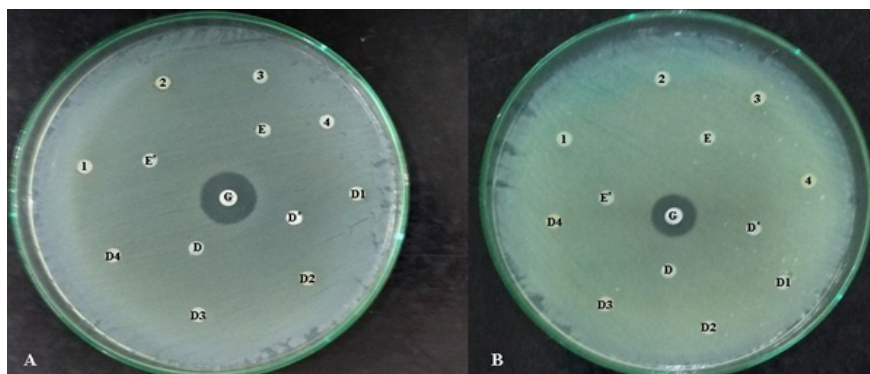
No estudo antimicrobiano de *M. opacum* contra bactérias Gram-positivas e negativas, constatou-se que nenhuma das concentrações testadas (2000, 1000, 500 e $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$) do extrato bruto (MOFE) e demais extratos (MOFEH, MOFED, MOFEA e MOFEM) apresentou atividade antimicrobiana (Figura 1).

Atividade antimicrobiana de *M. hirtum* são descritos contra *S. aureus*, *Salmonella* sp., *E. coli* e *Helicobacter pylori* (CARVALHO et al., 2011) e de *M. floribundum* contra as bactérias *S. epidermidis*, *S. aureus* e *Propionibacterium acnes* (DÍAZ et al., 2011).

Uma procianidina, proveniente da espécie *M. floribundum*, apresentou atividade antimicrobiana contra *S. maltophilia* (WAAGE;

HEDIN; GRIMLEY, 1984) e hexahidrotribenzopiranos isolados de *M. multiflorum* com resultados positivos de inibição em ensaios realizados com *S. aureus* e *S. aureus* resistente à meticilina (MUHAMMAD et al., 2001, 2003).

Figura 1 – Teste de suscetibilidade antimicrobiana dos extratos das folhas de *Machaerium opacum*



Legenda: 1, 2, 3 e 4 = concentrações dos extratos dissolvidos em solvente (etanol ou metanol), sendo 1 = 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 2 = 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 3 = 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 4 = 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; D1, D2, D3 e D4 = concentrações dos extratos dissolvidos em DMSO e caldo Mueller Hinton, sendo D1 = 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, D2 = 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, D3 = 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, D4 = 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; D = DMSO 10% (evaporado); D* = DMSO 10% (recém impregnado); M/E = solvente metanólico ou etanólico P.A. (evaporados); M/E* = solvente metanólico ou etanólico P.A. (recém aplicado); G = controle com gentamicina.

Conclusão

As análises fitoquímicas realizadas neste trabalho revelaram que a espécie estudada apresenta como metabólitos secundários majoritários flavonoides, triterpenos, antraquinonas, cumarinas, taninos e esteroides, os quais podem ser potencialmente ativos em modelos biológicos e farmacológicos, sobretudo os flavonoides e triterpenos, principais metabólitos responsáveis pelas atividades biológicas e farmacológicas descritas para as espécies do gênero *Machaerium*.

Os ensaios com *A. salina* mostraram que os extratos hexânico, diclorometânico e metanólico foram atóxicas, enquanto o extrato acetato-etílico e extrato bruto etanólico apresentaram toxicidade fraca, sendo

que os resultados encontrados nesses ensaios correlacionaram-se com os obtidos contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, já que não se constatou nenhuma inibição de proliferação bacteriológica.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Universidade Estadual de Goiás, pelo apoio financeiro; e ao Programa de Bolsa e Incentivo à Pesquisa e Produção Científica (PROBIP-UEG).

Referências

AMEN, Y.M.; MARZOUK, A.M.; ZAGHLOUL, M.G.; AFIFI, M.S. The genus *Machaerium* (Fabaceae): taxonomy, phytochemistry, traditional uses and biological activities. **Natural Product Research**, v. 29, n. 15, p. 1388-1405, 2015.

CARVALHO, M.S. ROZATTO, M.R.; TANGERINA, M.M.P.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W.; BAUAB, T.M. Avaliação da Atividade antibacteriana de extratos de *Machaerium hirtum* (vell) stellfed. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 26º, Foz do Iguaçu-PR, 2011. **Anais do XXVI Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Foz do Iguaçu, 2011. Disponível em: <<http://www.sigeventos.com.br/sbmicrobiologia/cdrom/resumos/R0281-2.html>>. Acesso em: janeiro de 2016.

CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty-fourth international supplement, document M100-S24**. Wayne, P.A., USA, 2014. Disponível em: <<http://microbiolab-bg.com/wp-content/uploads/2015/05/CLSI-2014.pdf>>. Acesso em janeiro de 2016.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. 992p.

DÍAZ, L.; MONTIJO, S.; MEDINA, A.L.; MELÉNDEZ, P.; LAURENCE, V.; MARTIMESTRES, G. Activity of ethanolic extracts leaves of *Machaerium floribundum* against acne-inducing bacteria, and their cytoprotective and antioxidant effects on fibroblast. **Revista Peruana e Biología**, v. 18, n. 2, p. 153-158, 2011.

FONSECA, G.M.; PASSOS, T.C.; NINAHUAMAN, M.F.M.L.; CAROCI, A.S.; COSTA, L.S. Avaliação da atividade antimicrobiana do alho (*Allium sativum* Liliaceae) e de seu extrato aquoso. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, supl. 1, p. 679-684, 2014.

IGNOATO, M.C.; FABRÃO, R.M.; SCHUQUEL, I.T.A.; BOTELHO, M.F.P.; BANNWART, G.; POMINI, A.M.; ARRUDA, L.L.M.; BERSANI-AMADO, C.A.; SANTIN, S.M.O. Chemical constituents of *Machaerium hirtum* Vell. (Fabaceae) leaves and branches and its anti-inflammatory activity evaluation. **Natural Product Research**, v. 27, n. 17, p. 1556-1561, 2013.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2 ed. Nova Odessa: Plantarum, 1998. 352p.

MATTE, A. K.; DEAK, A. R.; MATA, P.T. G. Triagem fitoquímica e avaliação da atividade antibacteriana de extratos das flores de *Sambucus nigra* L. (Caprifoliaceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, n.4, supl. 3, p. 1049-1054, 2015.

MATOS, F.J.A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 3ed. Fortaleza: UFC, 2009. 150p.

MCCHESNEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, v. 68, n. 14, p. 2015-2022, 2007.

MOERMAN, D. E.; PEMBERTON, R. W.; KIEFER, D.; BERLIN, B. A comparative analysis of five medicinal floras. **Journal of Ethnobiology**, v. 19, n. 1, p. 49-67, 1999.

MOLINA-SALINAS, G. M.; SAID-FERNÁNDEZ, S. A. Modified microplate cytotoxicity assay with brine shrimp larvae (*Artemia salina*). **Pharmacologyonline**, v. 3, p. 633-638, 2006.

MUHAMMAD, I.; LI, X. C.; JACOB, M. R.; TEKWANI, B. L.; DUNBAR, D. C.; FERREIRA, D. Antimicrobial and antiparasitic (+)-trans-hexahydrodibenzopyrans and analogues from *Machaerium multiflorum*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 6, p. 804-809, 2003.

MUHAMMAD, I.; LI, X. C.; DUNBAR, D. C. M.; ELSOHLI, A.; KHAN, I. A. Antimalarial (+)-trans-Hexahydrodibenzopyran derivatives from *Machaerium multiflorum*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 10, p. 1322-1325, 2001.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-35, 2012.

NGUTA, J. M.; MBARIA, J. M.; GAKUYA, D. W.; GATHUMBI, P. K.; KABASA, J. D.; KIAMA, S. G. Biological screening of Kenyan medicinal plants using *Artemia Salina* L. (Artemiidae). **Pharmacologyonline**, v. 14, n. 2, p. 358-361, 2011.

OLLIS, W. D.; SUTHERLAND, I. O.; ALVES, H. M.; GOTTLIEB, O. R. Duartin – an isoflavan from *Machaerium opacum*. **Phytochemistry**, v. 17, n. 8, p. 1401-1403, 1978.

SEO, E.; KIM, N.; MI, Q.; CHAI, H.; WALL, M.; WANI, M.; NAVARRO, H.; BURGESS, J.; GRAHAM, J.; CABIESES, F.; TAN, G.; FARNSWORTH, N.; PEZZUTO, J.; KINGHORN, A. Macharistol, a new cytotoxic cinnamyl phenol from the stems of *Machaerium aristulatum*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 11, p. 1483-1485, 2001.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6 ed. Florianópolis: UFSC, 2010. 1104p.

SOTO, L. M.; GARCÍA, P. C. M. Metodología para la Evaluación del Potencial Insecticida de Espécies Forestales. **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, v. 53, n. 1, p. 787800, 2000.

WAAGE, S.; HEDIN, P.; GRIMLEY, E. A biologically-active procyanidin from *Machaerium floribundum*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 12, p. 2785-2787, 1984.

WINK, M. Evolution of Secondary Metabolites in Legumes (Fabaceae). **South African Journal of Botany**, v. 89, p. 164-175, 2013.

6.

UMA BREVE REVISÃO SOBRE *Aeollanthus suaveolens* E AS LACTONAS δ -DECALACTONA E γ -DECALACTONA

EDUARDO LOPES DE PAULA
MAÍSA BORGES COSTA

O tratamento de doenças que acometem o homem tem sido uma preocupação constante da humanidade desde o início da civilização. Inicialmente, os recursos terapêuticos usados eram provenientes da natureza (plantas, animais e minerais) (CALIXTO, 2008) e, devido a isso, a busca por novas substâncias, com potencial atividade farmacológica, as chamadas moléculas bioativas, tem sido um dos grandes desafios enfrentados pela ciência (VIEGAS et al., 2006) principalmente em relação ao crescimento da resistência a vários microrganismos (LIESEN et al., 2008).

De maneira geral, a natureza é responsável pela produção de grande parte das substâncias orgânicas conhecidas, ressaltando-se que a diversidade de compostos químicos é oriunda do Reino Vegetal (MONTANARI; BOLZANI, 2001). No início do século XIX, a maioria dos fármacos era de origem natural e sua estrutura química e natureza eram desconhecidas (LIPINSKI, 2000; MELO et al., 2006).

A síntese de fármacos é considerada como um desdobramento da síntese orgânica por permitir o acesso a inúmeros compostos com finalidade profilática, curativa, paliativa e para diagnóstico médico, bem como auxiliar a construção de moléculas, independentemente da complexidade estrutural, com elevado grau de pureza e propriedades

farmacológicas específicas. De forma geral, envolve uma sequência planejada de reações orgânicas aplicadas sobre um composto de partida para a produção de novas moléculas (BARREIRO, 1991).

Consequentemente, um dos grandes desafios enfrentados pela ciência é desenvolver fármacos eficazes e não tóxicos ao ser humano, principalmente, relacionados ao aumento da resistência de enfermidades a antibióticos e antifúngicos (LIESEN, 2008; VIEGAS, 2006).

O desenvolvimento de novos fármacos está organizado em basicamente três etapas, na qual a descoberta de um composto com atividade terapêutica consiste na primeira etapa deste processo. A segunda etapa refere-se aos estudos pré-clínicos, com testes *in vitro*, visando à avaliação das propriedades biológicas dos compostos obtidos e bioensaios *in vivo*, com a investigação da farmacocinética e farmacodinâmica em animais. Os estudos clínicos em humanos são realizados numa terceira e última etapa do processo, dividida em várias fases até a comercialização do medicamento (GUIDO et al., 2010).

Dos vários fármacos sintetizados ou isolados de produtos naturais, estão os relacionados à psicofarmacologia, com importância atribuída ao valor terapêutico, que resulta em efeitos fisiológicos e psicológicos específicos que possibilitam aos seus usuários terem uma vida relativamente normal (FREITAS, 2011).

O emprego de produtos naturais, pelas comunidades, como medicamentos para a cura de doenças, torna necessário um estudo etnofarmacológico para a busca de fármacos em potencial, sendo a etnofarmacologia um segmento da botânica que relaciona o conhecimento popular e o conhecimento científico na investigação experimental das atividades biológicas de substâncias ativas de origem vegetal e animal da medicina tradicional, além de permitir a elucidação e comprovação de tais atividades (ELISABETSKY, 2007).

Atividade anticonvulsivante

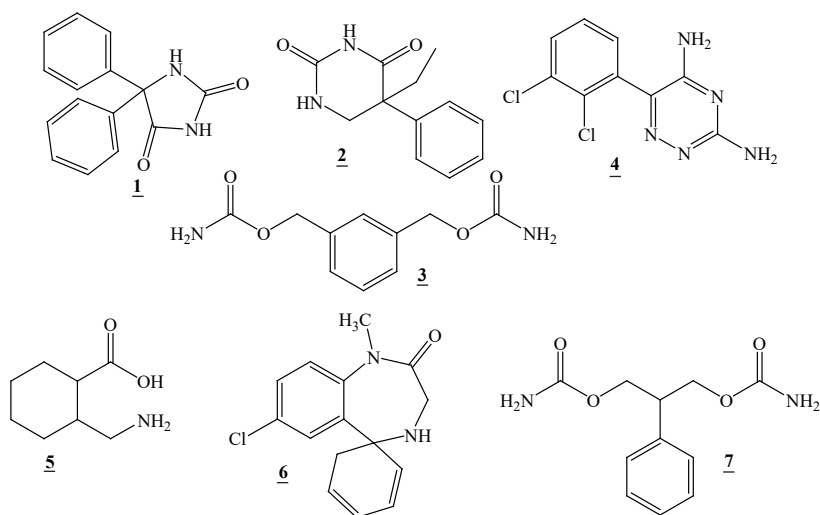
Dentre as diversas classes de fármacos, destacam-se, como uma das mais importantes, a dos psicofármacos. Essa grande importância, atribuída aos componentes dessa classe, está associada ao seu valor terapêutico, que promove efeitos fisiológicos e psicológicos específicos, possibilitando, assim, uma vida relativamente normal às pessoas submetidas a esse tipo de tratamento (FREITAS, 2011). Em relação à epilepsia, há estimativas de que 50 milhões de pessoas no mundo, em torno de 1% da população mundial, e somente 25 a 45% estão completamente livres de crises após o tratamento (FREITAS, 2011).

A definição de epilepsia dá-se ao grupo de desordens caracterizado por crises espontâneas e recorrentes, cujo resultado é um processo complexo, envolvendo vários sistemas neurotransmissores, tais como os glutamatérgicos, colinérgicos e sistema gabaérgicos, gerando a ocorrência de convulsões (QUINTANS, 2002; SHIHA et al., 2015; WANG et al., 2015).

O tratamento com Drogas Antiepilépticas (DAE's) ou anticonvulsivantes tradicionais é importante para o controle das crises convulsivas. O tratamento é sintomático e atua como um possível neuroprotetor (ROGAWSKI et al., 2016), no qual o fármaco deverá agir diretamente em algumas moléculas do cérebro como neurotransmissores, seja no neurotransmissor GABA ou no neurotransmissor glutamato (PFLÜGER et al., 2016).

Os principais fármacos antiepilépticos disponíveis atualmente são moléculas sintéticas. Como exemplo, podemos destacar a fenitoína (1), fenobarbital (2), felbamato (3), lamotrigina (4), gabapentina (5), os benzodiazepínicos (6) e o felbamato (7) (Figura 1) (ALMEIDA, 2003; QUINTANS, 2002).

Figura 1 – Estruturas moleculares das moléculas sintéticas dos principais fármacos antiepiléticos



Fonte: Adaptado de Almeida (2003) e Quintans (2002).

O uso contínuo das DAE's pode evidenciar efeitos satisfatórios no controle das crises convulsivas, bem como efeitos colaterais (HABIBI et al., 2016; KAMINSKI et al., 2014; QUINTANS, 2002; PFLÜGER et al., 2016). Como exemplos, podemos citar os fármacos que atuam no neurotransmissor GABA (como por exemplo, os barbitúricos **2** e **6**) e podem causar ganho de peso, fadiga e diminuição cognitiva, além dos que atuam no neurotransmissor glutamato (como por exemplo, o felbamato **7**) e podem causar perda de peso (HABIBI et al., 2016; KAMINSKI et al., 2014; PFLÜGER et al., 2016).

Na tentativa de obter resultados mais promissores com a aplicação das DAE's, algumas pesquisas foram e ainda estão sendo desenvolvidas com o intuito de se chegar a fármacos mais eficazes (QUINTANS, 2002).

Algumas espécies de plantas aromáticas, constituídas por óleos essenciais, têm sido o alvo científico de grupos de pesquisa, por apresentarem um largo espectro de atividades farmacológicas, incluindo a ação antiepilética, e direcionando, assim, o desenvolvimento de novos

compostos com potencial anticonvulsivante e com vantagens sobre as DAE's atuais (ALMEIDA, 2003).

Dentre as diversas espécies aromáticas, destaca-se a *Aeollanthus suaveolens* (Mart. ex Spreng), uma Lamiaceae conhecida como medicinal e que foi estudada por apresentar efeitos psicofarmacológicos (ELISABETSKY, 2007; TUCKER; MACIARELLO; ALKIRE, 1995). Estudos mostraram que os componentes presentes no óleo essencial das folhas e flores dessa espécie apresentaram efeitos psicofarmacológicos (ELISABETSKY, 2007).

Aeollanthus suaveolens

Aeollanthus suaveolens Mart. Ex Spreng. (Figura 2), uma espécie aromática de origem africana, conhecida no Brasil, mais comumente nos estados do Pará, Acre e Amazonas, como “macaca” ou “catinga-de-mulata”, é utilizada popularmente para afecções da pele e olhos, sedativa, ansiolítica, analgésica e também como anticonvulsivante (ELISABETSKY, 2007; OLIVEIRA et al., 2004).

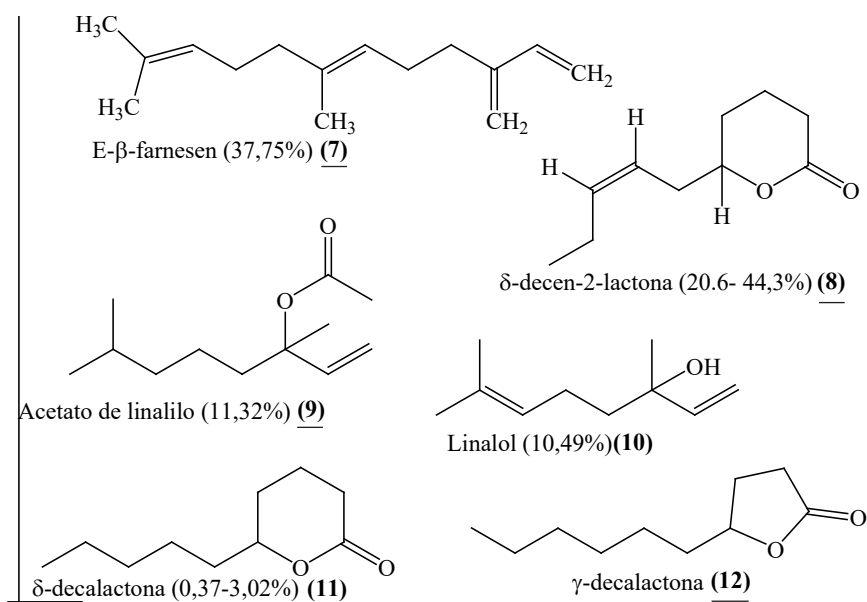
Figura 2 – Imagem da planta *Aeollanthus suaveolens* Mart. Ex Spreng



Fonte: <https://viveirosabordefazenda.wordpress.com/2016/03/03/o-perfumado-macassa/>

A *A. suaveolens* é fortemente aromática e seu óleo essencial é constituído por vários componentes químicos, dentre eles, as lactonas (Figura 3), que foram detectados e identificados por análise cromatográfica acoplada ao espectrômetro de massas (CG/EM) (TUCKER; MACIARELLO; ALKIRE, 1995).

Figura 3 – Representação estrutural das moléculas com efeito psicofarmacológico encontradas na espécie *A. suaveolens*



Fonte: Adaptado de Elisabetsky (2007).

Lactonas são moléculas que apresentam, em sua grande maioria, bioatividades, em que se destacam as atividades inseticidas, herbicidas, antimicrobianas e citotóxicas (COELHO et al., 1997). Também é preciso ressaltar o potencial neuroativo, anestésico, anti-inflamatório, antipirético, miorrelaxante e propriedades sedativas (COELHO et al., 1997).

Ensaios farmacológicos com as lactonas **8**, **11** e **12**, presentes no óleo essencial da *A. suaveolens*, foram realizados e monitorados em ratos com a indução de convulsões com o pentilenotetrazol (PTZ) (COELHO

et al., 1997; ELISABETSKY; MARSCHNER; SOUZA, 1995). Os resultados evidenciaram que as lactonas **8** e **11** não apresentaram potencial anticonvulsivante. Entretanto, a γ -decalactona (**12**) apresentou efeito dose-dependente no sistema nervoso central (SNC), incluindo hipnótico, atividades anticonvulsivantes e hipotermia. A administração de uma única dose de γ -decalactona (**12**) foi eficaz contra convulsões induzidas (COELHO et al., 1997; ELISABETSKY; MARSCHNER; SOUZA, 1995), além de apresentar atividade antigenotóxica, por reparar o dano no DNA induzido por PTZ (OLIVEIRA et al., 2004, 2008).

1 Γ e δ -decalactona – isolamento e atividade biológica

As lactonas **11** e **12**, monoterpenos com fórmula molecular $C_{10}H_{18}O_2$, são encontradas em diversas espécies de plantas (COELHO et al., 1997; ELISABETSKY; MARSCHNER; SOUZA, 1995) e usadas principalmente como um agente aromatizante nas indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas (GOPINATH, 2008).

Na indústria alimentícia, são empregadas como aromatizantes e espessantes em bebidas como sucos de frutas, vinho, aguardente e refrigerantes, para melhorar o odor, sabor e potabilidade (GOPINATH, 2008).

Em relação à área cosmética, as lactonas são empregadas como ingredientes de perfumaria em preparações para o cabelo, cremes, desodorantes, perfumes, colônias, loções e protetor solar. Além disso, estão presentes na composição produtos para cuidados de animais e para a higiene corporal, tais como pasta de dentes, gel dental, cremes dentais (GOPINATH, 2008).

A grande demanda na indústria farmacêutica está associada à aplicação de fragrância, em comprimidos solúveis ou para os mastigáveis, para garganta ou tosse, pastilhas, pós ou grânulos farmacêuticos (LOYAUX, 1981).

Pesquisas sobre o potencial aromático das lactonas δ -(**11**) e γ -Decalactona (**12**) são amplos. Entretanto, poucos são os estudos relacionados a outras atividades biológicas (BORATYNSKI et al., 2016), e os já exis-

tentes evidenciam um amplo espectro de atividades, como, por exemplo, o poder antifúngico frente a fungos filamentosos (*Aspergillus niger*), contra leveduras (*Candida albicans*) e bactérias (*Staphylococcus aureus*) (BORATYNSKI et al., 2016).

δ -Decalactona (**11**) foi detectada na produção do veneno glandular de formigas *Pachycondyla apicalis* e o seu enantiômero (*R*)-(+), como componente de alguns animais. Já o enantiômero (*R*)-(+) da γ -Decalactona é utilizado pelo besouro *Elater ferrugineus* como um cairomônio para o besouro *Osmoderma eremita* (BORATYNSKI et al., 2016).

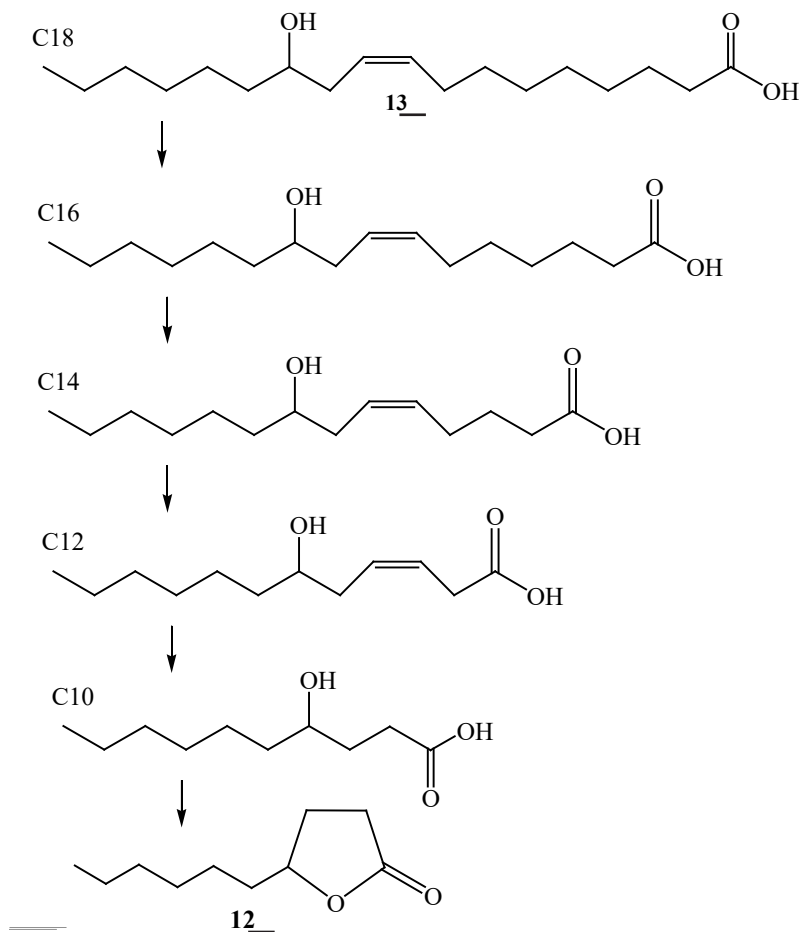
Devido à importância biológica dessas lactonas, várias são as vias metabólicas e metodologias sintéticas para a produção (GOPINATH et al., 2008). Entretanto, com relação à γ -Decalactona (**12**), é observado que artigos relacionados à sua biossíntese, com diversos microrganismos, são mais comuns (GOPINATH et al., 2008).

Obtenção da γ -decalactona **12**

A γ -Decalactona (**12**) vem sendo estudada há mais de 70 anos e, consequentemente, inúmeras são as pesquisas científicas relacionadas com essa lactona, seus diferentes mecanismos de obtenção por reações de biotransformação, biocatálise ou biossíntese (BORATYNSKI et al., 2016; GOPINATH et al., 2008; KRZYCZKOWSKA, 2012).

Como exemplo de biotransformação desenvolvida para a produção de γ -Decalactona (**12**), destaca-se a do ácido ricinoleico (**13**), catalisada por leveduras envolvendo 4 etapas de β -oxidação para a formação da γ -Decalactona (**12**) (Esquema 1) (BORATYNSKI et al., 2016; GOPINATH et al., 2008; KRZYCZKOWSKA, 2012).

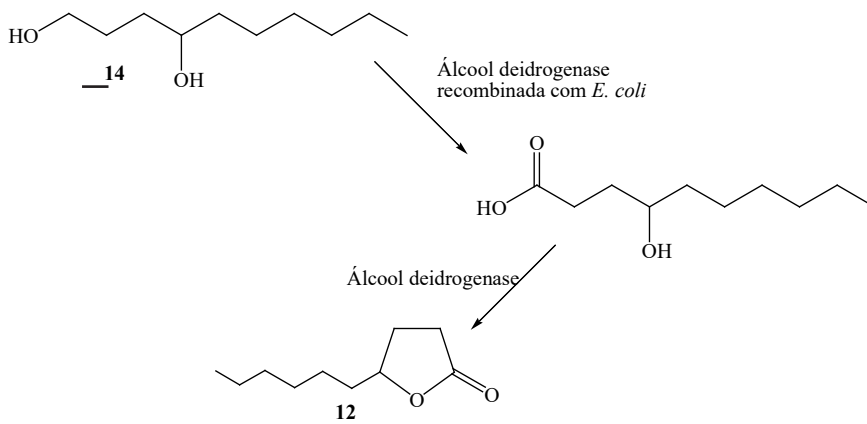
Esquema 1 – Representação estrutural da biotransformação do ácido ricinoleico (13) para a produção da γ -Decalactona (12)



Fonte: Gopinath et al. (2008) e Krzyczkowska (2012).

Outra vertente empregada para a obtenção da lactona 12 ocorre a partir da aplicação de biocatálise com a enzima álcool desidrogenase, obtida do fígado do cavalo e recombinada com *Escherichia coli*, que promove a oxidação do decano-1,4-diol (14) para produzir a mistura enantiomérica (-)-(*S*) e (+)-(*R*) da γ -Decalactona (12) (Esquema 2) (BORATYNSKI et al., 2016).

Esquema 2 – Representação estrutural da biotransformação do decano-1,4-diol (**14**) para a produção da γ -Decalactona (**12**)

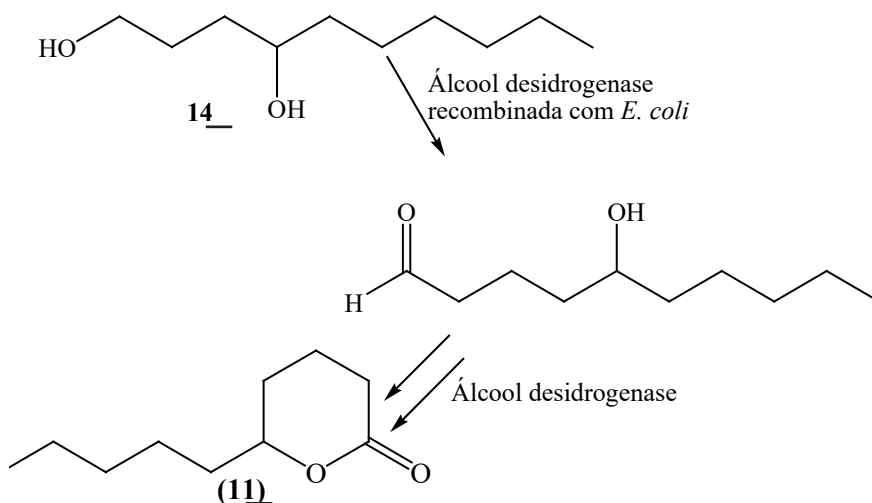


Fonte: Boratynski et al. (2016).

A metodologia por biocatálise com o emprego da enzima álcool deidrogenase, recombinada com *E.coli*, também foi aplicada para a obtenção da lactona δ -decalactona (**11**) (Esquema 3). Entretanto, diferentemente da lactona **12**, nesse caso, a produção teve um excesso enantiomérico de 30-50% do enantiômero (+)-(*R*)- δ -decalactona (**11**) (BORATYNSKI et al., 2016).

Destacam-se, na literatura, outras rotas sintéticas para a obtenção da lactona **11**, que não estão relacionadas com reações de biotransformação, biossíntese ou biocatálise. Podemos observar que as reações que envolvem biotransformação estão diretamente relacionadas à química verde, pois tentam promover a síntese de novos compostos com ausência de solventes ou o mínimo possível de solventes e/ou reagentes tóxicos.

Esquema 3 – Representação estrutural da biotransformação do deca-1,4-diol (**14**) para a produção da δ -Decalactona (**11**)



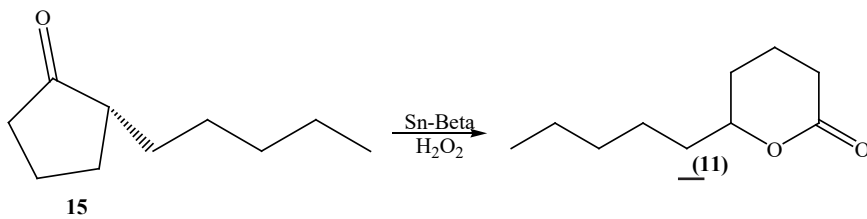
Fonte: Boratynski et al. (2016).

Sínteses convencionais para a obtenção da δ -decalactona (**11**)

Para a síntese da δ -decalactona (**11**), algumas metodologias sintéticas convencionais são descritas na literatura (CORMA et al., 2004). Dentre elas, podemos destacar a oxidação de Baeyer-Villiger, ressaltando que a reação entre a cetona cíclica (**15**) e o agente oxidante peróxido de hidrogênio, juntamente com o catalisador Sn-Beta, favorecem a formação da δ -decalactona (**11**) (Esquema 4) (CORMA et al., 2004).

Nessa metodologia, Corma e colaboradores (2004) desenvolveram a síntese da lactona **11**, com sistema catalítico como Sn-Beta/peróxido de hidrogênio, que direciona para a migração da assimetria do centro do carbono com retenção de configuração, além de desenvolver a reação na ausência de qualquer solvente orgânico, o que seria de total importância industrial (CORMA et al., 2004).

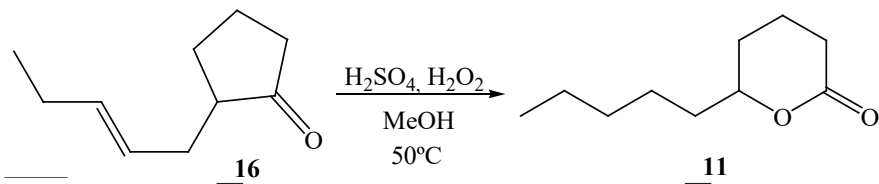
Esquema 4 – Representação estrutural da Reação de Baeyer-Villiger para obtenção da δ -decalactona (**11**)



Fonte: Corma et al. (2004).

Li colaboradores (2013) sintetizaram a δ -decalactona (**11**) a partir da reação de oxidação, acompanhada por ciclização do anel, da 2-pentenil ciclopentanona (Esquema 5). A vantagem dessa metodologia, em comparação às oxidações de Baeyer-Villiger, é a produção do anel lactônico sem expansão do seu anel.

Esquema 5 – Representação estrutural da Reação de oxidação com peróxido de hidrogênio da ciclopentanona para obtenção da δ -decalactona (**11**)



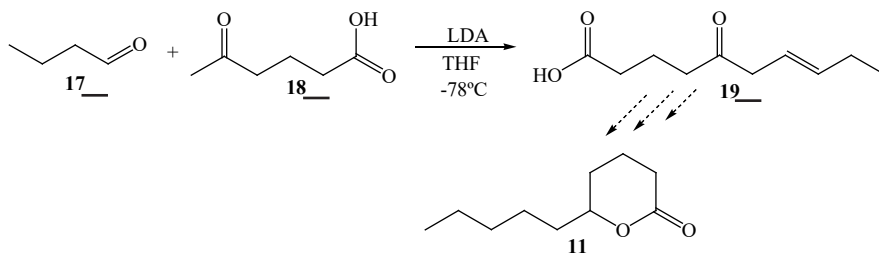
Fonte: Li et al. (2013).

A partir das considerações descritas nesta breve revisão, relacionadas à parte química e potencial biológico da δ -decalactona (**11**), nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo uma nova metodologia sintética para a obtenção desta lactona (Esquema 6).

Essa metodologia é baseada em reações de condensação aldólica entre o butiraldeído (**17**) e o ácido 4-acetilbutírico (**18**) em meio básico, na qual, sequencialmente, reações de ciclização e redução serão empregadas para a obtenção da δ -decalactona (**11**), com menos etapas, e sem

o desenvolvimento de reações de oxidação de Baeyer-Villiger, na tentativa de evitar a expansão do anel lactônico.

Esquema 6 – Representação estrutural da Reação de condensação aldólica para a obtenção da δ -decalactona (**11**)



Fonte: Próprios autores (2017).

Considerações finais

O vasto espectro de atividades farmacológicas apresentadas pela δ -decanolactona (**11**), bem como a quantidade limitada de artigos descritos na literatura, sobre metodologias sintéticas para a sua obtenção, faz dessa molécula um interessante alvo sintético para vários grupos de pesquisa, sempre com o foco de desenvolver compostos biologicamente ativos com rotas sintéticas curtas e viáveis economicamente.

Nesse sentido, esta breve revisão sobre a δ -decanolactona (**11**) vem com a tentativa de nos auxiliar nesta pesquisa científica que estamos desenvolvendo no Programa de Mestrado em Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde (CAPS).

Agradecimentos

À FAPEG/CAPES, pela bolsa concedida, e à UEG, pela concessão da bolsa PROBIP/2016.

Referências

- ALMEIDA, R. N.; MOTTA, S. C.; LEITE, J. R. Óleos essenciais com propriedades anticonvulsantes. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 2, n.1, p.3-6, 2003.
- BARREIRO, E. J. A importância da síntese de fármacos na produção de medicamentos. **Química Nova**, v. 14, n. 3, p. 179-188, 1991.
- BORATYNSKI, F.; DANCEWICZ, K.; PAPROCHA, M.; GABRY, B. Chemoenzymatic synthesis of optically active γ - and δ -Decalactones and their effect on aphid probing, feeding and settling behavior. **Plos One**, v. 07, p.1-18, 2016.
- BU, J.; LI, G.; ZHAO, M.; LI, J.; JIANG, F.; ZHAN, H.; CHU, Y. Synthesis of δ -decalactone. **Asian Journal of Chemistry**, v. 25, p.4520-4522, 2013.
- CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA Jr, J. M. Desafios e desenvolvimento de medicamentos no Brasil. **Gazeta médica**, n.8, p.98-106, 2008.
- COELHO, G.P.S.; ELISABETSKY, E.; NUNES, D.S.; RABELO, S.K.L.; NASCIMENTO, M.S. Anticonvulsant properties of gamma-decanolactone in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 58, p.175-181, 1997.
- CORMA, A.; IBONA, S.; MIFSUD, M.; RENZ, M.; SUSARTE, M. A. New environmentally benign catalytic process for the asymmetric synthesis of lactones: synthesis of the flavouring δ -Decalactone molecule. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 346, p.257-262, 2004.
- ELISABETSKY, E.; MARCHNER, J.; SOUZA, D. O. Effects of linalool on glutamatergic system in the rat cerebral cortex, **Neurochemical Research**, v.20, p.461-465, 1995.
- ELISABETSKY, E. Phytotherapy and new paradigm of drugs mode of action. **Science Et techina**, v.12, p.459-464, 2007.
- FREITAS, R. M. Neurotransmitter Systems Involved in Epilepsy Model: A Literature Review. **Revista de Neurociências**, v. 19, p.128-138, 2011.
- GOPINATH, M.; VIJAYAKUMAR, L.; DHANASKAR, R.; VIRUTHAGHI, T. Microbial biosynthesis of γ -Decanolactone and applications – a review. **Global Journal of Biotechnology e Biochemistry**, v.3, p.60-68, 2008.
- GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Revista Estudos Avançados**, v. 70, n. 24, p. 81-83, 2010.
- HABIBI, M.; HART, F.; BAINBRIDGE, J. The impact of psychoactive drugs on seizures and antiepileptic drugs. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v.16, p.71, 2016.

LIESEN, A.P; AQUINO, T. M. DE; GÓES, A. J. S.; LIMA, J. G. DE; FARIA, A. R. DE; ALVES, A. J. Métodos de obtenção, reatividade e importância biológica de 4-tiazolidinonas. **Química Nova**, v. 31, p. 369-376, 2008.

LIPINSKI, C. A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. **Journal Pharmacology Toxicology**, v.44, p.235, 2000.

LOYAUX, D.; ROGER, S.; ADDA, J. MORGAN, S.;GROOTENDORST, P.; LEXCHIN, J.; CUNNINGHAM, C.; GREYSON, D. The evolution of champagne volatiles during aging. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.32, p.1254-1256, 1981.

KAMINSKI, R. M.; ROGAWSKI, M. A.; KLITGAARD, H. The potential of antiseizure drugs and agents that act on novel molecular targets as antiepileptogenic treatments. **Neurotherapeutics**, v. 11, p.385-400, 2014.

KRZYCZKOWSKA, J. The use of Castor oil in the production of γ -decalactone by *Yarrowia lipolytica* KKP 379. **Cheminè Technologija**, v.61, p.58-61, 2012.

MELO, D. O.; RIBEIRO, E.; STORPITIS, S. A importância e a história dos estudos de utilização de medicamentos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, p.475, 2006.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S.; Planejamentos racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n.1, p. 105-111, 2001.

OLIVEIRA, A. S. C.; COSTA, L. M. L.; ZOGHBI, M. G. B.; CONCEIÇÃO, C. C. C.; MOTA, M. G. C. Rendimentos dos principais componentes químicos do óleo essencial de *Aeollanthus suaveolens* (Mart ex K. Spreng) em diferentes partes vegetativas. In: **XVIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, p.513, 16 a 19 de novembro, Manaus – AM, 2004.

OLIVEIRA, P. A.; LINO, F. L.; CAPPELARI, S. E.; DA SILVA, B. L. F.; PICADA, J. N.; PEREIRA, P. Effects of gamma-decanolactone on seizures induced by PTZ-kindling in mice. **Experimental Brain Research**, v.187, p.161-166, 2008.

PFLÜGER, P.; VIAU, C. M.; COELHO, V. R.; BERWIG, N. A.; STAUB, R. B.; PEREIRA, P.; SAFFI, J. Gamma-decanolactone inhibits iNOS and TNF- α production by lipopolysaccharide-activated microglia in N9 cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 780, p.38-45, 2016.

ROGAWSKI, M. A.; L. W.; RHO, J. M. Mechanisms of action of antiseizure drugs and the Ketogenic Diet. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v.2, p. 1-29, 2016.

SHIHA, A. A.; CRISTÓBALA, J.; DELGADOA, M.; DE LA ROSA, R. F.; BASCUÑANAA, P.; POZOA, M. A.; GARCÍA-GARCÍA, L. Subacute administration of fluoxetine prevents short-term brain hypometabolism and reduces

brain damage markers induced by the lithium-pilocarpine model of epilepsy in rats. **Brain Research Bulletin**, v.111, p. 36-47, 2015.

QUINTANS, J. L. J.; ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G. M.; AGRA, M. F.; SOUZA, M. F. N.; BARBOSA, F. J. M. Avaliação da atividade anticonvulsante de plantas do nordeste brasileiro. **Acta Farmacéutica Bonarense**, v. 21, p.179-184, 2002.

TUCKER, A. O.; MACIARELLO, M. J.; ALKIRE, B. H. Essential Oil of *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. (Lamiaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 13, p.198-199, 2001.

VIEGAS JR. C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v.29, p.326-337, 2006.

WANG, N.; MI, X.; GAO, B.; GU, J.; WANG, W.; ZHANG, Y.; WANG, X. Minocycline inhibits brain inflammation and attenuates spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus. **Neuroscience**, v. 287, p.144–156, 2015.

7.

MICROENCAPSULAÇÃO: ESTRATÉGIA TECNOLÓGICA NA OBTENÇÃO DE BIOPRODUTOS DE ALTA QUALIDADE

DEBBORAH GONÇALVES BEZERRA
IVANO ALESSANDRO DEVILLA
JOELMA ABADIA MARCIANO DE PAULA

O desenvolvimento tecnológico de bioprodutos envolve várias etapas que demandam conhecimentos interdisciplinares. Uma das técnicas recentemente utilizadas na cadeia de transformação de derivados vegetais para o bioproduto intermediário é a microencapsulação. Embora seja conhecida há muitas décadas, essa técnica tem ampliado seu espaço em aplicações nas mais diversas áreas, tais como a farmacêutica, alimentar e cosmética (VANDEGAER, 1974; GAONKAR et al., 2014; SIMÕES et al., 2017).

A concepção da microencapsulação de materiais foi inspirada no modelo celular, no qual o núcleo é envolvido por uma membrana semi-permeável que o protege do meio externo e, ao mesmo tempo, controla a entrada e a saída de substâncias na célula (RÉ, 2006). Por analogia a esse modelo, a microencapsulação envolve processos que levam à incorporação de substâncias de interesse (núcleo ou material ativo) em um sistema de revestimento (material de parede, carreador ou agente encapsulante). Tais sistemas microencapsulados podem apresentar as seguintes vantagens: (1) controle da velocidade de liberação do princípio ativo; (2) segregamento físico dos constituintes ativos das condições ambientais ao seu redor; (3) direcionamento dos constituintes ativos ao sítio de ação; (4) estabilidade físico-química e biológica; (5) redução no número de aplicações, doses ou quantidade do ativo administrado; (6) manu-

tenção da concentração constante do princípio ativo; (7) biodegradação; (8) possível redução de impactos ambientais (MADENE et al., 2006; OBEIDAT, 2009; TIWARI et al., 2010).

O presente capítulo faz uma revisão sobre os principais aspectos e aplicações da técnica de microencapsulação, especialmente por meio de *spray drying*, na obtenção de bioprodutos de alta qualidade.

Aplicações da microencapsulação

As primeiras encapsulações ocorreram em nível de macroescala e, mais tarde, foram reduzidas para o nível micro. Seguindo essa tendência, muitas empresas inovadoras no campo de encapsulação hoje estão buscando novas maneiras de explorar, desenvolver e comercializar encapsulação em nível micro e nanométrico (BENITA, 2006; GAONKAR et al., 2014; ANANDAHRAMAKRISHNAN; ISHAWARYA, 2015).

A tecnologia de microencapsulação é amplamente utilizada em uma variedade de campos, incluindo produtos farmacêuticos, produtos químicos, medicina, alimentos, ração, têxtil, impressão, agricultura, tratamento de resíduos e cosméticos. Essa gama de aplicações decorre da verificação de que os sistemas microencapsulados têm excelentes características, tais como estabilidade das propriedades físico-químicas e biológicas do produto (protegem o material de núcleo dos efeitos da radiação ultravioleta, umidade ou do contato com oxigênio), aumento do tempo de prateleira, facilidade de armazenamento e distribuição, biodisponibilidade de bioativos no sítio ou local alvo, solubilidade em água e liberação controlada do princípio ativo (MADEIRA, 2009; SILVEIRA et al., 2013; SINGH; DIXIT, 2014; ANANDAHRAMAKRISHNAN; ISHAWARYA, 2015; KESHANI et al., 2015).

Dentre as diversas aplicações da microencapsulação, destacam-se os produtos alimentícios. Os tipos de materiais de núcleo que são encapsulados para aplicações alimentícias incluem sabores, vitaminas, minerais, gorduras, óleos, corantes, enzimas, micro-organismos, probióticos e outros compostos nutricionais. Os materiais de parede utilizados para encapsulação de ingredientes alimentares incluem hidrocolóides (goma

arábica, ágar, alginato, quitosano, pectina), carboidratos (amido, maltodextrinas, xarope de milho, ciclodextrinas), celulose (carboximetilcelulose, metilcelulose, etc.), proteína de soro de leite, gelatina, proteínas de soja e lipídios (óleos, gorduras, cera, parafina, fosfolipídios) (MURUGESAN; ORSAT, 2012; MAHDAVI et al., 2014).

Oliveira (2011) produziu micropartículas lipídicas contendo *Lactobacillus acidophilus* ou *Bifidobacterium lactis* por meio da técnica *spray chilling* (injeção de ar frio para permitir a solidificação da partícula, técnica na qual é comum a utilização de lipídios como agente encapsulante). No estudo, foi avaliada a sobrevivência dos micro-organismos à passagem pelo trato gastrointestinal. Os resultados mostraram que 91,8% das células de *L. acidophilus* e 90,7% de *B. lactis* permaneceram viáveis no intestino.

A microencapsulação de produtos naturais oriundos de plantas também tem sido investigada como estratégia tecnológica para o desenvolvimento de bioprodutos com aplicações alimentícias, farmacêuticas e cosméticas. Estudos realizados por Barros e Stringheta (2006) e revisão de Mahdavi et al. (2014) demonstraram que antocianinas microencapsuladas apresentam maior estabilidade diante dos fatores luz, pH e calor do que as não microencapsuladas. Sansone et al. (2014) obtiveram microcápsulas do extrato de *Lannea microcarpa* Engl e K. Krause (Anacardiaceae), com estabilidade funcional e características tecnológicas melhoradas mediante secagem por aspersão. A microencapsulação do extrato de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (Aquifoliaceae) por *spray drying*, utilizando maltodextrina como material de parede, foi investigada por Nunes et al. (2015).

A obtenção de óleos essenciais microencapsulados é outra importante área de aplicação da microencapsulação, uma vez que aumenta significativamente a vida de prateleira desses produtos, por prevenir sua oxidação, sua volatilização e sua aglomeração, além de possibilitar a liberação controlada e a conversão de aromatizantes líquidos em sólidos (BERTOLINI et al., 2001; KANAKDANDE et al., 2007; ALVES et al., 2014).

Sistemas de encapsulação

o sistema de encapsulação pode ser classificado quanto à estrutura, à disposição do ingrediente na matriz polimérica e às dimensões do encapsulamento. Quanto à estrutura, pode ter três formas: (1) Quando o ingrediente que é encapsulado ou agente ativo é o preenchimento ou a fase interna do encapsulamento, semelhante a um sistema de reservatório ou cápsula mononuclear; (2) Quando o ingrediente ativo pode estar disperso sobre os materiais encapsulantes ou adsorvido na superfície da matriz, com distribuição relativamente homogênea; (3) Quando o ingrediente é encapsulado em núcleos dispersos no centro da matriz polimérica (JAIN et al., 2011; ARÁN-AIS et al., 2012; GAONKAR et al., 2014; SINGH; DIXIT, 2014; ANANDAHRAMAKRISHNAN; ISHWARYA, 2015).

O ingrediente ativo pode assumir diferentes disposições na matriz polimérica em uma microencapsulação, dentro de uma esfera ou de forma amorfa. Essas características podem afetar significativamente a estabilidade e a liberação do ingrediente ativo. As propriedades físico-químicas do ingrediente ativo (solubilidade, volatilidade e propriedades químicas), a composição do material de parede, a técnica empregada no processo de encapsulação e as condições de secagem vão direcionar o tamanho, a forma e a estrutura interna do produto obtido. É importante observar se, na formação das micro ou nanoesferas, não há muitos defeitos como furos ou curvaturas, pois podem interferir na estabilidade do produto. A presença de defeitos pode causar degradação oxidativa ou hidrolítica durante longos períodos (THILAGAVATHI; BALA, 2007; STECANELLA, 2011; SALOMÃO, 2012; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012; VIDAL et al., 2013).

Quanto à classificação dimensional, o encapsulamento pode ser classificado em escala macro, micro e nano. A distinção entre micro e nanoencapsulamento, em termos de dimensão, não foi claramente diferenciada e ambas as formas têm sido usadas indiferentemente na literatura. Baseado no tamanho, o nome e a tecnologia de encapsulação são diferentes, a saber: cápsulas de 0,2 a 1000 μm de tamanho são chamadas microcápsulas, partículas menores que 0,2 μm são chamadas nanocápsu-

las e cápsulas maiores que 1000 μm são referidas como macrocápsulas. Algumas microcápsulas menores que 1 μm podem ser descritas como nanocápsulas (TANAKA, 2007; MADEIRA, 2009; CARVALHO, 2010; FANG; BHANDARI, 2010; ARÁN-AIS et al., 2012).

Encapsulantes

A escolha do agente encapsulante depende de uma série de fatores, entre eles, a não reatividade com o material a ser encapsulado, o processo utilizado para a formação da microcápsula e o mecanismo de liberação ideal. Os agentes encapsulantes são basicamente materiais formadores de filmes, que podem ser selecionados de uma ampla variedade de polímeros naturais e sintéticos. A abundância de polímeros naturais e sintéticos fornece um amplo escopo para a escolha do material do invólucro, que pode ser permeável, semipermeável ou impermeável. As cápsulas permeáveis são utilizadas para aplicações de fácil liberação, enquanto as cápsulas semipermeáveis são impermeáveis aos materiais de núcleo, mas permeáveis a líquidos de baixo peso molecular. Podem ser utilizadas para absorver substâncias do ambiente e liberá-las novamente quando introduzidas no meio.

Os invólucros impermeáveis envolvem o material do núcleo e protegem-no do ambiente externo. Por conseguinte, para liberar o conteúdo do núcleo, a casca deve ser rompida por pressão externa, fundida, dissolvida em solvente ou degradada sob a influência da luz. A liberação do material do núcleo através do invólucro permeável é principalmente controlada pela espessura da parede do invólucro e pelo tamanho de poro (ARÁN-AIS et al., 2012).

O tipo de material apropriado para a encapsulação depende do tipo de material a ser encapsulado, considerando a hidrofiliabilidade ou hidrofobicidade, solubilidade, entre outras características. Muitos materiais podem ser utilizados como cobertura para as microcápsulas, dentre eles: goma arábica, ágar, alginato e carragena; os carboidratos amido, amidos modificados, dextrinas e sacarose; as celuloses carboximetilcelulose, acetilcelulose, nitrocelulose; os lipídios parafina, mono e diacilgliceróis, óleos e gorduras; os materiais inorgânicos sulfato de cálcio e

silicatos; as proteínas do glúten, caseína, gelatina e albumina e algumas fontes alternativas como quitosana, obtida a partir da quitina, extraída da casca de crustáceos (FAVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008; RIGHETTO, 2003).

A goma arábica tem mostrado resultados promissores no encapsulamento de substâncias bioativas devido a sua habilidade de agir como emulsificante, com excelente desempenho, portanto, no encapsulamento de óleos essenciais e aromas. Esse polissacarídeo é um polímero natural ramificado de monômeros de galactose, ramanose, arabinose e ácido glucurônico com boa solubilidade em água (500 g/L) e baixa viscosidade em altas concentrações (KRISHNAN; KSHIRSAGAR; SINGHAL, 2005; FERNANDES; BORGES; BOTREL, 2014).

Segundo Kennedy, Phillips e Williams (2012), sua extração é feita a partir de espécies de *Acacia senegal* ou *Acacia seyal*. É muito utilizada na indústria alimentícia e é considerada um produto seguro para o consumo humano, desde que seja assegurado pelo controle microbiológico e físico-químico que não houve contaminação nas etapas de coleta, transporte e armazenamento. A goma arábica proveniente da espécie *Acacia senegal* é considerada de melhor qualidade para a emulsificação e formação de biofilme. Ela tem a excelente função de proteger ou reter compostos voláteis durante o processo de secagem em *spray dryer*. Apesar de sua habilidade de emulsificação e boa retenção de compostos voláteis, ela tem um alto custo. Suas propriedades físico-químicas variam de acordo com sua origem, idade da árvore que foi extraída, tipo de exsudação, tipo e condições de armazenamento (KRISHNAN; KSHIRSAGAR; SINGHAL, 2005; KENNEDY; PHILLIPS; WILLIAMS, 2012; FERNANDES; BORGES; BOTREL, 2014).

Dentre os carboidratos utilizados como encapsulantes, destacam-se as maltodextrinas. As maltodextrinas são biopolímeros originados da hidrólise parcial do amido e têm extensa utilização como ingredientes por proporcionarem características desejáveis, especialmente a alimentos processados. A importância comercial desses hidrolisados de amido tem aumentado devido às suas propriedades espe-

ciais. Em geral, as maltodextrinas são carboidratos de baixa densidade, totalmente solúveis em água e não possuem aroma de amido (COUTINHO; CABELLO, 2008).

Maltodextrinas são classificadas pelo seu grau de hidrólise, expresso em dextrose equivalente (DE). A dextrose equivalente (DE) é uma medida que caracteriza a extensão da hidrólise do amido e também indica uma média do peso molecular. Conforme aumenta o grau de hidrólise, a média do peso molecular diminui e a DE aumenta. Esta é uma medida essencialmente empírica da quantidade de açúcar redutor presente no produto e é expressa na base seca. A dextrose usada como padrão é o amido (DE=0) e a glicose (DE=100). Por definição, maltodextrina é todo material que tenha uma DE entre 3 e 20. A DE reflete, simplesmente, o poder de redução, e indica sua estabilidade e funcionalidade (MOLLAN-JR; ÇELIK, 1996; GIL, 2009).

Apesar de suas aplicações variadas, normalmente, a adição desses hidrolisados de amido na formação de material de parede em microcápsulas não é suficiente para suprir as características e qualidades desejadas, sendo necessária a adição de outros carboidratos, como a goma arábica, para conferir maior viscosidade, estabilidade, fornecer maior proteção e menor custo (SCHIERBAUM et al., 1992; MOLLAN-JR.; ÇELIK, 1996).

Técnicas de encapsulação

os primeiros registros de microencapsulação estão associados ao uso de *spray drying*, umas das principais técnicas de secagem de microemulsões. As metodologias citadas na literatura para a microencapsulação são: *spray drying*, *spray chilling*, *spray colling*, cobertura por *spray* em leito fluidizado, extrusão, extrusão centrífuga em múltiplos orifícios, cocristalização, liofilização, inclusão molecular, polimerização interfacial, coacervação ou separação de fases e emulsificação seguida de evaporação do solvente. As técnicas para a preparação de microcápsulas podem ser divididas em físicas (*spray drying*, *spray chilling*, *spray colling*, extrusão e etc.), químicas (polimerização interfacial) e físico-químicas (coacervação, captura de lipossoma, etc.) (CONTO, 2012; OLIVEIRA, 2010).

A escolha de cada técnica deve ser direcionada de acordo com a composição do material a ser encapsulado e das propriedades físico-químicas desejadas para o produto final, que são determinadas pelo tamanho, forma e cor das partículas, capacidade de sorção da água, estabilidade química, solubilidade em água, higroscopicidade e propriedades de escoamento (PEDRO, 2009; MORE; WAGH, 2014; RIBEIRO, 2014).

***Spray drying* ou secagem por atomização**

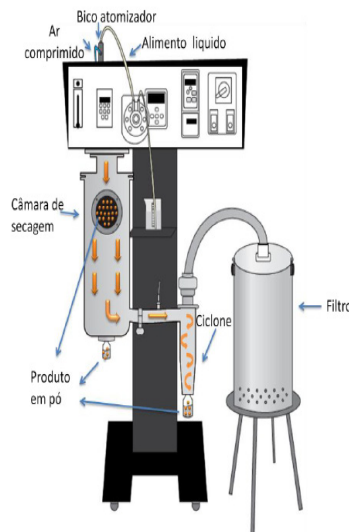
Uma das técnicas mais utilizadas é o *spray drying* ou secagem por atomização. Esse método é amplamente utilizado na secagem de fluidos na forma de fluxo simples. Suas principais aplicações são na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética. O processo é um fenômeno multifásico, que envolve fase gasosa (ar de secagem), fase líquida (gotículas) e fase sólida (partículas). O pó obtido no processo de secagem por atomização tem suas características influenciadas por variáveis de processo do líquido atomizado (teor de sólidos, tamanho das partículas, viscosidade, tipo de coadjuvantes), mecanismo de funcionamento do atomizador, características do ar de secagem, evaporação da água e separação de partículas (MADEIRA, 2009; MORAES, 2014) (Figura 1). Cada etapa exerce influência na qualidade do produto final.

A atomização é a fragmentação do líquido ou sólido em pequenas unidades, como, por exemplo, em um *spray dryer*, é a dispersão de um líquido em gotículas, formando uma névoa. A distribuição do líquido em unidades menores ou em um número maior de gotículas conduz o resto do processo de secagem, reduzindo a resistência interna de transferência de umidade da gotícula para o meio a sua volta, devido ao aumento da área superficial do fluido. O aumento da área de superfície do fluido permite que a secagem por pulverização atinja uma velocidade de secagem mais rápida, característica importante para perda mínima de compostos sensíveis ao calor. A atomização é o processo central para secagem por pulverização, pois influencia a forma, estrutura, velocidade e distribuição de tamanho das gotículas e, por sua vez, o tamanho das

partículas e a natureza do produto final (VANDEGAER, 1974; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010; JAIN et al., 2011).

A desintegração do líquido na ponta do atomizador ocorre em virtude da pressão no jato líquido emergente e da ação das forças aéreas. A resistência à desintegração é oferecida pela viscosidade e forças de tensão superficial no líquido. O realinhamento das tensões de cisalhamento no interior do líquido, uma vez que a gotícula está no ar, contribui para a separação das gotículas durante a atomização (VANDEGAER, 1974; BENITA, 2006; GAONKAR et al., 2014; ANADAHARAMAKRISHNAN; ISHWARYA, 2015).

Figura 1 – Etapas do processo de *Spray drying*. (A), Atomização; (B), Contato do líquido pulverizado com o ar quente; (C) Evaporação da água; (D) Separação de partículas



Fonte: Ribeiro (2014).

Quando as gotículas entram em contato com o ar quente da câmara de secagem, há aumento da agitação térmica e diminuição das forças de coesão (atração natural por outras moléculas de água) presentes na água, resultando na diminuição da tensão superficial da gotícula.

Fisicamente, o aumento da temperatura faz com que a energia cinética das moléculas de água e o efeito das colisões aumentem a um ponto crítico aos quais as forças intermoleculares (dipolo-dipolo ou força adesiva) não tenham domínio e resultam no desagrupamento das moléculas promovendo a passagem da água do estado líquido para o estado de vapor. Com a evaporação da água de superfície das gotículas, criam-se forças de capilaridade que carregam a água livre das zonas mais internas, fazendo a água fluir para a superfície do material a ser seco. Portanto, a umidade residual ou atividade de água do produto final depende do sistema de pressão, temperatura e volume de alimentação do fluido (CARVALHO, 2010). Assim, a fase de atomização garante mais que a secagem do produto, também a formação de partículas com estrutura específica, de acordo com o tipo do bico de atomização, os parâmetros de secagem e forma da câmara de secagem.

O uso de atomizadores centrífugos (o líquido de alimentação é bombeado para um disco giratório e pela força centrífuga é expelido pelas extremidades do atomizador) promovem rotações do disco entre 10000 a 20000 rpm e a pressão nos bicos varia entre 17 a 25 MPa. Segundo esses parâmetros, são formadas partículas uniformes com o diâmetro médio de 20 a 150 μm . Nos atomizadores que utilizam alta pressão (700 a 1000 KPa) através de um orifício no interior da câmara de secagem, as gotículas podem variar de 100 a 300 μm de diâmetro. Para fluidos com alta viscosidade, uma opção é o bico pneumático (ar comprimido) ou duplo fluido (MADEIRA, 2009; PEDRO, 2009; SILVEIRA et al., 2013).

Após a escolha do tipo de atomizador e suas propriedades, o próximo passo é o contato do material pulverizado com o ar quente. Isso permite a evaporação rápida da umidade da superfície de todas as gotas de uma maneira uniforme. Aqui, o requisito crítico é o fluxo de gás uniforme para todas as partes da câmara de secagem. Existem diferentes fluxos de corrente de ar, como fluxo cocorrente, contracorrente e misto (PEDRO, 2009).

No fluxo cocorrente, o produto e o meio de secagem passam através do secador na mesma direção. Nessa disposição, as gotículas atomi-

zadas que entram na câmara de secagem logo entram em contato com o ar de entrada quente, mas a sua temperatura é mantida mais baixa do que a temperatura de entrada, devido à elevada taxa de evaporação, próximo ao bico de atomização. O ar mais frio, por sua vez, transporta pneumáticamente as partículas secas através do sistema. O tempo de contato do ar quente com as gotas pulverizadas é de apenas alguns segundos, durante os quais a secagem é alcançada e a temperatura do ar cai instantaneamente. Isso resulta em vantagens, tais como baixa temperatura e baixo tempo de permanência das partículas, com menos degradação térmica de produtos sensíveis ao calor (MORE; WAGH, 2014; ANANDAHRAMAKRISHNAN; ISHWARYA, 2015).

Na configuração contracorrente, o produto e o ar de secagem entram em extremidades opostas da câmara de secagem. A temperatura do produto de saída é maior do que a temperatura do ar de exaustão e está quase na temperatura do ar de alimentação, com a qual está em contato. Esse tipo de arranjo é usado somente para produtos resistentes ao calor (MORE; WAGH, 2014; ANANDAHRAMAKRISHNAN; ISHWARYA, 2015).

Já no fluxo misto, a conformação do secador incorpora fluxo de cocorrente e contracorrente. Esse tipo de fluxo é utilizado para secar o pó grosso de escoamento livre, mas o inconveniente é a temperatura de saída mais elevada. Nesse processo, o ar desempenha papel duplo, atuando como veículo de calor e como adsorvente. Assim, a temperatura de secagem, umidade relativa e vazão de ar afetam na secagem do produto. Parâmetros como temperatura de entrada e saída são importantes para determinar as características físico-químicas do produto final (densidade, porosidade, solubilidade, morfologia do pó, umidade e cor) e no rendimento de secagem. A temperatura de saída normalmente não é controlada e depende da temperatura de entrada, apresentando uma relação direta. A temperatura de entrada deve ser alta o suficiente para se obter um produto final com baixa umidade residual e maior rendimento de secagem (a escolha da temperatura de entrada deve levar em conta a sensibilidade térmica dos componentes da alimentação para evitar a degradação térmica) (MORAES, 2014).

As variáveis do processo de secagem devem ser controladas para minimizar a aderência de partículas na câmara de secagem, fenômeno conhecido como *sticking*. A elevada temperatura do ar de secagem ao retirar a umidade do produto provoca mudanças de viscosidade, deixando-o mais concentrado. Na concentração crítica, observa-se um abrupto aumento da viscosidade e, nesse momento, o material passa a apresentar adesividade, diminuindo o rendimento de secagem. Isso ocorre devido à transição vítrea (T_g) do material e a geração de cargas eletrostáticas. O material seco é transformado em um material pegajoso. Essa característica pode estar associada à elevada concentração de açúcares e ácidos orgânicos de baixo peso molecular, pois facilmente podem apresentar comportamento termoplástico. A adição de coadjuvantes ou materiais de parede podem aumentar a temperatura de transição vítrea e o rendimento de secagem (PEDRO, 2009; BARBOSA, 2010; MORAES, 2014).

No processo de secagem por atomização, alguns parâmetros importantes devem ser observados, de acordo com Pedro (2009); Handscomb, Kraft e Bayly (2009); Barbosa (2010); Mahdavi et al. (2014); Moraes (2014); More e Wagh (2014); Anandahramakrishnan e Ishwarya (2015):

- a) O aumento da velocidade de fluxo de alimentação reduz a temperatura de saída e a diferença de temperatura entre a temperatura de entrada e a temperatura de saída. Isso resulta em produto com maior umidade residual.
- b) A alta velocidade do ar de aspiração leva o maior grau de separação no ciclone e a menor velocidade de aspiração resulta em menor umidade residual. Quanto maior a velocidade de alimentação, maior o tamanho das partículas no produto final.
- c) A temperatura do ar de secagem deve estar abaixo da temperatura de transição vítrea (T_g), a fim de evitar colapso do produto e viscosidade na câmara de pulverização. A T_g do fluido pode se tornar mais elevada para uma operação de secagem por pulverização pela adição de adjuvantes de elevado peso molecular, tais como maltodextrina. O teor de água no

fluido de alimentação é também um parâmetro significativo no controle de T_g , já que a água reduz a T_g .

O exame da cinética de secagem do processo de atomização é crítico na previsão da transferência de calor e massa no material de secagem. Isso pode ser mais bem explicado por um modelo matemático para a evaporação de uma única gota que é submetida a secagem por atomização. Inicialmente, quando a gota é exposta a gás quente, ocorre rápida evaporação. Durante essa exposição, a gotícula é aquecida desde a sua temperatura inicial (T_0) até a temperatura de evaporação de equilíbrio (T_{eq}). Após esse período, a remoção da umidade permanece constante na curva de velocidade de secagem. A superfície da gota permanece saturada com umidade nessa fase e sua temperatura é constante com a temperatura do ar de secagem (VANDEGAER, 1974; BENITA, 2006; MAHDAVI et al., 2014; MORAES, 2014; MORE; WAGH, 2014; ANANDAHRAMAKRISHNAN; ISHWARYA, 2015).

À medida que a remoção de umidade da gotícula prossegue, o soluto dissolvido no líquido atinge uma concentração além da sua concentração de saturação e tende a formar uma camada fina na superfície da gotícula descrita como formação de crosta (ANANDAHRAMAKRISHNAN; ISHWARYA, 2015).

O início do evento de formação de crosta é uma característica cinética importante do processo de secagem por atomização à medida que se aumenta a temperatura. Após a formação da crosta, a remoção de umidade se transforma em um processo controlado por difusão e a taxa de evaporação depende da taxa de difusão do vapor de água através da camada superficial seca (ANANDAHRAMAKRISHNAN; ISHWARYA, 2015).

Quando a pressão parcial do vapor de umidade do centro da gota excede a pressão ambiente, há a formação da bolha e subsequente aumento da temperatura. É necessária uma considerável energia para a vaporização. Com a diminuição da umidade, a bolha alcança a secagem pela temperatura do ar. A inflação da gota para outros raios pode resultar em partículas irregulares ou amorfas (ANANDAHRAMAKRISHNAN; ISHWARYA, 2015). Em alguns casos, não há a inflação da bolha, mas a formação de um furo ou vacúolos no interior da esfera ou

cápsula. Por meio da microscopia eletrônica de varredura, é possível observar furos nas microcápsulas (BOUMAN et al., 2016).

No que se refere ao sistema de recolhimento de partículas, há vários modelos, tais como ciclone, filtro de saco e o precipitador eletrostático. O sistema de recolhimento mais utilizado é um ciclone (Figura 1), integrado à câmara de secagem por pulverização, em que se utiliza a força centrífuga para separar as partículas sólidas do ar transportador. É constituído por uma parte cilíndrica superior e uma parte cônica inferior. A corrente de ar, carregada com partículas sólidas, deixando a câmara de secagem, entra tangencialmente na parte superior do cilindro e vai em direção ao cone, formando um vórtice. A velocidade crescente do ar no vórtice externo exerce uma força centrífuga sobre as partículas, separando-as da corrente de ar. Quando a corrente de ar atinge o fundo do cone, um vórtice interno é criado, invertendo, assim, sua direção e saindo na parte superior como ar limpo. As partículas caem no recipiente de recolhimento ligado ao fundo do ciclone (GAONKAR et al., 2014; ANANDAHRAMA-KRISHNAN; ISHWARYA, 2015).

A morfologia das partículas obtidas no processo de secagem por atomização é influenciada pelos parâmetros do processo, adjuvantes de secagem e natureza do material encapsulado. O formato da maior parte das partículas atomizadas é esférico, o que garante a fluidez do bioproduto. Isso auxilia o processo de manuseio e envase, por exemplo, e a diminuição de custos. É importante que as partículas possuam, ainda, homogeneidade na composição e na distribuição de tamanho, minimizando a produção de partículas muito finas (PEDRO, 2009; MAHDAVI et al., 2014).

A morfologia das partículas afeta as principais características de qualidade de produtos secos por atomização, tais como fluidez, friabilidade, umidade, massa e densidade. Por isso, é vital compreender as variáveis que decidem a morfologia e os padrões de morfologia frequentes nos produtos secos por atomização. A baixa concentração de sólidos no material a ser seco, por exemplo, pode contribuir para a não formação de esferas; a alta temperatura pode transformar uma microcápsula seca em partículas amorfas, causar a ruptura da superfície das micro-

cápsulas e murchá-las (HANDSCOMB; KRAFT; BAYLY, 2009; SLOTH et al., 2009; BOUMAN et al., 2016).

A literatura mostra que é possível alterar a morfologia das partículas secas por pulverização, aplicando estratégias estatísticas de otimização dos parâmetros do processo. Ao mesmo tempo, é difícil quantificar e avaliar as variáveis do processo que influenciam a morfologia, devido às interações complexas entre as variáveis e os padrões de secagem exclusivos de diferentes materiais submetidos à secagem por pulverização (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010; GAONKAR et al., 2014; ANANDAHRAMAKRISHNAN; ISHWARYA, 2015).

A porosidade da partícula é outro aspecto a ser considerado. Algumas matérias-primas podem originar uma porosidade elevada e desordenada. Tais condições dependem da temperatura de secagem e das propriedades físico-químicas do material de secagem (núcleo e materiais de parede ou agentes encapsulantes) (SLOTH et al., 2009).

Conclusão

A microencapsulação de produtos naturais é uma tecnologia em expansão na atualidade como passo importante para a obtenção de bioprodutos de alta qualidade, por ser uma forma particular de carrear diferentes compostos bioativos dentro de outros compostos chamados materiais de parede. Essa tecnologia permite incorporar ingredientes instáveis, tais como polifenóis, óleos essenciais, corantes, enzimas e micro-organismos em matrizes poliméricas, de forma a estabilizá-los, protegê-los e preservá-los por um período maior. Ademais, a microencapsulação pode simplificar os processos de manufatura de bioprodutos por converter líquidos em sólidos pulverizados, diminuindo os custos de produção. Nesse sentido destaca-se a técnica de secagem por atomização. As microcápsulas obtidas por essa técnica de secagem podem originar produtos com características como fluidez, friabilidade, umidade, massa e densidade adequadas aos processos industriais.

Referências

- ALVES, S. F.; BORGES, L. L.; SANTOS, T. O.; PAULA, J. R.; CONCEIÇÃO, E. C.; BARA, M. T. F. Microencapsulation of essential oil from fruits of *Pterodon emarginatus* using gum arabic and maltodextrin as wall materials: composition and stability. **Drying Technology**, v. 32, p. 96-105, 2014.
- ANANDAHRAMAKRISHNAN, C.; ISHWARYA, P. I. **Spray drying techniques for food ingredient encapsulation**. San Francisco: John Wiley and Sons, 2015.
- ARÁN-AIS, F.; PÉREZ-LIMIÑANA, M. A.; SÁNCHEZ-NAVARRO, M. M.; ORGILÉS-BARCELO, C. Developments in Microencapsulation technology to improve adhesive formulations. **The Journal of Adhesion**, v. 88, p. 391-405, 2012.
- BARBOSA, S. J. **Qualidade de suco em pó de mistura de frutas obtido por spray drying**. 107p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal no Semiárido, Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, 2010.
- BARROS, F. A. R.; STRINGHETA, P. C. Microencapsulamento de antocianinas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 36, p. 273-279, 2006.
- BENITA, S. **Microencapsulation: methods and industrial applications**. 2. ed. New York: CRC Press Boca Raton, 2006.
- BERTOLINI, A. C.; SIANI, A. C.; GROSSO, C. R. F. Stability of monoterpenes of encapsulated in gum arabic by spray-dring. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 780-785, 2001.
- BOUMAN, J.; VENEMA, P.; VRIES, R. J.; LINDEN, E. V.; SCHUTYSER, M. A. I. Hole and vacuole formation during drying of sessile whey protein droplets. **Food Research International**, v. 84, p. 128-135, 2016.
- CARVALHO, F. **Construção e avaliação de desempenho de um spray dryer piloto**. 167p. Tese (Doutorado). Pós-Graduação em Ciências de Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2010.
- CONTO, L. C. **Produção de microcápsulas contendo éster etílico de ácidos graxos polinsaturados ômega-3 de óleo de peixe**. 226f. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.
- COUTINHO, A. P. C.; CABELLO, C. Características estruturais e físico-químicas de maltodextrinas de mandioca e batata-doce. **Revista Energia na Agricultura**, v. 23, n. 3, p. 16-32, 2008.
- FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols: a review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, p. 510-523, 2010.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 103-112, 2008.

FERNANDES, R. V. B.; BORGES, S. V.; BOTREL, D. A. Gum arabic/starch/ maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 524-532, 2014.

GAONKAR, A.; VASISHT, N.; KHARE, A.; SOBEL, R. **Microencapsulation in the Food Industry: A practical Implementation Guide**. London: Academic Press, 2014.

GIL, P. C. N. **Uso da maltodextrina na substituição do amido em dieta para equinos**. 63f. Dissertação (Mestrado). Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

HANDSCOMB, C. S.; KRAFT, M.; BAYLY, A. E. A new model for the drying of droplets containing suspended solids. **Chemical Engineering Science**, v. 64, p. 628-637, 2009.

JAIN, M. S.; LOHARE, G. B.; BARI, M. M.; CHAVAN, R. B.; BARHATE, S. D.; SHAH C. B. Spray drying in pharmaceutical industry: a review. **Research Journal of Pharmaceutical Dosage Forms and Technology**, v. 4, n. 2, p. 74-79, 2011.

KANAKDANDE, D.; BHOSALE, R.; SINGHAL, R.S. Stability of cumin oleoresin microencapsulated in different combination of gum arabic, maltodextrin and modified starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, p. 536-541, 2007.

KENNEDY, J. F.; PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. **Gum Arabic**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2012.

KESHANI, S.; KESHANI, S.; DAUD, W. R. W.; NOUROUZI, M.M.; NAMVAR, F.; GHASEMI, M. Spray drying: an overview on wall deposition, process and modeling. **Journal of food Engineering**, v. 146, p. 152-162, 2015.

KRISHNAN, S.; KSHIRSAGAR, A. C.; SINGHAL R. S. The use of gum arabic and modified starch in the microencapsulation of a food flavoring agent. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, p. 309-315, 2005.

MADEIRA, A. N. **Otimização do processo de spray drying pelo uso de pré-desumificadores no ar de entrada**. 65f. Dissertação (Mestrado). Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade de Taubaté, Universidade de Taubaté, Taubaté, 2009.

MADENE, A.; MURIEL, J.; SCHER, J.; DESOBRY, S. Flavour encapsulation and controlled release – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, n. 1, p. 1-21, 2006.

MAHDAVI, S. A.; JAFARI, S. M.; GHORBANI, M.; ASSADPOOR, E. Spray-drying microencapsulation of anthocyanins by natural biopolymers: a review. **Drying Technology**, v. 32, p. 509-518, 2014.

MOLLAN-JR, M. J.; ÇELIK, M. The effects of lubricant on the compaction and post – compaction properties directly compressible maltodextrins. **International Journal Pharmaceuticals**, v. 144, n. 1, p. 1-9, 1996.

MORAES, F. P. **Polpa desidratada de caju amarelo (*Anacardium occidentale* L.) por atomização em *spray dryer*: caracterização físico-química, bioativa e estudo da vida de prateleira do produto**. 140f. Dissertação (Mestrado). Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

MORE, S. K.; WAGH, M. P. Review on spray drying technology. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 4, n. 2, p. 219-225, 2014.

MURUGESAN, R.; ORSAT, U. Spray drying for the production of nutraceutical ingredients: a review. **Food Bioprocess Technology**, v. 5, p. 3-14, 2012.

NUNES, G. L.; BOAVENTURA, B. C. B.; PINTO, S. S.; VERRUCK, S.; MURAKAMI, F. S.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMBONI, R. D. M. C. Microencapsulation of freeze concentrated *Ilex paraguariensis* extract by spray drying. **Journal of Food Engineering**, v. 151, p.60-68, 2015.

OBEIDAT, W. N. Recent patents review in microencapsulation of pharmaceuticals using de emulsion solvent removal methods. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 3, n. 3, p. 178-192, 2009.

OLIVEIRA, D. L. P. **Produção e avaliação de micropartículas lipídicas contendo *Lactobacillus acidophilus* ou *Bifidobacterium lactis* produzidas por *spray chilling***. 76f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2011.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por asperção (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 4, p. 641-650, 2010.

PEDRO, M. A. M. **Influência de encapsulantes e do método de secagem nas propriedades físico-químicas e atributos de qualidade de polpa de maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) em pó**. 204 f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2009.

RÉ, M. I. Formulating drug delivery systems by spray drying. **Drying Thecnology**, v. 24, n. 4, p. 433-446, 2006.

RIBEIRO, L. C. **Produção de acerola em pó: métodos de secagem e avaliação da estabilidade.** 126f. Dissertação (Mestrado). Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

RIGHETTO, A. M. **Caracterização físico-química e estabilidade de suco de acerola verde microencapsulado por atomização e liofilização.** 200f. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

SALOMÃO, W. F. **Microencapsulação de dimetil dissulfeto (DMS) por *spray drying* e *spray congealing*.** 235p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

SANSONE, F.; MENCHERINI, T.; PICERNO, P.; ESPOSITO, T.; GAUDIO, P. D.; RUSSO, P.; PEPE, G.; LAURO, M. R.; AQUINO, R. P. Microencapsulation by spray drying of *Lannea microcarpa* extract: technological characteristics and antioxidant activity. **Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research**, v. 2, n. 4, p. 100-109, 2014.

SCHIERBAUM, F.; RADOSTAZ, S.; VORWERGZ, W.; YURIEV, V. P.; BRAUDO, B.B.; GERMAN, M. L. Characterisation of maltodextrin gelling by low-resolution NMR. **Carbohydrate Polymers**, v. 18, n. 3, p. 155-163, 1992.

SILVEIRA, A. C. P.; PERRONE, I. T.; JÚNIOR, P. H. R.; CARVALHO, A. F. de. Secagem por *spray*: uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 391, p. 51-58, 2013.

SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento.** Porto Alegre: Artmed, 2017.

SINGH, S.; DIXIT, D. A review on spray drying: Emerging technology in food industry. **International Journal of Applied Engineering and Technology**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2014.

SLOTH, J.; JORGENSEN, K.; BACH, P.; JENSEN, A. D.; KIIL, S.; DAM-JOHANSEN, K. Spray drying of suspensions for Pharma and Bio Products: drying kinetics and morphology. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, p. 3657-3664, 2009.

SOUTO, E. B., SEVERINO, P., SANTANA, M. H. A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados – parte II. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 101-106, 2012.

STECANELLA, L. A. **Desenvolvimento e Caracterização de Nanopartículas Poliméricas contendo Grandisina.** 72f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Goiás. Faculdade de Farmácia, Goiânia, 2011.

TANAKA, D. L. **Influência da desidratação por *spray drying* sobre o teor ácido ascórbico no suco de acerola (*Malpighia* spp.).** 73f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

THILAGAVATHI, G.; BALA, S. K. Microencapsulation of herbal extracts for microbial resistance in healthcare textiles. **Indian Journal of Fibre & Textile Research**, v. 32, p. 351-354, 2007.

TIWARI, S.; GOEL, A.; JHA, K. K.; SHARMA, A. Microencapsulation techniques and its application: a review. **The Pharma Research**, v. 3, p. 112-116, 2010.

VANDEGAER, J. E. **Microencapsulation: processes and applications.** New York and London: Plenum Press, 1974.

VIDAL, L. J. Microencapsulation of maqui (*Aristotelia chilensis* [Molina] Stuntz) leaf extracts to preserve and control antioxidant properties. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 73, n.1, p. 17-23, 2013.

8.

ENZIMAS HIDROLÍTICAS BACTERIANAS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO¹

LARISSA BATISTA DA SILVA
KARINA FREIRE D'EÇA NOGUEIRA SANTOS
ENDERSON PETRÔNIO DE BRITO FERREIRA
CLAUDIA CRISTINA GARCIA MARTIN-DIDONET

As enzimas são catalisadores biológicos presentes nas diferentes classes dos organismos vivos. A partir do estudo de animais, plantas e microrganismos, algumas enzimas foram isoladas e purificadas, sendo observado um grande potencial para aplicações biotecnológicas em diversas áreas (NELSON; COX, 2014).

O estudo da tecnologia enzimática tem relevância internacional crescente, tanto no ambiente acadêmico como na indústria, motivada pela necessidade do desenvolvimento de processos que gerem produtos de qualidade por tecnologias limpas (POLITZER; BON, 2006). Atualmente, as enzimas têm sido empregadas na degradação de compostos orgânicos, sendo bastante utilizadas na indústria de tecidos, detergentes, alimentos e bebidas (BALDO et al., 2013; GRIEBELER et al., 2015).

As enzimas bacterianas são atualmente o segundo grupo de produtos mais explorado na indústria biotecnológica. Dentre as características que contribuem para isso, estão o menor custo, facilidade de produção e amplo espectro de características físico-químicas desses microrganismos.

¹ Capítulo vinculado ao projeto de pesquisa “Prospecção de enzimas isoladas de bactérias associadas a sorgo com interesse biotecnológico”, financiado pelo Programa de Bolsas Institucionais da Universidade Estadual de Goiás (UEG).

mos (STAMFORD; ARAÚJO; STAMFORD, 1998). Entre os principais gêneros citados para obtenção de enzimas bacterianas, estão *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Thermomonospora* (DAHIYA; RATHI, 2015; IRWIN et al., 1998; KOKA; WEIMER, 2000a;).

As enzimas bacterianas utilizadas na indústria, em sua maioria, são de ação hidrolítica, tais como as proteases, amilases, lipases e celulasas. As que clivam ligações peptídicas, produzindo fragmentos proteicos, são as proteases, que se destacam como principais enzimas, correspondendo a cerca de 60% do mercado industrial (DAHIYA; RAO et al., 1998; RATHI, 2015). As amilases, por sua vez, são capazes de catalisar a degradação do amido em açúcares e possuem ampla variedade de funções na indústria, sendo o segundo maior grupo, representando 25% do mercado de enzimas (GURUNG et al., 2013). As lipases são enzimas que têm a capacidade de catalisar a hidrólise de triacilglicerol e são consideradas enzimas-chave na indústria, por suas propriedades multifacetadas, estabilidade, seletividade e ampla especificidade de substratos (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004). Já as celulasas são descritas com um grupo de enzimas que atuam em conjunto na degradação de celulose em açúcares simples, com ampla utilização na indústria (SILVA; CARUSO, 2015).

Apesar dos benefícios econômicos e ambientais relacionados ao uso de enzimas bacterianas, somada à abundante diversidade da microbiota nacional, o Brasil atualmente é um país essencialmente importador de enzimas (DAIHA et al., 2016). Comparado a outros países, que já lideram o uso desta tecnologia, o Brasil ainda tem um reduzido uso de enzimas em processos industriais, importando o que utiliza, sem considerar as enzimas como uma estratégia tecnológica para a exploração da biodiversidade dos países (DAIHA et al., 2016).

Assim, o delineamento do tema abordando as principais enzimas bacterianas de ação hidrolítica utilizada nas mais variadas áreas de aplicação, visa permitir o entendimento da importância do estudo e elaboração de projetos utilizando essas enzimas como alvos. Desse modo, esta revisão se propõe a expor, de modo geral, este tema.

Enzimas

Com o avanço tecnológico no século XX, milhares de enzimas foram descobertas, sendo que, em decorrência desse fato, foi estabelecida, em 1992, uma comissão internacional para a sistematização do estudo e classificação: a Comissão de Enzimas (EC), mantida pelo Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB). Essa comissão vem atuando desde então e estabeleceu uma classificação contendo seis grandes grupos de enzimas, adotando como critério a ação catalítica que desempenham (Tabela 1) (NELSON; COX, 2014).

Atualmente, as enzimas requeridas pela indústria biotecnológica devem atender uma ampla gama de aplicações, bem como atividade catalítica estável, elevada quimiosseletividade e tolerar limites altos de temperatura, pH e condições atmosféricas (QUAX, 2013). Dessa forma, atendendo tais necessidades, as enzimas são consideradas importantes alternativas em processos perigosos envolvendo altas temperaturas, pressões, acidez ou alcalinidade, auxiliando na redução de custo de investimento em equipamentos e sistemas de controle projetados para suprir essas demandas (ADRIIO; DEMAINE, 2014; BINOD et al., 2013).

Tabela 1 – Classificação das enzimas segundo a Comissão de Enzimas (EC – *Enzyme Commission*), mantida pelo Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB)

1º dígito EC	Classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxidoreductases	Transferências de elétrons (oxidação / redução)
2	Transferases	Transferência de grupo
3	Hidrolases	Transferência de grupos funcionais para a água (hidrólise)
4	Liases	Clivagem de ligações (C-C; C-O; C-N) ou outras ligações por eliminação; rompimento de ligações duplas, anéis; ou adição de grupos a ligações duplas
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro de uma mesma molécula produzindo formas isoméricas

1º dígito EC	Classe	Tipo de reação catalisada
6	Ligases	Formação de ligações (C-C; C-O; C-N) por reações de condensação acopladas a hidrólise de ATP ou cofatores similares

Fonte: Adaptado de Nelson e Cox (2014).

A diversidade de processos biotecnológicos que essas moléculas podem ser aplicadas ocasiona uma demanda crescente e impulsiona o avanço de pesquisas que visam a soluções sustentáveis, ambientalmente favoráveis e economicamente viáveis (ADRIO; DEMAIN, 2014). No atual cenário econômico, as enzimas de aplicação industrial contribuem significativamente para a receita anual global, sendo que, em 2014, foi estimado em torno de US\$ 4,2 bilhões. No ano de 2016, esse valor atingiu US\$ 5 bilhões, sendo que há a estimativa de atingir US\$ 6,3 bilhões para 2021, considerando uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 4,7% entre 2016-2021 (BBC-RESEARCH, 2017; SINGH et al., 2016). Das vendas mundiais de US\$ 2,9 bilhões em enzimas microbianas com uso industrial, cerca de 50% correspondem a enzimas bacterianas (QUAX, 2013).

Na contramão do mercado mundial, um estudo recente de Daiha et al. (2016) revelou que, no Brasil, a balança comercial de bens relacionados a enzimas é negativa. O estudo aponta que isso pode estar relacionado ao baixo investimento em pesquisas de inovação na área enzimática destinada ao uso industrial, observada pelos indicadores de inovação no país, como poucas elaborações de patentes nessa área. Outro fator a ser considerado pode ser também a baixa demanda das empresas privadas brasileiras no desenvolvimento de produtos e processos no setor enzimático (DAIHA et al., 2016).

Enzimas bacterianas industriais

As enzimas bacterianas foram inicialmente introduzidas nas indústrias de detergentes (RÖHM, 1915). A primeira enzima comercial produzida por bactérias do gênero *Bacillus* foi comercializada a partir de 1959 e passou a ser utilizada pelas principais fábricas de detergentes por

volta da década de 1960 (BINOD et al., 2013). Em comparação com enzimas de origem vegetal e animal, as de fontes microbianas (bactérias e fungos) têm vantagens econômicas, técnicas e éticas (ROBINSON, 2015). Além disso, as enzimas bacterianas destacam-se pela facilidade de manipulação. Esse aspecto é importante para a aplicação biotecnológica e de engenharia genética, visando à produção de enzimas modificadas com alta pureza, atividade catalítica e especificidade, que vêm revolucionando a utilização global das enzimas (CHOI; HAN; KIM, 2015; ROBINSON, 2015).

Com a tendência ascendente na utilização e consumo de enzimas no dia a dia e no setor industrial, há um aumento na demanda mundial por esses bioprodutos (GOPALAN; NAMPOOTHIRI, 2016). Como consequência, diferentes e variados tipos de abordagens têm sido propostos, como prospecção de enzimas de diferentes fontes naturais (CHOI; HAN; KIM, 2015). Aliado a isso, o incremento tecnológico ocorrido nas últimas décadas permitiu que o custo competitivo da produção das enzimas bacterianas fosse reconhecido, tornando-as mais amplamente utilizadas (ROBINSON, 2015).

No cenário atual, cerca de 200 tipos de enzimas de origem microbiana são usadas comercialmente, dentre as quais 20 são de procedência bacteriana, produzidas em escala industrial (LI et al., 2012; ROBINSON, 2015). Diante da grande demanda mundial por enzimas, os esforços estão focados para encontrar enzimas potenciais a partir de bactérias, já que as enzimas provenientes de vegetais e animais já são insuficientes para suprir o mercado mundial (FAWZYA et al., 2013; RAO et al., 1998).

Do total de enzimas utilizadas pela indústria, cerca de 75% são enzimas hidrolíticas de fonte bacteriana, sendo utilizadas para a degradação de várias substâncias naturais (Tabela 2) (LI et al., 2012). Características como: estabilidade operacional, capacidade de catalisar diversas reações e independência de cofatores garantem às enzimas hidrolíticas uma alta eficiência e ampla utilização na química orgânica sintética (ŻĄDŁO-DOBROWOLSKA et al., 2016).

As bactérias representam uma extraordinária fonte de enzimas devido à sua diversidade bioquímica e a sua capacidade de crescimento rápido, o que as tornam fontes preferenciais para produção de enzimas extracelulares (KARN; KUMAR, 2015). Entre as enzimas hidrolíticas bacterianas comercialmente disponíveis as mais utilizadas são: amilases, proteases, lipases e celulases, com empregabilidade em diferentes áreas (Tabela 2) (LI et al., 2012).

Tabela 2 – Principais enzimas hidrolíticas e suas aplicações tecnológicas em diferentes setores da indústria

Enzima	Área de aplicação	Utilização técnica	Enzima específica	Bactéria produtora	Referência
Proteases	Indústria de detergente	Hidrólise de manchas de proteínas em aminoácidos solúveis em tecidos	serina endopeptidase subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>	Van Der Laan et al. (1991)
				<i>B. licheniformis</i>	
	Indústria alimentícia	Degradação de proteína em seus peptídeos constituintes e aminoácidos	metalo-protease de zinco	<i>Pseudomonas fluorescens</i> RO98	Koka e Weimer (2000a)
Amilases	Indústria de detergentes para roupas	Remoção de resíduos de amido resistentes		<i>B. licheniformis</i> ,	Dahiya e Rath (2015)
	Processamento de amido	Clivagem de ligações α -1,4-glicosídicas na região interna do amido	α -amilase	<i>B. stearothermophilus</i>	El Enshasy (2007);
		Clivagem de ligações α -1,4 a partir de extremidades não redutoras de moléculas de amilose, amilopectina e glicogênio		<i>B. amyloliquefaciens</i>	Božić et al. (2011)

CIÊNCIAS DA SAÚDE: SABERES E PRÁTICAS INTERDISCIPLINARES

Enzima	Área de aplicação	Utilização técnica	Enzima específica	Bactéria produtora	Referência
Lipases	Indústria de detergentes para roupas	Decomposição de substâncias gordurosas, tais como gorduras, manteiga, molhos e as manchas difíceis em golas e punhos	lipase	<i>Bacillus</i> sp. B207	Khoo e Ibrahim (2009); Salihu e Alam (2012).
			alcalinas	<i>P. paucimobi</i>	
	Indústria de síntese orgânica	Acetilação, desacetilação, enantio separação	carboxil-terase	<i>B. subtilis</i> Thai I-8	Quax e Broekhuizen (1994).
Celulases	Indústria têxtil	Remoção da felpa e microfibras, conferindo ao tecido uma aparência mais lisa e mais brilhante, e, para o jeans, uma aparência de desgaste	celulase	<i>Thermomonospora fusca</i>	Irwin et al. (1998)
	Indústria de detergentes para roupas	Modificando a estrutura da fibra de celulose para aumentar o brilho da cor e suavizar o algodão		<i>B. subtilis</i>	Jones e Quax (1998)

Fonte: Adaptado de Li et al. (2012) e Quax (2013).

Proteases

As proteases constituem um grande grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas em outras proteínas, classificadas como hidrolases peptídicas ou peptidases (EC 3.4) e podem ser divididas em endopeptidases (EC 3.4.21-24 e EC 3.4.21-99) e exopeptidases (EC 3.4.11-19) (SOUZA et al., 2015).

A ampla variação do centro ativo dessas enzimas faz com que diferentes tipos de proteases realizem a mesma reação por mecanismos catalíticos diferentes e que sejam classificadas de acordo com essa característica (SUNAR; KUMAR; DESHMUKH, 2016). As exopeptidases, que atuam próximo às extremidades das cadeias polipeptídicas e, na porção

N terminal, são denominadas de acordo com o resultado de sua reação, sendo elas: aminopeptidases (EC 3.4.11), quando gera um único resíduo de aminoácido, dipeptidil-peptidases e tripeptidil-peptidases (EC 3.4.14), quando gera um dipeptídeo ou um tripeptídeo, respectivamente (NC-IUBMB, 2017).

Já as exopeptidases, que atuam na porção C terminal livre do polipeptídeo, são denominadas carboxipeptidases (EC 3.4.16-18) e podem ser divididas em três tipos, segundo seu mecanismo catalítico: serina (EC 3.4.16), metalocarboxipeptidase (EC 3.4.17) e cisteína (EC 3.4.18) (SOUZA et al., 2015). As endopeptidases têm sua ação nas ligações peptídicas no interior da cadeia polipeptídica e são divididas de acordo com o mecanismo catalítico em: serina endopeptidases (EC 3.4.21), cisteína endopeptidases (EC 3.4.22), endopeptidases aspárticas (EC 3.4.23), metaloendopeptidases (EC 3.4.24) e treonina endopeptidases (EC 3.4.25). As endopeptidases, que não se encaixam em tais características, encontram-se agrupadas na subclasse EC 3.4.99 (NC-IUBMB, 2017; SOUZA et al., 2015).

As enzimas proteolíticas constituem o maior grupo de enzimas usadas na indústria (SUNAR; KUMAR; DESHMUKH, 2016), com ampla variedade de aplicações desde a indústria alimentícia, têxtil e até na produção de produtos agroquímicos, representando mais de 60% do mercado global de enzimas (ADRIO; DEMAINE, 2014; KARN; KUMAR, 2015) (Tabela 2). As principais aplicações industriais para as proteases são na fabricação de produtos farmacêuticos, em limpeza a seco e na indústria de detergentes (Tabela 2). Proteases são produzidas pelas espécies *B. subtilis* e *B. licheniformis*, como a serina endopeptidase subtilisina, que é uma protease extracelular, de grande importância para a indústria de detergentes, por sua elevada estabilidade térmica e de pH (SUGANTHI et al., 2013; VAN DER LAAN et al., 1991). Outro exemplo promissor é a enzima metalo-protease de zinco, isolada da estirpe RO98 de *Pseudomonas fluorescens*, que apresenta atividade ótima em pH 5,0 a 35 °C, podendo ser empregada no tratamento do amargor de queijos Cheddar (KOKA; WEIMER, 2000a,b).

Amilases

Amilases (E.C: 3.2.1.0) são enzimas classificadas como hidrolases glicosídicas, que, quando extracelulares, são capazes de hidrolisar ligações α -1,4-glicosídicas em polissacáridos contendo três ou mais unidades de glicose, como o amido (DEB et al., 2013). As amilases podem se apresentar em três tipos principais: α -amilase, β -amilase e γ -amilase, definidas de acordo com seus papéis nas reações enzimáticas (DEB et al., 2013; SOUZA; MAGALHÃES, 2010).

As α -amilases (E.C.3.2.1.1) catalisam a hidrólise de ligações alfa-1,4-glicosídicas internas no amido em produtos de baixo peso molecular, tais como unidades de glicose, maltose e maltotriose (SOUZA; MAGALHÃES, 2010). As β -amilases (EC 3.2.1.2) são exo-hidrolases que atacam o substrato a partir da extremidade não-redutora e hidrolisam a ligação α (1 $\rightarrow$ 4) glicosídicas do amido, resultando a maltose (ABD-ELHALEM et al., 2015; ZANELLA et al., 2016). A γ -amilase (EC 3.2.1.3), por sua vez, é mais eficiente em ambientes ácidos, com um pH ótimo de 3. A enzima γ -amilase é capaz de clivar ligações α (1 $\rightarrow$ 6) glicosídicas e as ligações α (1-4) glicosídicas na extremidade não redutora da amilose e amilopectina, produzindo glicose (SUNDARRAM; MURTHY, 2014).

As amilases estão entre as enzimas hidrolíticas mais importantes para a biotecnologia, pois constituem cerca de 25% do mercado mundial de enzimas com utilização industrial (DEB et al., 2013). Entre as amilases de aplicação comercial, as principais são as produzidas pelas bactérias das espécies de *Bacillus*, tais como: *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus* e *B. amyloliquefaciens*. Essas espécies possuem diferentes empregos, atuando na hidrólise de amido para fabricação de papel, na indústria têxtil e alimentícia; na preparação de tintas, na produção de xaropes de açúcar, bem como em setores da agroindústria e engenharia ambiental (ABD-ELHALEM et al., 2015; BOŽIĆ et al., 2011; EL ENSHASY, 2007).

Lipases

As lipases, ou éster hidrolases de triacilglicerol (EC 3.1.1.3), possuem a capacidade de catalisar a hidrólise de triacilglicerol em glicerol e ácidos graxos livres. As lipases catalisam a hidrólise, a transesterificação e a síntese de ésteres com especificidade enantiosseletivas (SALIHU; ALAM, 2015; TREICHEL et al., 2010). As lipases possuem elevada estabilidade em solventes orgânicos e, normalmente, não necessitam de cofatores para catálise, sendo utilizadas em diferentes reações hidrolíticas e sintéticas (AKOH et al., 2007; SALIHU; ALAM, 2015).

Os avanços na biotecnologia associados à clonagem, expressão e mutagênese, bem como as particularidades fisiológicas dos microrganismos, podem conferir às lipases aspectos importantes, como: amplitude de pH e termoestabilidade específicos. Dessa forma, as lipases produzidas por bactérias podem ser utilizadas em aplicações biotecnológicas distintas (GOSWAMI; BASU; DE, 2013; SALIHU; ALAM, 2015).

Um exemplo dessa versatilidade são as lipases alcalinas, produzidas pelas bactérias *Bacillus* sp. B207 e *Pseudomonas paucimobilis*, que podem ser utilizadas como aditivos na formulação de detergente, pois essas lipases apresentaram excelente estabilidade ao pH (entre 7,0 e 9,0) e à temperatura (30 a 50 °C) (KHOO; IBRAHIM, 2009; SALIHU; ALAM, 2012). As lipases do tipo carboxilesterase, de *B. subtilis* Thai I-8, são a principal escolha da indústria de química fina (QUAX; BROEKHUIZEN 1994).

Celulases

Celulases pertencem às enzimas carboidratos-ativo (CAZymes), que possuem módulos catalíticos e de ligação a hidratos de carbono (ou domínios funcionais), que degradam, modificam ou criam ligações glicosídicas (LÓPEZ-MONDÉJAR et al., 2016). Para a despolimerização completa da celulose, é necessária não só uma celulase, mas um sistema de celulases para a hidrólise dessa substância (BROWN; BROWN, 2013). As enzimas com atividade celulolítica, ou hidrolases glicosídicas (GHs), são classificadas de acordo com similaridades entre

seqüências de aminoácidos que compõem a estrutura proteica de cada enzima individual (LÓPEZ-MONDÉJAR et al., 2016).

A hidrólise completa de celulose, pelo sistema de enzima celulasas, produz glicose e o mínimo conjunto necessário são três tipos de celulasas, que, sinergicamente, conferem a hidrólise completa da celulose, sendo elas as endoglucanases (EC 3.2.1.4), exoglucanases (EC 3.2.1.91) e β -glucosidases (EC 3.2.1.21) (CHRISTY; GOPINATH; DIVYA, 2014; JUTURU; WU, 2014). A endoglucanase age sobre as regiões de baixa cristalinidade da fibra de celulose, nas regiões internas do polímero. A exoglucanase remove as unidades de celobiose da região livre nas extremidades de cadeia de celulose. Por fim, a β -glucosidase hidrolisa as unidades de celobiose em glicose (GUPTA; VERMA, 2015).

A hidrólise de celulose por enzimas bacterianas é uma estratégia econômica, uma vez que os avanços recentes permitem o desenvolvimento e seleção de microrganismos cada vez mais eficientes na produção de enzimas específicas (MORRELL-FALVEY; ELKINS; WANG, 2015). Há, atualmente, um interesse crescente na celulase bacteriana devido ao bom potencial de utilização e produção (FAWZYA et al., 2013). Recentes avanços têm sido obtidos pela seleção de bactérias cada vez mais eficientes na produção de enzimas específicas, assim com o desenvolvimento de estratégias de otimização de rendimento de celulasas pelo aumento da expressão através de manipulação genética (CASTRO; PEREIRA JÚNIOR, 2010; MORRELL-FALVEY; ELKINS; WANG, 2015).

Amplamente utilizada em várias aplicações industriais, a celulase tem despertado o interesse não só da indústria de bioetanol, mas também na indústria de celulose e papel, têxtil, detergente, alimentos e rações, cervejeira e agrícola (FAWZYA et al., 2013).

As espécies de *Bacillus subtilis* produzem uma celulase alcalina (EC 3.2.1.4), que apresenta excelentes propriedades para a produção de detergentes (JONES; QUAX, 1998). As celulasas produzidas por *Thermomonospora fusca* são de grande interesse para indústria têxtil e são aplicadas visando à obtenção do aspecto desgastado do jeans, pois agem sobre a fibra de celulose, tornando-a mais macia. Essa enzima chega a

movimentar mais de US\$ 40 milhões em vendas por ano (IRWIN et al., 1998; QUAX, 2013).

Considerações finais

as enzimas bacterianas têm significativa importância para a indústria, diante da variedade de processos industriais que podem ser beneficiados, tanto tecnológica como economicamente. As diversas características e particularidades presentes nas diferentes espécies de bactérias e nos variados tipos de biomoléculas que produzem trazem perspectivas promissoras na obtenção de novas enzimas bacterianas com aplicabilidade em processos industriais.

Essas perspectivas ampliam-se diante da megadiversidade do Brasil, considerado um país com grandes perspectivas de inovação e descoberta de novos produtos. A exploração da biodiversidade para a geração de bioprodutos, como as enzimas bacterianas, é uma estratégia essencial para o Brasil se tornar autossustentável nas tecnologias enzimáticas.

Referências

- ABD-ELHALEM, B. T.; EL-SAWY, M.; GAMAL, R. F.; ABOU-TALEB, K. A. Production of amylases from *Bacillus amyloliquefaciens* under submerged fermentation using some agro-industrial by-products. **Annals of Agricultural Science**, v. 60, n. 2, p. 193–202, 2015.
- ADRIO, J. L.; DEMAINE, A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. **Biomolecules**, v.4, p. 117–139, 2014.
- AKOH, C. C.; CHANG, S.; LEE, G.; SHAW, J. Enzymatic approach to biodiesel production. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 22, p. 8995–9005, 2007.
- BBC Research. **Global Markets for Enzymes in Industrial Applications**. Disponível em: <<http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-report-bio030j.html>>. Acesso em: 28, fev. 2017.
- BALDO C.; BAGGIO, L. M.; MORENO, T. G.; MAGRI, A.; MELO, M. R.; GASPARIN, F. G. M.; CELLIGOI, M. A. P. C. Estudo da produção de lipase por bactérias isoladas de efluente de abatedouro avícola. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 3, p. 347-350, 2013.

BINOD, P.; PALKHIWALA, P.; GAIKAIWARI, R.; NAMPOOTHIRI, K. M.; DUGGAL, A.; DEY, K.; PANDEY, A. Industrial Enzymes – Present status and future perspectives for India. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 72, p. 271-286, 2013.

BOŽIĆ, N.; RUIZ, J.; LÓPEZ-SANTÍN, J.; VUJČIĆ, Z. Production and properties of the highly efficient raw starch digesting α -amylase from a *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a. **Biochemical Engineering Journal**, v.53, n. 2, p. 203–209, 2011.

BROWN, T. R.; BROWN, R. C. A review of cellulosic biofuel commercial-scale projects in the United States. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 7, p. 235-245, 2013.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JÚNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CHOI, J.M.; HAN, S.S.; KIM, H. S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: current status and future aspect. **Biotechnol Adv**, v. 33, p. 1443-1454, 2015.

CHRISTY, P. M.; GOPINATH, L.R.; DIVYA, D. A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 34, p. 167-173, 2014.

DAHIYA, P.; RATHI, B. Characterization and application of alkaline γ -amylase from *Bacillus licheniformis* MTCC1483 as a detergent additive. **International Food Research Journal**, v. 22, n. 3, p. 1293-1297, 2015.

DAIHA, K.G.; BRÊDA, G. C.; LARENTIS, A. L.; FREIRE, D. M. G.; ALMEIDA, R. V. Enzyme technology in Brazil: trade balance and research community. **Brazilian Journal of Science and Technology**, v. 3, p. 17, 2016.

DEB, P.; TALUKDAR, S. A.; MOHSINA, K.; SARKER, P. K.; SAYEM, S. M. A. Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. **SpringerPlus**, v. 2, p. 154, 2013.

EL ENSHASY, H. A. Bioprocess Development for the Production of CC-amylase by *Bacillus amyloliquefadens* in Batch and Fed-Batch Cultures. **Research Journal of Microbiology**, v. 2, n. 7, p. 560-568, 2007.

FAWZYA, Y. N.; PUTRI, S.; NORIKO, N.; PATANTIS, G. Identification of sgs 1609 cellulolytic bacteria isolated from Sargassum spec. and characterization of the cellulase produced. **Squalen Bulletin of Marine & Fisheries Postharvest & Biotechnology**, v.8, n. 2, p. 57-68, 2013.

GRIEBELER, N. E.; BORTOLI, V.; ASTOLFI, A. L.; DARONCH, N. A.; SCHUMANN, A. C.; SALAZAR, L. N.; CANSIAN, R. L.; BACKES, G. T.;

ZENI, J. Seleção de fungos filamentosos produtores de amilases, proteases, celulasas e pectinases. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, n.13, p.15-24, 2015.

GOPALAN, N.; NAMPOOTHIRI, K. M. Biotechnological production of enzymes using agro-industrial wastes: economic considerations, commercialization potential, and future prospects. In: DHILLON, G. S.; KAUR, S. (Ed.). **Enzymes – Agro-industrial wastes as feedstock for enzyme production: apply and exploit the emerging and valuable use options of waste biomass**. London: Elsevier, 2016. p. 313-330.

GOSWAMI, D.; BASU, J. K.; DE, S. Lipase applications in oil hydrolysis with a case study on castor oil: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 33, p. 81-96, 2013.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 763-781, 2004.

GUPTA, A.; VERMA, J. P. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 550-567, 2015.

GURUNG, N. RAY, S.; BOSE, S.; RAI, V. A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. **BioMed Research International**, v. 2013, DOI: 10.1155/2013/329121, 2013.

IRWIN, D.; SHIN, D. H.; ZHANG, S.; BARR, B. K.; SAKON, J.; KARPLUS, P. A.; WILSON, D. B. Roles of the catalytic domain and two cellulose binding domains of *Thermomonospora fusca* E4 in cellulose hydrolysis. **Journal of Bacteriology**, v.180, p. 1709–1714, 1998.

JONES, B.; QUAX, W. Alzheimer tau test and detergent cellulose made by genetic engineering (No. 9 in a series of articles to promote a better understanding of the use of genetic engineering). **Journal of Biotechnology**, v. 66, p. 229-233, 1998.

JUTURU, V.; WU, J. C.; Microbial cellulases: engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 33, p. 188-203, 2014.

KARN, S. K.; KUMAR, A. Hydrolytic enzyme protease in sludge: recovery and its application. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 20, p. 652-661, 2015.

KHOO, M. L.; IBRAHIM, C. O. Lipase from thermoalkalophilic *Pseudomonas* species as an additive in potential laundry detergent formulations. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 1-5, 2009.

KOKA, R.; WEIMER, B. C. Investigation of the ability of a purified protease from *Pseudomonas fluorescens* R098 to hydrolyze bitter peptides from cheese. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 75-79, 2000a.

KOKA, R.; WEIMER, B. Isolation and characterization of a protease from *Pseudomonas fluorescens* RO98. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 280-288, 2000b.

LI, S.; YANG, X.; YANG, S.; ZHU, M.; WANG, X. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v.2, p. 1-11, 2012.

LÓPEZ-MONDÉJAR, R.; ZÜHLKE, D.; BECHER, D.; RIEDEL, K.; BALDRIAN, P. Cellulose and hemicellulose decomposition by forest soil bacteria proceeds by the action of structurally variable enzymatic systems. **Scientific Reports**, v.6, p.1-12, 2016.

MORRELL-FALVEY, J. L.; ELKINS, J. G.; WANG, Z. W. Determination of the cellulase activity distribution in *Clostridium thermocellum* and *Caldicellulosiruptor obsidiansis* cultures using a fluorescent substrate. **Journal of Environmental Sciences**, v. 34, p. 212-218, 2015.

NC-IUBMB – Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. **Enzyme Nomenclature: Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse**. 2017. Disponível em: < <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/> > Acesso em: 22, mar 2017.

NELSON, D. L.; COX, M. **Lehninger – Princípios de Bioquímica**. 6.ed. São Paulo: Artmed, 2014.

POLITZER, K.; BOM, E. P. S. **Enzimas Industriais e Especiais Volume 1 Visão Geral da Área de Enzimas, Conclusões e Recomendações**. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE) Ciência, Tecnologia e Inovação, 2006. Disponível em: < http://www.redetec.org.br/wp-content/uploads/2015/02/tr03_enzimas.pdf >. Acesso em: 29, mar 2017.

QUAX, W. J.; BROEKHUIZEN, C. P. Development of a new *Bacillus* carboxyl esterase for use in the resolution of chiral drugs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 4, p. 425-431, 1994.

QUAX, W. J. Bacterial Enzymes. In: ROSENBERG, E. et al. (Ed.). **The Prokaryotes: applied bacteriology and biotechnology**. 4th. ed. London: Springer, 2013. p. 193-211.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

RÖHM, O. D. **Verfahren zum Reinigen von Wäschestücken aller Art**. Patent DE 283923, dez. 1915.

ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications, **Essays in Biochemistry**, v. 59, p. 1-41, 2015.

SALIHU, A.; ALAM, Z. Production and applications of microbial lipases: A review. **Scientific Research and Essays**, v. 7, n. 30, p. 2667-2677, 2012.

SALIHU, A.; ALAM, Z. Solvent tolerant lipases: A review. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 86-96, 2015.

SILVA, L. P.; CARUSO, C. S. A metagenômica na busca de enzimas hidrolíticas bacterianas. **Revista Eletrônica Estácio Saúde**, v. 4, n. 2, p. 193-210, 2015.

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P. K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, p. 173-188, 2016.

SOUZA, P. M.; BITTENCOURT, M. L. A.; CAPRARA, C. C.; FREITAS, M.; ALMEIDA, R.P. C.; SILVEIRA, D.; FONSECA, Y. M.; FERREIRA-FILHO, E. X.; PESSOA-JUNIOR, A.; MAGALHÃES, P. O. Biotechnology perspective of fungal proteases, **Brazilian Journal of Microbiology**, v.46, n. 2, p. 337-346, 2015.

SOUZA, P. M.; MAGALHÃES, P.O. Application of microbial α -amylase in industry – a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 850-861, 2010.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Aividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban) **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 4, p. 382-385, 1998.

SUGANTHI, C.; MAGESWARI, A.; KARTHIKEYAN, S.; ANBALAGAN, M.; SIVAKUMAR, A.; GOTHANDAM, K.M. Screening and optimization of protease production from a halotolerant *Bacillus licheniformis* isolated from saltern sediments. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 11, p. 47-52, 2013.

SUNAR, K.; KUMAR, U.; DESHMUKH, S.K. **Recent Applications of Enzymes in Personal Care Products**. In: Enzymes – Agro-industrial wastes as feedstock for enzyme production: apply and exploit the emerging and valuable use options of waste biomass. DHILLON, G.S.; KAUR, S. Elsevier, 2016.

SUNDARRAM, A.; MURTHY, T. P. K. α -amylase production and applications: a review. **Journal of Applied & Environmental Microbiology**, v. 2, n. 4, p. 166-175, 2014.

TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. A review on microbial lipases production. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 2, p. 182-196, 2010.

VAN DER LAAN, J. C.; GERRITSE, G.; MULLENERS, L. J.; VAN DER HOEK, R. A.; QUAX, W. J. Cloning, characterization, and multiple chromosomal integration of a *Bacillus alkaline* protease gene. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 901-909, 1991.

ŻĄDŁO-DOBROWOLSKA, A.; SZCZYGIEŁ, M.; KOSZELEWSKI, D.; PAPROCKI, D.; OSTASZEWSKI, R. Self-immolative versatile fluorogenic probes for screening of hydrolytic enzyme activity†. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 14, p. 9146–9150, 2016.

ZANELLA, M.; BORGHI, G. L.; PIRONE, C.; THALMANN, M.; PAZMINO, D.; COSTA, A.; SANTELIA, D.; TROST, P.; SPARLA, F. β -amylase 1 (BAM1) degrades transitory starch to sustain proline biosynthesis during drought stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 6, p. 1819-1826, 2016.

Parte II

Saúde física e mental

Desafio interdisciplinar

9.

MEDICINA & CIÊNCIA DA DANÇA EM UMA PERSPECTIVA HISTÓRICA E INTERDISCIPLINAR

CIBELLE KAYENNE MARTINS R. FORMIGA
RAFAELA NOLETO DOS SANTOS
ADRIANO JABUR BITTAR

Em uma perspectiva de arte e de saúde, a dança entremeia os dois caminhos, ganhando um pouco mais de espaço a cada ano com o desenvolvimento de pesquisas que abordam assuntos diversos e tentam aproximar essa temática da visão de que, para além do artístico, a dança busca entrar no âmbito científico das pesquisas médicas.

Não se tratando apenas de corpos que se movem pelo espaço, ela aborda todo um sistema de músculos, tendões, ligamentos, ossos, articulações e órgãos em constante e alta demanda energética, o que leva a diversas situações que requerem estudos. É nesse sentido que o Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde (PPGCAPS) abre espaço para a interdisciplinaridade deste tema em mais uma de suas áreas de pesquisa.

O objetivo deste capítulo é fazer uma reflexão teórica sobre o campo de estudo da Medicina e Ciência da Dança (MCD) e as possibilidades desenhadas em nova Rede estabelecida entre o Brasil e o Reino Unido, no sentido de serem constituídos grupos e linhas de pesquisa para consolidar a produção do conhecimento e a criação de serviços nessa área. Através de um percurso histórico embasado por uma pesquisa

bibliográfica, pretende-se apresentar os diversos estudos que vêm sendo desenvolvidos no mundo, que mostram os potenciais da MCD, ao mesmo tempo em que apontam os desafios enfrentados por esse campo para a constituição da Rede no Brasil.

A emergência da medicina e ciência da dança e a rede Brasil-Reino Unido em MCD

A constituição do campo da MCD deu-se pela integração de áreas relacionadas aos estudos do movimento e da saúde, estimuladas pela constatação de que as demandas da prática da dança poderiam causar lesões, principalmente quando a própria dança era mal aplicada. As escolas de balé clássico foram as grandes responsáveis pelo início desse movimento, tendo como base toda uma pedagogia detalhada descrita para o ensino dessa dança (FIGUEIREDO; BITTAR; FERREIRA, 2017).

Historicamente, o primeiro marco nesse campo deu-se por volta de 1700, quando Bernardino Ramazzini relatou as primeiras lesões em práticas corporais, em seu livro *“Diseases of the Workers”*, na área da saúde ocupacional. Outro marco foi o surgimento do termo Medicina do Esporte, com as doenças dos atletas sendo mais largamente descritas, em 1928, nos II Jogos Olímpicos de Inverno, na Suíça. Nesse mesmo ano, aconteceu o primeiro congresso internacional da Medicina do Esporte, em Amsterdã (RYAN, 1997).

A primeira publicação que correlacionava algumas lesões com a prática da dança apareceu em meados dos anos de 1950, no *“Occupational Marks and Other Physical Signs”*. Nessa mesma época, começaram a aparecer os primeiros artigos sobre lesões na dança. Já o termo *Medicina da Dança* foi utilizado em 1979, no I Simpósio Internacional sobre os Aspectos Médicos e Ortopédicos da Dança, em Nova Iorque. Seguindo o desenvolvimento dessa área, deve ser citado que, em 1982, dois importantes simpósios médicos sobre a Dança foram realizados em Paris (RYAN, 1997).

A primeira escola a oferecer um curso na área da MCD, em 1985, localizava-se em Alicante, Espanha. Ela nasceu pela iniciativa do médico Dr. Juan Bosco Minguez e fortaleceu a área, promovendo,

ainda, a formação da Associação Espanhola de Medicina da Dança. Estimulados por essa iniciativa, em 1990, bailarinos, profissionais da MCD, professores e cientistas de dança dos Estados Unidos da América (EUA), Inglaterra e Bélgica formaram a *International Association for Dance Medicine & Science* – Associação Internacional para a Medicina & Ciência da Dança (IADMS), objetivando promover e desenvolver ações para melhorar a saúde, bem-estar, treinamento e desempenho de dançarinos, cultivando excelência educacional, médica e científica (FIGUEIREDO; BITTAR; FERREIRA, 2017).

Atualmente, a IADMS conta com mais de 900 sócios dançarinos e de outras profissões da área da saúde, provenientes de mais de 35 países. Ela organiza uma conferência anual e o “*Journal of Dance Medicine & Science*”, dentre outras ações. A IADMS conta ainda com várias organizações parceiras, que oferecem cursos técnicos, mestrados, doutorados e pós-doutorados, assim como serviços e produtos específicos voltados para a área da MCD. No Brasil, existem até hoje apenas 11 profissionais membros da IADMS, a saber: Adriano Bittar, Aline Haas, Bárbara Marques, Clara Fischer, Cláudia Daronch, Daisy Machado, Flora Pitta, Izabela Gavioli, Kaanda Gontijo, Márcia Leite e Mariana Bahlis (IADMS, 2016).

Como visto, poucos profissionais brasileiros fazem parte de uma das únicas associações voltadas para o estudo e difusão da MCD. De forma corajosa e desbravadora, eles têm tentado alavancar ações pertinentes que possam estimular a criação de serviços e pesquisas nesse campo. Sabe-se que a MCD em terras brasileiras inicialmente desenvolveu-se pelos esforços isolados de agentes da própria dança, que, estimulados por lesões pessoais, ou ao vivenciarem a realidade da saúde dos bailarinos em companhias e academias de dança constituídas, sensibilizaram-se e criaram serviços locais para dar conta dessa demanda.

Entretanto, um diálogo mais concreto nessa área tornou-se possível somente a partir da criação de alguns cursos de dança em universidades como a Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), que acabou por focar toda uma linha de pesquisa na MCD. Atualmente, outras instituições, como a Universidade de São Paulo (USP), a Universidade Esta-

dual de Campinas (UNICAMP), a Universidade Estadual de Goiás (UEG) e a Universidade Federal deste mesmo Estado (UFG) têm se esforçado para produzir pesquisas de alta qualidade nesse campo de estudo. Assim, a emergência da MCD como um campo integrado e autônomo no Brasil ainda está por acontecer.

Uma das iniciativas mais recentes para a expansão da MCD, acontecida no Brasil em 2016, foi a criação da Rede Brasil-Reino Unido em MCD. Ela é coordenada pelos Profs. Drs. Adriano Bittar, da UEG, e Matthew Wyon, da Universidade de Wolverhampton, líder na área da MCD no Reino Unido. O objetivo dessa Rede é desenvolver pesquisas e serviços colaborativos durante o período de 15 anos. Como parceiros, a Rede conta com o *National Institute of Dance Medicine & Science* (NIDMS), formado pela Universidade de Wolverhampton, do Birmingham Royal Ballet, One Dance UK, Trinity Laban Conservatoire of Music and Dance e Universidade de Birmingham, e, dentre os brasileiros, a UFG, Instituto Federal de Goiás (IFG), USP, UNICAMP, Universidade Salgado de Oliveria (UNIVERSO) e UFRGS, além de outros interessados na temática.

Essa Rede surgiu da realização de um projeto de extensão/*workshop*¹ que ocorreu no período de 27-31 de agosto de 2016, no Centro Cultural da Universidade Federal de Goiás (CCUFG), em Goiânia, Goiás. Esse evento foi inicialmente proposto e idealizado pelo Prof. Bittar, da UEG/Escola Superior de Educação Física e Fisioterapia de Goiás (ESEFFEGO), e pelo Prof. Wyon, da Universidade de Wolverhampton/*School of Performing Arts*. Esse encontro foi cofinanciado pelo *British Council*, através do *Newton Fund*, e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), e realizado pela UEG/ESEFFEGO/Pró-reitoria de Extensão (PRE), Universidade de Wolverhampton e NIDMS. Como parceiros, o *workshop* teve o Curso de Dança da Faculdade de Educação Física e Dança (FEFD)/UFG e o Curso de Dança do IFG/Campus Aparecida de Goiânia. Já como parceria institucional, o apoio foi do CCUFG/Pró-Reitoria de Extensão e Cultura (PROEC) da UFG.

1 Ver anais do evento publicado na Revista Movimenta (volume 9, número 4, 2016): <<http://www.revista.ueg.br/index.php/movimenta/issue/view/276>>

Os objetivos do *workshop* foram:

1 - introduzir o campo de estudo da MCD para pesquisadores de dança e de saúde no Brasil; 2 - descrever como o campo de estudo da MCD é crescente em todo o mundo, suas potencialidades e desafios; 3 - efetivar o intercâmbio de conhecimentos, experiências e ideias sobre a base de investigação da MCD e os serviços já existentes no Reino Unido e no Brasil; 4 - tornar consciente quem interessar-se, sobre as oportunidades de financiamento e de desenvolvimento de carreira e de como formar colaborações internacionais no campo de estudo da MCD; 5 - criar estratégias e um plano de ação relacionado ao desenvolvimento de uma colaboração internacional Brasil-Reino Unido, relativa à futura evolução do campo de estudo da MCD para o crescimento econômico e o bem-estar social de populações pobres. (BR-UKDMS NETWORK/REDE BR-UK EM MCD, 2017)

Inicialmente, um grupo de diferentes pesquisadores desse campo no Brasil e Reino Unido reuniu-se para pensar a dinâmica do *workshop* e o futuro da MCD, como o próprio Prof. Dr. Wyon, o Prof. Dr. Bittar, a Profa. Dra. Valéria Figueiredo, da UFG/ FEFD, a Profa. Dra. Luciana Ribeiro, do IFG/Curso de Dança, a Profa. Dra. Aline Haas, da UFRGS/ Faculdade de Educação Física, Fisioterapia e Dança (FEFID), a Profa. Dra. Márcia Strazzacappa, da UNICAMP/Faculdade de Educação, o Prof. Dr. Alexandre Ferreira, da UFG/FEFD, e as Profas. Dra. Andreja Picon e Isabel Sacco, da Faculdade de Medicina (FM)/USP. Esse coletivo de pesquisadores com diferentes experiências na área da MCD, e com a mesma vontade de desenvolver colaborações inovadoras, propôs os primeiros formatados para o evento e da Rede, e, assim, foram-se afinando colaborações frente ao enorme potencial disponível.

Além disso, outras ações concomitantes foram surgindo antes de o *workshop* da Rede no Brasil ser realizado, como a participação do Prof. Bittar no encontro de pesquisadores da MCD, acontecido na Universidade de Wolverhampton, depois do convite feito pelo Prof. Wyon. Desse encontro, ainda participaram as pesquisadoras Clara Fischer,

Profa. Aline e Bárbara Pessali Marques, que também apresentaram seus trabalhos de pesquisa por lá. Esse mesmo grupo de brasileiros ainda participou em Londres de um simpósio voltado ao desenvolvimento da carreira na MCD, acontecido no Trinity Laban, a convite de Clara Fisher, ex-aluna dessa instituição, e de Edel Quin, professora do Laban. Por último, vale registrar o primeiro minicurso específico de biomecânica aplicada à dança já realizado no Brasil, no I Congresso Centro-oeste de Biomecânica, em Goiânia, dado pela Prof. Dra. Andreja Picon, depois de convite feito pelos Profs. da UEG/ESEFFEGO Flavia Gervásio e Bittar.

Os membros da Rede do Reino Unido são: Matthew Wyon (coordenador), Liliana Araújo, Frances Clarke, Derrick Brown, Sarah Needham-Beck, Lucie Clements, Christine Bergeron, Ross Armstrong, Moira McCormack, Bárbara Pessali-Marques, Erin Sanchez, NefeliTsiouti e Janine Bryant. Esses pesquisadores dedicavam-se a diferentes campos da MCD, como: psicologia e excelência física, treinamento e melhora da *performance*, equilíbrio/neurologia, demandas cardiorrespiratórias, imagem e criatividade, Pilates, avaliação física, saúde óssea, *street dance*, dança contemporânea e balé, dentre outros. Já do Brasil, participam: Adriano Bittar (coordenador), Valéria Figueiredo (mentora), Luciana Ribeiro (mentora), Aline Haas, Isabel Sacco, Clara Fischer, Andreja Picon, Cláudia Daronch, Cibelle Formiga, Maria Eugênia Ghizellini, Debora Cantergi, Janete Hernandez, Tânia Hamu, IzabelaGavioli, Flora Pitta, Marcia Strazzacappa, Flavia Gervásio, Alexandre Ferreira, Julia Ziviani, Diego Pizarro, Fernanda Nora, Ana de Pellegrin, Mário Hebling Campos, Maria Cristina Bonetti, Rafaela Noleto dos Santos e Mônica Dantas. Eles estavam envolvidos com temáticas como: melhora de *performance* e diminuição de lesões, condicionamento físico, biomecânica, Pilates, terapias manuais, capacidade aeróbia, Parkinson, *ballet* e sapatilhas, neurociência, adolescentes, crianças, avaliações físicas, dança do ventre e qualidade de vida, processos criativos em dança contemporânea, educação somática, controle postural e marcha e flamenco.

A análise dos perfis dos diferentes pesquisadores que compõem efetivamente a Rede mostra que existe uma importante e reveladora

discrepância no amadurecimento da MCD nos dois territórios participantes. Isso já era esperado, pois a MCD enquanto área efetiva existe no Reino Unido há aproximadamente 25 anos e, no Brasil, ela ainda luta para tornar-se visível. Enquanto Brasil e Reino Unido têm participantes semelhantes no tocante às formações acadêmicas, incluindo doutores de campos como a fisioterapia, dança, psicologia, educação física e medicina, dentre outros, os britânicos representam mais instituições que os brasileiros. As instituições às quais eles pertencem são de mais variada natureza, como as que agenciam os bailarinos no Reino Unido, ou mesmo as que se devotam ao patrocínio de iniciativas que possam fazer a MCD crescer. Já os brasileiros são quase que em sua totalidade representantes de instituições de ensino superior.

Ainda mesmo que em crescimento, nota-se que a MCD tem colaborado de maneira única para que a saúde do dançarino seja mais levada a sério em todo o mundo. É preciso valorizar e entender a importância de tais ações e área, haja vista a prevalência majoritária das lesões em dançarinos. É passada a hora de termos a saúde do dançarino considerada como prioridade absoluta na dança.

Temas mais estudados no *Journal of Dance Medicine & Science*

O *Journal of Dance Medicine & Science* (JDMS) é uma revista trimestral, de revisão por pares, com um conselho editorial internacional e é a publicação oficial da IADMS. A revista é indexada no MEDLINE e é publicada por J. Michael Ryan Publishing, Inc. Cada edição centra-se em trazer os resultados atuais de investigações clínicas e experimentais. O objetivo do JDMS é fornecer uma fonte para informações atualizadas.

A cada ano, a revista fornece um tema de revisão orientada para uma área da MCD que tenha um impacto significativo sobre gestão, reabilitação, cuidados de longo prazo e formação de dançarinos. Esse é o maior veículo de disseminação das pesquisas realizadas na área de MCD, já tendo vinculado mais de 385 artigos, desde o ano de 1997, em 20 volumes, com quatro números cada um. Já foram abordados em torno de 35 temas, representados na Tabela 1.

Algumas pesquisas já vêm sendo publicadas em outros jornais da área esportiva e do movimento. No entanto, o JDMS é o local onde se encontra a maior concentração e diversidade de temas de interesse para o crescimento interdisciplinar da dança na medicina. Por esse motivo, um panorama feito sobre os temas mais estudados nesse jornal poderia representar o que mais vem sendo estudado no mundo sobre esse assunto.

Esse poderia ser um caminho para despertar novos pesquisadores que invistam nesses temas, não só para o conhecimento e crescimento teórico de tal, mas para que seja levado até as companhias e salas de dança, a fim de que também o bailarino seja influenciado e beneficiado por essas informações de forma a transformar sua qualidade de movimento e poder desfrutar dela por mais tempo e de forma mais saudável.

Novos temas ainda precisam ser abordados, mas diversos caminhos já têm sido desvendados de forma interdisciplinar.

Tabela 1 – Temas mais abordados no *Journal of Dance Medicine & Science* de 1997 a 2016

Principais temas abordados	Quantidade de artigos (n)
Lesões	94
Biomecânica	63
Tratamento de lesões	29
Treinamento	20
Capacidade aeróbica	19
Psicologia	18
Saúde geral	15
<i>Overtraining/overuse</i> e fadiga	14
Desordens alimentares, nutrição	13
Avaliação	10
Desenvolvimento da criança e adolescente que dança	9
Epidemiologia	9

Principais temas abordados	Quantidade de artigos (n)
<i>Performance</i>	9
Maturação e sexual e desordens hormonais	8
Densidade mineral óssea	8
<i>Turnout</i>	8
Composição corporal	7
Imagem corporal	7
Pilates	6
Considerações para professores de dança	6
Sapatilhas de ponta	5
Controle motor	5
Novas tecnologias e inovações	4
Tabagismo	3
Propriocepção	3
Desenvolvimento de programas de condicionamento	3
Poética	2
Qualidade de vida	2
Flexibilidade	2
Comunicação entre equipe médica e bailarinos	2
História	2
Gravidez	1
Percepção da dor e da lesão	1
Vitamina D	1

Fonte: Próprios autores (2016).

O maior número de pesquisas publicadas no JDMS discute sobre lesões na população de bailarinos, seja em estudos epidemiológicos, estudos de casos de condições mais raras ou revisões bibliográficas daquelas que são mais comuns e recorrentes. Em um total de 94 artigos publicados até o ano de 2016, esse é um tema que requer atenção e

cuidado, pois revela o que mais aflige aqueles que se dedicam à dança profissional ou até mesmo de forma amadora.

É altamente relevante o número de lesões que acontece com essa população, o que pode ser notado também pelos próximos temas mais estudados pelos pesquisadores: biomecânica (n=63 artigos) e tratamento de lesões (n=29 artigos). Esses estudos vêm se destacando devido à crescente demanda da necessidade de entendimento de por que as lesões acontecem e o que pode ser feito para tratá-las de forma eficiente ou até mesmo preveni-las.

Ainda nesse raciocínio, outros programas de treinamento vêm sendo desenvolvidos para capacitar e condicionar melhor os bailarinos, para que sejam aptos a desempenhar suas tarefas com a técnica e o controle motor necessários, o que é visto pelo quarto tema mais estudado com 20 artigos publicados.

A dança em geral, assim como o balé, é uma atividade que requer alta habilidade, na qual grandes demandas são colocadas sobre o corpo do dançarino em termos de articulação, amplitude de movimento, coordenação e equilíbrio. Os corpos estão expostos a movimentos prolongados, complexos e de alta demanda cognitiva para realizar tarefas como saltar, girar e movimentar-se de forma rápida e explosiva, fazendo tudo com fluidez, leveza e tantas outras qualidades. Espera-se que os dançarinos sejam expressivos através dos seus corpos e, acima de tudo, comuniquem-se com uma plateia. Na preparação para a *performance*, eles precisam ser capazes de recordar séries de movimentos complicados e coordenados. É, então, esperado que uma parte significativa dos ensaios seja designada para o treino da técnica, porém, o foco específico deveria ser no desenvolvimento fisiológico geral e não na aquisição de habilidades (REDDING, 2013).

A capacidade aeróbica, quinto tema mais estudado, com 19 artigos já publicados, representa uma grande área de pesquisa que visa a novos testes e formas de treino de VO_2 máx e capacidade cardiorrespiratória em geral para caracterizar melhor a população de bailarinos que apresenta uma demanda específica, que difere da prática de outros esportes.

Ainda digno de nota, como sexto tema mais estudado com 18 artigos publicados, o aspecto psicológico é extremamente importante no que diz respeito a transtornos, ansiedade, distúrbios de imagem, alto grau de competição, sentimentos de fracasso, entre outros, que estão constantemente envolvidos nas práticas diárias dos bailarinos.

Fica claro, então, que existem muitas lesões na dança hoje, principalmente no balé, e que muitas delas poderiam ser prevenidas. Igualmente, está claro que os dançarinos não estão bem preparados, física e psicologicamente, como deveriam estar, para as demandas do caminho que escolheram. Todos que se preocupam com a dança podem e devem ajudar nisso. Os dançarinos precisam aprender a ter responsabilidade por eles mesmos, ainda que o treinamento que eles tiveram não tenha encorajado isso. As companhias têm o dever de cuidar dos seus participantes, que precisam ser considerados cuidadosamente sob a luz desses achados. Professores e escolas precisam encarar esse gratificante desafio (BRINSON; DICK, 1996).

Todos os temas já estudados pelo JDMS e aqui apresentados são extremamente atuais e relevantes no que diz respeito aos bailarinos, o que tem trazido mais clareza sobre como tratar essa população.

A dança como campo de atuação interdisciplinar

A área de Medicina e Ciência da Dança constitui-se um campo de atuação interdisciplinar, em que profissionais de diferentes áreas podem envolver-se e contribuir para o conhecimento teórico e prático (FIGUEIREDO; BITTAR; FERREIRA, 2017).

Apesar de grande parte dos pesquisadores que se dedicam a estudar e pesquisar sobre a área sejam pessoas com experiência pregressa na dança em alguma época da vida, a área também abre portas para pesquisadores que desejam vislumbrar novas oportunidades de pesquisa. São bem-vindas as contribuições de profissionais da educação, saúde, artes e ciências exatas (FIGUEIREDO; BITTAR; FERREIRA, 2017).

No contexto acadêmico, o Brasil possui 34 universidades que oferecem cursos de graduação em dança, mas apenas uma oferece pós-

graduação específica em Dança e outras com proximidade à área, e nenhuma abrange a MCD. Em Goiânia, e em outras cidades do Brasil, a dança é um importante campo no desenvolvimento econômico e bem-estar social de uma parte considerável da população. Goiânia é a cidade sede de uma das mais renomadas companhias de dança contemporânea no Brasil. Além disso, dois cursos de graduação em dança e uma escola de dança profissional do estado também estão disponíveis. Todos esses cursos são oferecidos gratuitamente e concentram-se em atender as populações carentes, que podem frequentá-los, ou mesmo participar dos projetos de extensão/pesquisa ofertados (FIGUEIREDO; BITTAR; FERREIRA, 2017).

Apesar desse cenário, percebe-se a necessidade de novos cursos voltados para a área da Dança e também investimento em ensino e pesquisa em níveis de especialização e mestrado, com foco na atuação na área de MCD. Nesse sentido, o Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde (PPGCAPS) da UEG pode ser um importante passo para a formação de recursos humanos inseridos nessa linha de pesquisa. Há necessidade de formação de mais profissionais em nível de mestrado e doutorado para o crescimento acadêmico da área de MCD.

Considerações finais

Este capítulo apresentou uma síntese sobre a área de Medicina e Ciência da Dança e uma perspectiva histórica da formação da Rede BR-UK. A expectativa do grupo envolvido é de que, nos próximos 15 anos, sejam feitas colaborações inovadoras para o desenvolvimento de serviços, pesquisas e oportunidades educacionais, tanto para os profissionais e pesquisadores envolvidos, quanto para o público-alvo que atua diretamente com a dança. Há muito ainda a se aprender dentro da área e diversas pesquisas podem ser executadas em diferentes temáticas.

Agradecimentos

Ao British Council, através do Newton Fund, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), que, através de cofinanciamento, possibilitaram a criação da Rede BR-UK em MCD.

Referências

BR-UK DMS NETWORK/REDE BR-UK EM MCD. **Welcome to the BR-UK DMS Network**. Retirado de <www.bruktdms.blogspot.com.br>. Acesso em 20 de janeiro de 2017.

BUARQUE, C. **A aventura da universidade**. São Paulo: Ed. UNESP; Rio de Janeiro: Paz e Terra, 1994.

BRINSON, P. DICK, F. **Fit to Dance: The Report of National Inquiry into UK Dancers' Health and Injury**. London: Dance UK. 1996.

CARVALHO, Y. Atividade física e saúde: onde está e quem é o “sujeito” da relação. **Revista Brasileira de Ciências do Esporte**, v. 22, n. 2, p.9-21, 2001.

FIGUEIREDO, V.M.C.; BITTAR, A.J.; FERREIRA, A. A criação da Rede Brasil-Reino Unido em Medicina & Ciência da Dança como um lugar potencial de relações entre pesquisas poético-criacionais. **Ouvirouver**, v. 13 n. 1 p. 78-90, 2017.

FIGUEIREDO V.; MAIA, U.; STRAZZACAPPA, M. **Processos de criação em Teatro e Dança: construindo uma rede de saberes e múltiplos olhares**. 1. ed. Goiânia: FUNAPE: UFG, 2013. v. 1

GAM, C. **Integrando Dança e Saúde no Brasil, Parte I: primeiros passos de um campo em ascensão**. Disponível em <www.iadms.org/blogspot/1177934/237549/Bridging-Dance-and-Health-in-Brazil-Part-I-The-early-steps-of-an-emergingfield?hSearchTerms=%22brazil%22&terms=>, blog IADMS. Acesso em 10 de maio de 2016.

IADMS. **Sobre**. Disponível em <www.iadms.org/?page=A8>. Acesso em agosto de 2016.

IBGE/Ministério da Cultura. **Suplemento de Cultura da Pesquisa de Informações Básicas Municipais – MUNIC 2006**. Disponível em www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/perfilmunic/cultura2006/default.shtm. Acesso em maio de 2016.

MINAYO, M. **Desafio do conhecimento: pesquisa qualitativa em saúde**. São Paulo/ Rio de Janeiro: Hucitec/Abrasco, 1992.

REDDING, E. Dancers: Fit bodies? In: International Symposium on Performance Science, 2013, Vienna, Áustria. p. 5-10.

RYAN, A. Early History of Dance Medicine. **Journal of Dance Medicine and Science**. v. 1, n. 1, p. 30-34. 1997.

10.

PREVENÇÃO EM SAÚDE E PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DA CRIANÇA

MARTINA ESTEVAM BROM VIEIRA
TÂNIA CRISTINA DIAS DA SILVA HAMU
CIBELLE KAYENNE MARTINS ROBERTO FORMIGA

O crescimento e desenvolvimento infantil tem sido alvo de muitas pesquisas por diversos profissionais da área da saúde. É consenso que o investimento em prevenção em saúde na infância tem um impacto positivo na formação de adultos mais saudáveis e produtivos, tanto do ponto de vista físico, intelectual, quanto do ponto de vista econômico de uma sociedade organizada (FORMIGA, 2015).

Durante muitos anos, o estudo da prevenção e promoção de saúde na infância tem fascinado os pesquisadores pela complexidade do tema e pela diversidade de pesquisas científicas que podem emergir. Essas pesquisas podem levar a aplicações práticas preciosas na atenção à saúde da gestante e da criança em desenvolvimento e também suscitar a adoção de políticas públicas que envolvam a grande população (FORMIGA; PEDRAZZANI; TUDELLA, 2010).

Nesse sentido, o objetivo deste capítulo é fazer uma abordagem geral de diferentes possibilidades de temas que podem ser pesquisados em um programa de pós-graduação sobre a temática da prevenção em saúde e promoção do crescimento e desenvolvimento da criança. Aliamos, aqui, o conhecimento teórico com a nossa experiência prática de anos em contato com bebês, crianças e suas famílias.

Aspectos conceituais sobre crescimento e desenvolvimento na infância

O senso comum frequentemente trata o desenvolvimento e o crescimento como sinônimos, porém, tais indicadores apresentam conceitos distintos. Apesar disso, possuem algumas características em comum, a saber: são interdependentes, iniciam-se desde o momento da concepção, resultam em efeitos longitudinais, ou seja, caracterizam-se por mudanças ao longo do tempo, podem ocorrer durante toda a vida do indivíduo e são influenciados por processos biológicos (intrínsecos) e ambientais (extrínsecos) (GALLAHUE; OZMUN; GOODWAY, 2013; PAPA-LIA; FELDMAN, 2013).

O crescimento é conceituado pela biologia como a alteração do tamanho, forma e funções das células do organismo. No âmbito das ciências da saúde, sua definição relaciona-se ao desenvolvimento físico representado pelo aumento da massa corporal, sendo essa a expressão macroscópica da hiperplasia (aumento do número) e hipertrofia (aumento do tamanho e do volume) das células (GALLAHUE; OZMUN; GOODWAY, 2013). O acompanhamento do crescimento na infância é realizado basicamente pela avaliação de medidas antropométricas de peso e estatura/comprimento, combinando-as com as variáveis sexo e idade. Destaca-se que, nos primeiros meses após o nascimento, medidas dos perímetros cefálico e torácico também devem ser analisadas (BRASIL, 2002).

O exame clínico utilizado para avaliar o crescimento do feto durante a gestação inclui as medidas da altura do fundo de útero para idade gestacional e o ganho de peso materno para a idade gestacional. A associação dessas medidas é preditora do retardo do crescimento intrauterino (BRASIL, 2002; MARTINELLI; BITTAR; ZUGAIB, 2004). A avaliação do crescimento durante a infância considera os seguintes indicadores: peso por idade, estatura por idade, peso por estatura e IMC (índice de massa corporal) por idade (BRASIL, 2011). Para tanto, o Ministério da Saúde brasileiro adota as curvas da Organização Mundial de Saúde (OMS) como referência para avaliação do cresci-

mento e estado nutricional da população (BRASIL, 2011; DE ONIS et al., 2012; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006).

Desenvolvimento refere-se ao processo contínuo e longitudinal de progressão de habilidades e comportamentos necessários à adaptação psicossocial do indivíduo em seu contexto ambiental e social (GALLAHUE; OZMUN; GOODWAY, 2013). As crianças vão adquirindo habilidades funcionais a partir das alterações e compensações adaptativas ou, até mesmo, como decorrência da perda de um padrão ou comportamento. Durante o primeiro ano pós-natal, a criança vai perdendo os reflexos primitivos que, consequentemente, o que permite a aquisição de habilidades cada vez mais funcionais.

Desenvolvimento é, por conseguinte, um conceito amplo, constituído pelos seguintes principais domínios: (a) desenvolvimento físico, composto pelo crescimento corporal, sistema sensorial, saúde e desempenho motor (amplo e fino); (b) desenvolvimento cognitivo que engloba as funções psíquicas incluindo a capacidade de aprendizado, memória, atenção e linguagem; (c) desenvolvimento psicossocial, constituído pelas emoções, personalidade e relacionamento social. Muitas pesquisas abordam esses domínios de forma separada. Contudo, deve-se considerar que um domínio sempre interfere no outro, pois estão inter-relacionados (PAPALIA; FELDMAN, 2013).

A avaliação do desenvolvimento pode ser realizada por meio de entrevista com os responsáveis ou cuidadores e por meio de observação direta das habilidades e capacidades da criança, considerando a sua faixa etária. Para tanto, o examinador deve possuir conhecimento aprofundando do desenvolvimento normal e sua sequência. Além disso, estão disponíveis diversos instrumentos de avaliação do desenvolvimento e seus domínios. Ainda há escassez de instrumentos padronizados para a avaliação de crianças brasileiras, sendo necessária a utilização de testes e escalas internacionais com dados normativos baseados em crianças de outros países (VIEIRA; RIBEIRO; FORMIGA, 2009).

O intercâmbio de efeitos entre o crescimento e o desenvolvimento é evidentemente notado nas crianças, uma vez que problemas de saúde que afetem o índice de crescimento infantil acabam por comprometer

seu desenvolvimento. Essa situação pode ser constatada em estudos com bebês que nasceram prematuramente (menos de 37 semanas completas de idade gestacional) e com baixo peso (menos do que 2.500 gramas), considerados recém-nascidos de risco para diversos problemas no desenvolvimento infantil, tais como disfunções neurológicas, comprometimentos cognitivos, atraso no desenvolvimento psicomotor e problemas de comportamento e de aprendizado, verificados desde o primeiro ano de idade até a fase adulta (BURNETT; VIEIRA; LINHARES, 2011; HACK et al., 2004; SCRATCH; ANDERSON, 2013).

Ressalta-se que existem múltiplos fatores relacionados ao atraso e/ou desvio do desenvolvimento, e em casos da presença de fatores de risco como a prematuridade ou baixo peso ao nascimento, por exemplo, podem coexistir outras situações (fatores de proteção) capazes de amenizar os efeitos negativos das condições de risco. Dessa forma, os pequenos desvios no crescimento podem ser compensados e as crianças podem retomar os padrões adequados de crescimento e desenvolvimento. Por outro lado, o persistente retardo no crescimento e privação de estímulos ao desenvolvimento infantil durante os dois primeiros anos de idade podem comprometer permanentemente o futuro do indivíduo (GALLAHUE; OZMUN; GOODWAY, 2013).

Níveis de prevenção em saúde

A prevenção de agravos na saúde de crianças baseia-se na vigilância sistematizada do processo de crescimento e desenvolvimento infantil idealmente realizado desde o nascimento e priorizando a identificação de grupos de risco, ou seja, daquelas crianças mais vulneráveis biológica ou socialmente que, portanto, são mais suscetíveis a apresentar atrasos ou desvios em seu desenvolvimento (FORMIGA; PEDRAZZANI; TUDELLA, 2010). Essa vigilância do crescimento e desenvolvimento infantil é realizada em programas de acompanhamento (originado do inglês, '*follow-up*'), nos quais as crianças e suas famílias são acompanhadas por uma equipe interdisciplinar, que visa aos diversos aspectos da saúde da criança, desde as condições físicas até os problemas cognitivos e comportamentais específicos (VIEIRA;

RIBEIRO; FORMIGA, 2009). A atuação dos programas de *follow-up* compreende todos os 3 níveis de prevenção em saúde descritos a seguir (PEREZ-RAMOS, 1990):

- 1) Prevenção primária – são medidas realizadas antes que os problemas ou doenças ocorram (pré-patogênese), incluindo estratégias de promoção da saúde, com a finalidade de melhorar a saúde ou manter saudáveis as crianças com desenvolvimento normal. Exemplo: mudança/manutenção de hábitos de vida, vacinação, suplementação de vitaminas durante a gestação, acompanhamento pré-natal da gestante, estimulação do aleitamento materno, orientação aos pais sobre como estimular seus filhos em casa, orientações nutricionais.
- 2) Prevenção secundária – inclui ações que visam à detecção e ao tratamento precoce das crianças mais suscetíveis a apresentar algum problema. Baseia-se na identificação e eliminação de fatores de risco. Exemplo: rastreamento (*screening*) de crianças com maior risco para problemas no desenvolvimento, encaminhamento para avaliação específica e estimulação essencial.
- 3) Prevenção terciária – estabelece ações com objetivo de reduzir o impacto negativo do atraso no desenvolvimento já diagnosticado (crianças portadoras de deficiências em diferentes áreas do desenvolvimento), tratando e reabilitando o indivíduo e diminuindo fatores de risco. Exemplo: ampla gama de terapias disponíveis para cada transtorno específico (Fisioterapia neurológica infantil, Fonoaudiologia, Nutrição, etc).

Fatores que influenciam o crescimento e desenvolvimento da criança

O Quadro 1 sintetiza os principais fatores que podem influenciar o crescimento e desenvolvimento da criança em diferentes momentos de sua formação: durante a gestação (fatores pré-natais), durante o trabalho de parto (fatores perinatais) e após o parto (fatores pós-natais. Em seguida, serão comentados alguns desses fatores e apresentadas as recomendações para a prevenção e promoção da saúde do binômio mãe-filho.

Quadro 1 – Principais fatores de risco para o crescimento e desenvolvimento saudável da criança

Período	Fatores de Risco
Pré-natal	Infecções maternas Ganho de peso materno > 12 kg Pré-natal com < 8 consultas Alimentação deficiente Diabetes gestacional Doença hipertensiva da gestação Consumo de álcool, fumo e/ou drogas
Perinatal	Parto demorado Prematuridade (< 37 semanas de IG) Asfixia perinatal Baixo peso do bebê (< 2.500g) Pré-eclâmpsia
Pós-natal	Enfermidade Crônicas Nutrição deficiente Ausência do aleitamento materno Situação de pobreza Violência doméstica e urbana Acidentes na infância

Fonte: Adaptado de Brasil (2016) e World Health Organization (2012).

Fatores pré-natais

O período pré-natal possui como objetivo primordial acompanhar a mulher desde o início da gestação até o nascimento do bebê (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). A assistência pré-natal pode ser considerada como um dos principais indicadores do prognóstico da criança ao nascimento. As ações do pré-natal envolvem todos os níveis de atenção, sendo que a atenção básica está dirigida

para aspectos preventivos, promoção da saúde e diagnóstico precoce e tratamento de qualquer agravo que ocorra durante o período gestacional (BRASIL, 2006, 2012).

A recomendação usual para número de consultas no pré-natal era de que fossem realizadas um mínimo de seis consultas (BRASIL, 2006). No entanto, a partir do ano de 2016, a recomendação da Organização Mundial de saúde para o número mínimo de consultas do pré-natal subiu para oito. A recomendação é que as consultas ocorram da seguinte forma: uma no primeiro trimestre (8 a 12 semanas), duas no segundo trimestre (20 a 26 semanas) e cinco no terceiro trimestre (30, 34, 36, 38, 40 semanas), sendo que as três últimas consultas serão realizadas a cada 15 dias e um retorno deverá acontecer na 41ª semana, caso o nascimento ainda não tenha ocorrido (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

O grau de desenvolvimento econômico e cultural e a qualidade da saúde populacional de um país pode ser avaliado indiretamente pelos índices de mortalidade materna. A qualidade da assistência pré-natal garante o bom prognóstico materno e envolve procedimentos e recomendações relacionados ao adequado suporte nutricional, detecção de possíveis transtornos genéticos e teratogênicos e identificação precoce de situações de emergência obstétrica (CALDERON; CECATTI; VEGA, 2006).

O suporte nutricional está relacionado à adequada ingestão de nutrientes e de alimentos que suprem as necessidades do organismo e que refletem as práticas culturais e sociais de uma população (BRASIL, 2014). Melhores condições de saúde para gestante e crescimento e desenvolvimento fetal estão relacionados a um adequado consumo de proteínas, frutas, vegetais cru e cozidos, pois garantem a composição adequada de carboidratos simples e micronutrientes, como minerais e vitaminas (BRASIL, 2014; TEIXEIRA; CABRAL, 2016).

Relacionado ao suporte nutricional, é importante salientar a suplementação diária de Ferro e ácido fólico durante a gestação com o intuito de minimizar o risco de baixo peso ao nascimento, anemia materna e déficit de ferro. A recomendação da Organização Mundial de saúde

para suplementação diária de ferro é de 30-60 mg, e a de ácido fólico é de 0,4 mg, sendo instituída o quanto antes, devendo perdurar durante toda a gestação. O uso de ácido fólico foi associado a uma diminuição de possíveis defeitos do tubo neural (sendo necessária a suplementação no mínimo três meses antes da gestação e até a 12ª semana), melhor desenvolvimento motor-grosso em crianças, melhora das habilidades neurocomportamentais e emocionais, incluindo minimização do risco de distúrbios do espectro autista e outros transtornos do desenvolvimento. No entanto, possíveis riscos do excesso de ácido fólico já são descritos na literatura, sendo que riscos de atraso no desenvolvimento motor no primeiro ano de vida foram identificados em crianças cujas mães fizeram uso de doses diárias superiores a 5 gramas de ácido fólico durante a gestação (GAO et al., 2016; OMS, 2013; VALERA-GRAN et al., 2014; WEHBY; MURRAY, 2008).

A deficiência de vitamina D é outro aspecto importante do suporte nutricional da gestante e existem indicativos de que essa deficiência possa estar relacionada com a presença de pré-eclâmpsia, diabetes gestacional e com o comprometimento da linguagem da criança (URRUTIA-PEREIRA; SOLÉ, 2015; WHITEHOUSE et al., 2012).

O controle do peso evitando quadros de sobrepeso e obesidade também merece atenção no suporte nutricional da gestante. A relação entre o excesso de peso e riscos para a gestante e para o desenvolvimento do feto são condições metabólicas adversas associadas à gestação, como quadros hipertensivos, diabetes mellitus, parto prematuro e partos cirúrgicos (GARMENDIA et al., 2015; GONÇALVES et al., 2012; MATTAR et al., 2009; TEIXEIRA; CABRAL, 2016).

Na gestação de alto risco, existe uma correlação significativa entre o risco e o atraso no desenvolvimento de crianças. Gestações de alto risco são consideradas aquelas em que ocorre uma ou mais das situações a seguir: desnutrição materna, idade maternal, curto intervalo entre as gestações, mais de cinco gestações, pré-eclâmpsia, restrição do crescimento intrauterino, doenças de base da mãe e dependência de drogas (TORABI et al., 2012).

Dentre as condições metabólicas adversas, o diabetes mellitus pré-gestacional e gestacional exigem maior atenção, pois estão relacionados a um aumento da taxa de complicações maternas (pré-eclâmpsia, parto prematuro) e de malformações fetais, como defeitos cardiovasculares e neurais. Em relação ao desenvolvimento da criança, pode-se destacar um atraso no desenvolvimento cognitivo, risco de déficit na motricidade grossa e fina, Transtorno de Déficit de Atenção com Hiperatividade (TDAH), dificuldades de aprendizagem e, possivelmente, Transtorno do Espectro de Autismo (ORNOY et al., 2015; TORABI et al., 2012).

Relacionada ou não a diabetes gestacional, quadros de eclâmpsia e pré-eclâmpsia caracterizam uma gestação de risco, com repercussões para a mãe e a criança. As complicações hipertensivas na gestação são relevantes e são definidas como aumento da pressão arterial (PA), podendo ser de leve a grave, envolvendo vários órgãos. A presença de eclâmpsia aumenta a mortalidade materna e acarreta riscos ao desenvolvimento da criança, como prematuridade, morbidade neonatal, atraso no desenvolvimento da motricidade grossa e fina, déficits visuais e relação com o Transtorno do Espectro Autista (BEZERRA et al., 2005; CHENG et al., 2004; SZYMONOWICZ; YU, 1987; WALKER et al., 2015).

A influência da saúde materna e dos aspectos do desenvolvimento no período pré-natal no desenvolvimento de crianças pode ser observada em estudos que avaliaram o bem-estar das mães e o desenvolvimento de crianças em início da fase escolar (4 a 7 anos). Fatores como a idade materna (25-30 anos), educação materna (no mínimo o ensino médio), maior renda familiar, não beber durante a gestação foram associadas com maior pontuação no desenvolvimento. Enquanto isso, fatores como menor condição socioeconômica, agressão sofrida pela mãe e abuso de álcool e nicotina durante o período gestacional podem acarretar comprometimento no desenvolvimento dessas crianças (HILL et al., 2000; LIU et al., 2015; TOUGH et al., 2010).

A exposição pré-natal ao álcool, aliada ao risco familiar para dependência alcoólica, pode acarretar alterações na morfologia cerebral

dos conceptos, perdurando até a fase adulta, com repercussões inclusive cognitivas e comportamentais (SHARMA; HILL, 2017).

Durante o desenvolvimento fetal, existe uma previsão de eventos genéticos esperados. No entanto, em algumas situações, pode ocorrer alguma alteração nessa sequência de desenvolvimento, seja por influência externa, ou até mesmo fatores desconhecidos. Em geral, essas falhas sequenciais são divididas em duas categorias, denominadas problemas genéticos/cromossômicos e eventos teratogênicos, que podem ser induzidos por alguma substância ou acontecimento.

Os problemas genéticos são divididos em autossômicos dominantes (doença de Huntington, hipertensão arterial, polidactilia, esquizofrenia, cefaleias do tipo enxaqueca), autossômicos recessivos (anemia falciforme, fibrose cística, fenilcetonúria, albinismo) e transtornos recessivos ligados ao sexo (hemofilia, daltonismo, alguns quadros de distrofia muscular, síndrome do X-frágil). As consequências dessas alterações podem variar de situações mais leves e adaptacionais, como o daltonismo, até complicações severas, como a possibilidade de retardo mental na síndrome do X-frágil (BEE; BOYD, 2011).

Entre os eventos cromossômicos, estão classificadas as anomalias do cromossomo sexual (Síndromes de Turner e Klinefelter), que acarretam discreta alteração da linguagem, no entanto, sem retardo mental, e as Trissomias. Nas trissomias autossômicas completas, apenas as dos cromossomos 21 (síndrome de Down), 18 (síndrome de Edwards) e 13 (síndrome de Patau) são compatíveis com a sobrevivência pós-natal. A motricidade de crianças com trissomia 21 deve ser caracterizada como atípica e não definitivamente como atraso no desenvolvimento. A mortalidade das demais é alta após nascimento (ALTUG-TEBER et al., 2007; BEE; BOYD, 2011; JOVER et al., 2010; MEYER et al., 2015).

As alterações oriundas de teratogenia compreendem diversas causas, a maioria relacionada com a manifestação de doenças no período pré-natal. Nos eventos teratogênicos, observa-se a interposição de fatores ambientais no desenvolvimento do embrião/feto. Doenças como rubéola, toxoplasmose, citomegalovírus, Síndrome da Imunodeficiência adquirida (SIDA/AIDS), e outras doenças sexualmente transmissíveis

(DST), como a sífilis, e, mais recentemente, o zika vírus, podem interferir e até mesmo comprometer o desenvolvimento da criança (BEE; BOYD, 2011).

Fatores perinatais

É inquestionável que um bom acompanhamento pré-natal aumenta as chances de um desfecho positivo no momento do nascimento da criança. Contudo, a gestante não está livre de complicações que podem ocorrer na hora do parto e, a esses eventos dá-se o nome de complicações perinatais.

Independentemente do tipo de parto, normal ou cesariana, as complicações perinatais podem ocorrer. De maneira ideal, a realização de uma cesariana deveria ser o método escolhido quando a saúde do bebê ou da mãe estão em risco durante o parto. Contudo, no Brasil, ainda se observam elevados índices de cesarianas por primeira opção da gestante e da equipe médica que a acompanha.

Pesquisa realizada com 100 gestantes, sendo 56 nulíparas e 44 primíparas, verificou que a maioria das participantes relataram preferir o parto normal e não houve diferença das respostas entre as nulíparas e primíparas. Os pesquisadores concluíram que a vivência anterior do parto não exerce influência na expectativa do processo de parturição nem na escolha por determinada vida de parto (BENUTE et al., 2013).

As recomendações do Ministério da Saúde são que a parturiente seja bem acompanhada como durante o trabalho de parto e seja avaliada e orientada para os procedimentos para a condução de um parto normal com garantia de saúde mãe-filho. Para tanto, toda a equipe de saúde deve estar preparada para receber a parturiente e conduzir o trabalho de parto de maneira mais tranquila, com menos estresse para a mulher e os familiares que a acompanham (BRASIL, 2016).

A prematuridade tem sido considerada um dos principais problemas de saúde no período perinatal e pós-natal e, geralmente, é antecedida por um agravamento de uma complicação pré-natal, tais como ruptura prematura de membranas, anomalias uterinas, pré-eclâmpsia,

má nutrição materna, infecções ou outras causas desconhecidas. (BRANDÃO et al., 2015). O nascimento prematuro é aquele em que o bebê nasce com < 37 semanas de idade gestacional – IG) e, frequentemente, encontra-se associado ao baixo peso ao nascer quando o recém-nascido possui menos de 2.500g (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

O nascimento prematuro representa grande impacto tanto para a vida do bebê e de sua família quanto para a sociedade. Para o bebê, a prematuridade é uma condição adversa que se configura em um importante fator de risco para a saúde e a trajetória de desenvolvimento da criança e, portanto, fonte de estresse e sobrecarga para as famílias (LINHARES et al., 2004; RESEGUE; PUCCINI; SILVA, 2007). No âmbito da sociedade, a prematuridade representa grande desafio para as medidas de assistência à saúde, considerando seus altos índices de morbimortalidade e o ônus econômico, devido a sua alta incidência e por estar associada à permanência hospitalar prolongada, reinternações frequentes e despesas em decorrência da reabilitação dos indivíduos com sequelas físicas e/ou mentais (WHO, 2012; WILSON-COSTELLO, 2007).

A associação entre prematuridade e baixo peso ao nascer, especialmente naqueles bebês nascidos com menos de 1.500g, aumenta a chance da ocorrência de hemorragia intracraniana (HIC), que pode levar a problemas neurológicos e atraso no desenvolvimento dos bebês nos primeiros anos de vida (O'SHEA et al., 2012).

Outra complicação importante que pode ocorrer durante o parto é a asfixia perinatal e geralmente está associada a partos prolongados ou laboriosos de bebês pré-termo (< 37 semanas de IG), a termo (37 a 41 semanas incompletas de IG) ou pós-termo (> 42 semanas de IG) e pode evoluir para a síndrome hipóxico-isquêmica. A asfixia também pode ser reconhecida como sofrimento fetal, situação que existe quando há um decréscimo ou interrupção do fluxo de oxigênio por complicações do tipo prolapso do cordão (na qual o cordão umbilical precede o bebê na sua passagem pelo canal de parto), problemas na

placenta, presença de mecônio no líquido amniótico, dentre outros (PROCIANOY; SILVEIRA, 2001).

Estudo realizado em São Paulo verificou, no triênio de 2001 a 2003, que, dos 14.597 óbitos neonatais precoces, 3.247 (22%) foram associados à asfixia perinatal, sendo 11,5% decorrentes de causas não evitáveis (95 casos com idade gestacional <22 semanas ou peso <400g e 279 óbitos por anomalia congênita incompatível com a vida). (DARIPA et al., 2013).

Fatores pós-natais

Após o nascimento, a preocupação da equipe médica é manter a sobrevivência dos recém-nascidos e o bem-estar geral mãe-filho. Frequentemente, complicações perinatais podem gerar consequências na saúde do bebê no período pós-natal. Assim, serão discutidas brevemente aqui os principais fatores de risco para o crescimento e desenvolvimento dos bebês durante o período pós-natal.

No período neonatal, as principais complicações identificáveis estão relacionadas com o sistema respiratório, tais como a Doença da Membrana Hialina (DMH), Taquipneia Transitória do Recém-nascido (TTRN), Síndrome da Aspiração de Mecônio (SAM) problemas de adaptações fisiológicas do neonato ao meio ambiente extrauterino (BRASIL, 2012).

Um dos aspectos importantes após o nascimento e que se manterá nos primeiros anos de vida do bebê está relacionado com a nutrição. Uma das recomendações é realizar precocemente contato pele a pele, entre mãe e filho, dando apoio ao início da amamentação na primeira hora do pós-parto, conforme diretrizes sobre o aleitamento materno. Além disso, recomenda-se que o bebê seja amamentado exclusivamente no seio materno até o sexto mês de vida e, após essa idade, a mãe pode optar em continuar o aleitamento de maneira associada à introdução de outros alimentos recomendados pelo pediatra. A ausência do aleitamento materno no período neonatal e nos meses iniciais do crescimento aumenta a chance de a criança apresentar desnutrição,

diarreias, infecções respiratórias e aumentando a taxa de mortalidade infantil (BRASIL, 2015).

O aspecto social e econômico das famílias também deve ser levado em consideração, pois ambientes de risco social, em que a criança não tem acesso a condições básicas de moradia, higiene e alimentação, também são fatores de risco para o desenvolvimento de doenças nos primeiros anos de vida ou agravamento de enfermidades crônicas (ANDRADE et al., 2005; MARTINS et al., 2004).

Crianças que vivem em situação de pobreza podem apresentar alterações morfológicas cerebrais que podem comprometer seu desenvolvimento neuropsicomotor e desempenho escolar. Pesquisadores americanos analisaram o desenvolvimento cerebral das crianças a partir de ressonâncias magnéticas realizadas durante a infância e descobriram que a massa cinzenta do cérebro era sensivelmente menos desenvolvida em meninos e meninas pobres nos Estados Unidos. Mais especificamente, a massa cinzenta do lobo frontal, do lobo temporal e do hipocampo era até 10% menor em crianças criadas abaixo da linha da pobreza (HAIR et al., 2015).

Outro fator de risco importante para a saúde da criança diz respeito aos acidentes na infância. Os acidentes domésticos infantis são importante fonte de preocupação, pois são causas crescentes de mortalidade e invalidez no Brasil. Os acidentes acontecem em ambos os sexos e em todas as faixas de idade. A principal causa dos acidentes domésticos tem sido quedas, choques elétricos e queimaduras (XAVIER-GOMES et al., 2013).

O acompanhamento da saúde do bebê nos primeiros anos de vida é essencial para garantir um bom funcionamento dos sistemas orgânicos e o fornecimento de informações às pessoas que cuidam diretamente do bebê em casa, na creche e na escola. Assim, a família deve atentar para as consultas mensais ao pediatra no primeiro ano de vida, visando a um bom acompanhamento do crescimento e desenvolvimento do bebê. A partir do primeiro ano, as consultas pediátricas passam a ser semestrais até por volta de cinco anos e, posteriormente, anuais. Além disso, por meio das consultas pediátricas, o profissional

pode acompanhar o cumprimento do calendário vacinal para imunizar a crianças das principais enfermidades da primeira infância (BRASIL, 2012).

Considerações finais

O conhecimento dos principais fatores que influenciam negativamente o crescimento e desenvolvimento é o primeiro passo para adoção de medidas de promoção e prevenção na saúde do recém-nascido e lactente. O assunto é complexo e não é possível detalhar todos os fatores em um único texto. Os aspectos abordados neste capítulo podem ser úteis para subsidiar a estruturação de futuras pesquisas com a temática de prevenção de problemas no crescimento e desenvolvimento da criança.

Referências

- ALTUG-TEBER, Ö. A.; BONIN, M.A.; WALTER, M.A.; MAU-HOLZMANN, U. A. A.; DUFKE, A. A.; STAPPERT, H. A.; TEKESIN, I. B.; HEILBRONNER, H. C.; NIESELT, K. D.; RIESS, O. A. Specific transcriptional changes in human fetuses with autosomal trisomies. **Cytogenetic Genome**, v. 119, p.171–184, 2007.
- ANDRADE, S. A.; SANTOS, D. N.; BASTOS, A. C.; PEDROMÔNICO; M. R. M.; ALMEIDA-FILHO, N.; BARRETO, M. L. Ambiente familiar e desenvolvimento cognitivo infantil: uma abordagem epidemiológica. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, n. 4, p. 606-611, 2005.
- BEE, H.; BOYD, D. **A criança em desenvolvimento**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- BENUTE, G. R. G.; NOMURA, R. Y.; SANTOS, A. M.; ZARVOS, M. A.; DE LUCIA, M. C. S.; FRANCISCO, R. P. V. Preferência pela via de parto: uma comparação entre gestantes nulíparas e primíparas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 35, n. 6, p. 281-285, 2013.
- BEZERRA, E. H. M.; ALENCAR-JÚNIOR, C. A.; FEITOSA, R. F. G.; CARVALHO, A. A. A.; Mortalidade materna por hipertensão: índice e análise de suas características em uma maternidade-escola. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 9, p. 548-53, 2005.
- BRANDÃO, A. M. S.; DOMINGUES, A. P. R.; FONSECA, E. M. F.; MIRANDA, T. M. A.; BELO, A.; MOURA, J. P. A. S. Parto pré-termo com e sem rotura prematura

de membranas: características maternas, obstétricas e neonatais. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 9, p. 428-433, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. **Pré-natal e puerpério– atenção qualificada e humanizada**. Normas e Manuais Técnicos. Série Direitos Sexuais e Direitos Reprodutivos. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Saúde da criança: acompanhamento do crescimento e desenvolvimento infantil**. – Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Orientações para a coleta e análise de dados antropométricos em serviços de saúde**: Norma Técnica do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Atenção ao pré-natal de baixo risco**: Normas e Manuais Técnicos. Cadernos de Atenção Básica, nº 32. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Saúde da criança: crescimento e desenvolvimento** / Ministério da Saúde – Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia alimentar para a população brasileira**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Saúde da criança: aleitamento materno e alimentação complementar** / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – 2. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos **Diretriz Nacional de Assistência ao Parto Normal**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

BURNETT, A. C.; SCRATCH, S. E.; ANDERSON, P. J. Executive function outcome in preterm adolescents. **Early Human Development**, v. 89, n. 4, p. 215-220, 2013.

CALDERON, I. M. P; CECATTI, J. G.; VEJA, C. E. P. Intervenções benéficas no pré-natal para prevenção da mortalidade materna: beneficial interventions for maternal mortality prevention in the prenatal period. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 28, n. 5, 2006.

CHENG, S.W.; CHOU, H.C.; TSOU, K. O.; FANG, L. J.; TSAO, P. N. Delivery before 32 weeks of gestation for maternal pre-eclampsia: neonatal outcome and

2-year developmental outcome. **Early Human Development**, v. 76, n. 1, p. 39-46, 2004.

DARIPA, M., CALDAS, H. M. G., FLORES, L.P.O., WALDVOGEL, B. C., GUINSBURG, R., ALMEIDA, M. F. A. Asfixia perinatal associada à mortalidade neonatal precoce: estudo populacional dos óbitos evitáveis. **Revista Paulista de Pediatria**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 37-45, 2013.

DE ONIS, M.; ONYANGO, A.; BORGHİ, E.; SIYAM, A.; BLOSSNER, M.; LUTTER, C. Worldwide implementation of the WHO Child Growth Standards. **Public Health Nutrition**, v. 15, n. 9, p. 1603-1610, 2012.

FORMIGA, C.K.M.R. Crescimento e desenvolvimento neuropsicomotor de crianças de zero a dois anos. **Pediatria Moderna**, v. 51, p. 405-410, 2015.

GALLAHUE, D. L.; OZMUN, J. C.; GOODWAY, J. D. **Compreendendo o desenvolvimento motor**. 7. ed. Porto Alegre: AMGH, 2013.

GAO, Y.; SHENG, C.; XIE, R.H.; SUN, W.; ASZTALOS, E.; MODDEMANN, D.; ZWAIGENBAUM, L.; WALKER, M.; WEN, S. W. New Perspective on Impact of Folic Acid Supplementation during Pregnancy on Neurodevelopment/Autism in the Offspring Children – A Systematic Review. **PLoS One**, v. 11, n. 11, p. 1-16, 2016.

GARMENDIA, M. L.; CORVALAN, C.; ARAYA, M.; CASANELLO, P.; KUSANOVIC, J. P.; UAUY, R. Effectiveness of a normative nutrition intervention (diet, physical activity and breastfeeding) on maternal nutrition and offspring growth: the Chilean maternal and infant nutrition cohort study (CHiMINCs). **Pregnancy and Childbirth**, v. 15, p. 175, 2015.

GONÇALVES, C. V.; MENDOZA-SASSI, R. A.; CESAR, J. A.; CASTRO, N. B.; BORTOLOMEDI, A. P. Índice de massa corporal e ganho de peso gestacional como fatores preditores de complicações e do desfecho da gravidez. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 34, n. 7, p. 304-9, 2012.

HACK, M.; YOUNGSTROM, E. A.; CARTAR, L.; SCHLUCHTER, M.; TAYLOR, H. G.; FLANNERY, D.; KLEIN, N.; BORAWSKI, E. Behavioral outcomes and evidence of psychopathology among very low birth weight infants at age 20 years. **Pediatrics**, v. 114, n. 4, p. 932-940, 2004.

HAIR, N. L.; HANSON, J. L.; WOLFE, B. L.; POLLAK, S. D. Association of child poverty, brain development, and academic achievement. **JAMA Pediatrics**, v. 169, n. 9, p. 822-829, 2015.

HILL, S. H.; LOWERS, L.; LOCKE-WELLMAN, J.; SHEN, S. Maternal smoking and drinking during pregnancy and the risk for child and adolescent psychiatric disorders. **Journal Study Alcohol**, v. 61, n. 5, p. 661-668, 2000.

JOVER, M.; AYOUN, C.; BERTON, C.; CARLIER, M. Specific grasp characteristics of children with trisomy 21. **Developmental Psychobiology**, v. 52, n. 8, p. 782–793, 2010.

LINHARES, M. B. M.; CARVALHO, A. E. V.; PADOVANI, F. H. P.; BORDIN, M. B. M.; MARTINS, I. M. B.; MARTINEZ, F. E. A. A compreensão do fator de risco da prematuridade sob a ótica desenvolvimental. In: MARTURANO, E. M.; LINHARES, M. B. M.; LOUREIRO, S. R. (Eds.). **Vulnerabilidade e Proteção: indicadores na trajetória de desenvolvimento escolar**. São Paulo: Casa do Psicólogo, 2004, p. 11-38.

LIU, Y.; LI, X. N.; SUN, X. R.; LIU, Q. L.; ZHA, S. W.; CHEN, Y. H.; MAO, C. T.; XU, X. Y. Prenatal and neonatal risk factors associated with children's developmental status at ages 4–7: lessons from the Jiangsu China birth defects prevention cohort. **Child: care, health and development**, v. 41, n. 5, p. 712–721, 2015.

MARTINELLI, S., BITTAR, R. E., ZUGAIB, M. Predição da restrição do crescimento fetal pela medida da altura uterina. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 26, n. 5, p. 383-389, 2004.

MARTINS, M. F. S., COSTA, J. S. D., SAFORCADA, E. T., CUNHA, M. D. C. Qualidade do ambiente e fatores associados: um estudo em crianças de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 3, p. 710-718, 2004.

MATTAR, R.; TORLONI, M. R.; BETRÁN, A. P.; ALDI, M. M. Obesidade e gravidez. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 31, n. 3, p. 107-10, 2009.

MEYER, R. E.; LIU, GILBOA, S. M.; ETHEN, M. K.; AYLSWORTH, A. S.; POWELL, C. M.; FLOOD, T. J.; MAI, C. T.; WANG, Y.; CANFIELD, M. A. Survival of children with trisomy 13 and trisomy 18: a multi-state population-based study. **American Journal of Medical Genetics**, v. 170, p. 825–837, 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Diretriz: **Suplementação diária de ferro e ácido fólico em gestantes**. Genebra: OMS, 2013.

ORNOY A.; REECE, E. A.; PAVLINKOVA, G.; KAPPEN, C.; MILLER, R. K. Effect of maternal diabetes on the embryo, fetus, and children: congenital anomalies, genetic and epigenetic changes and developmental outcomes. **Birth Defects Research**, v.105, n. 1, p. 53-72, 2015.

O'SHEA, T. M.; ALLRED, E. N.; KUBAN, K.C.; HIRTZ, D.; SPECTER, B.; DURFEE, S.; PANETH, N.; LEVITON, A. et al. Intraventricular hemorrhage and developmental outcomes at 24 months of age in extremely preterm infants. **Journal Child Neurology**, v. 27, n.1, p. 22-29, 2012.

PAPALIA; D. E.; FELDMAN, R. D. **Desenvolvimento Humano**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2013.

PEREZ-RAMOS, A. M. Q. Modelos de prevenção: perspectivas dos programas de estimulação precoce. **Psicologia USP**, v. 1, n. 1, p. 67-75, 1990.

RESEGUE, R., PUCCINI, R. F., SILVA, E. M. K. S. Fatores de risco associados a alterações no desenvolvimento da criança. **Pediatria (São Paulo)**, v. 29, n. 2, p. 117-128, 2007.

SZYMONOWICZ, W; YU, Y. H. Severe pre-eclampsia and infants of very low birth weight. **Archives of Disease in Childhood**, v. 62, p. 712-716, 1987.

TEIXEIRA, C. S. S.; CABRAL, A. C. V. Avaliação nutricional de gestantes sob acompanhamento em serviços de pré-natal distintos: a região metropolitana e o ambiente. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 7, n. 1, p. 27-34, 2016.

TORABI, F.; AKBARI, S. A. A.; AMIRI, S. SOLEIMANI, F.; MAJD, H. A. Correlation between high-risk pregnancy and developmental delay in children aged 460 months. **Libyan Journal of Medicine**, v. 7, p. 01-06, 2012.

TOUGH, S. C.; SIEVER, J.; BENZIES, K.; LEEW, S.; JOHNSTON, D. W. Maternal well-being and its association to risk of developmental problems in children at school entry. **BMC Pediatrics**, v. 10, n.19, p. 01-12, 2010.

URRUTIA-PEREIRA, M.; SOLÉ, D. Deficiência de vitamina D na gravidez e o seu impacto sobre o feto, o recém-nascido e na infância. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 33, n. 1, p. 104-113, 2015.

VALERA-GRAN, D.; HERA, M. G. D. L.; NAVARRETE-MUÑOZ, E. M. Folic acid supplements during pregnancy and child psychomotor development after the first year of life. **JAMA Pediatrics**, v. 168, n. 11, p. 01-10, 2014.

VIEIRA, M. E. B.; LINHARES, M. B. M. Desenvolvimento e qualidade de vida em crianças nascidas pré-termo em idades pré-escolar e escolar. **Jornal de Pediatria (Rio de Janeiro)**, v. 87, n. 4, p. 281-291, 2011.

VIEIRA, M. E. B.; RIBEIRO, F. V.; FORMIGA, C. K. M. R. Principais instrumentos de avaliação do desenvolvimento da criança de zero a dois anos de idade. **Revista Movimenta**, v. 2, n. 1, p. 23-31, 2009.

SHARMA, V. K.; HILL, S. Y. Differentiating the effects of familial risk for alcohol dependence and prenatal exposure to alcohol on offspring brain morphology. **Alcohol Clinical and Experimental Research**, v. 41, n. 2, p. 1-11, 2017.

WALKER, C. K.; KRAKOWIAK, P.; BAKER, A.; HANSEN, R. L.; OZONOFF, S. HERTZ-PICCIOTTO, I. Preeclampsia, placental insufficiency, and autism

spectrum disorder or developmental delay. **JAMA Pediatrics**, v. 169, n. 2, p. 154-162, 2015.

WEHBY, G. L.; MURRAY, J. C. The effects of prenatal use of folic acid and other dietary supplements on early child development. **Matern Child Health J**, v. 12, n. 2, p. 180-187, 2008.

WHITEHOUSE, A. J. O.; HOLT, B. J.; SERRALHA, M.; HOLT, P. G.; KUSEL, M. M. H; HART, P. H. Maternal serum vitamin D levels during pregnancy and offspring eurocognitive development. **Pediatrics**, v. 129, p.485–493, 2012.

WILSON-COSTELLO, D. (2007). Is there evidence that long-term outcomes have improved with intensive care? **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, v.12, n. 5, p. 344-354, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Who recommendations on antenatal care for a positive pregnancy experience**. Geneva, Switzerland: WHO, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Born too soon: the global action report on preterm birth**. Geneva: WHO, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Who child growth standards: length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age. Methods and development**. WHO (nonserial publication). Geneva, Switzerland: WHO, 2006.

XAVIER-GOMES, L. M. ROCHA, R. M.; ANDRADE-BARBOSA, T. L., SILVA, C. S. o. Descrição dos acidentes domésticos ocorridos na infância. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 394-400, 2013.

11.

A VITAMINA D E A SAÚDE PÚBLICA

IRIS IASMINE DE REZENDE ARAÚJO
LUCAS HENRIQUE FERREIRA SAMPAIO
CIBELLE KAYENNE MARTINS ROBERTO FORMIGA

Nos últimos anos, muito tem sido divulgado e publicado no âmbito científico e nos meios de comunicação de massa a respeito da ação da vitamina D no corpo humano. Apesar de diferentes opiniões, parece haver um consenso sobre a importância da presença de determinados níveis de vitamina D no organismo para a prevenção e tratamento de problemas de saúde. Sabe-se que a vitamina D é um termo genérico para uma série de compostos considerados como hormônios lipossolúveis obtidos após exposição solar ou por meio da alimentação, sendo essencial para o corpo humano, e sua ausência pode proporcionar uma série de complicações (GRÜDTNER et al., 1997).

Em geral, a população tem se protegido da exposição à luz solar para a prevenção do câncer de pele, gerando a dúvida sobre o quanto de vitamina D é obtida a partir dos alimentos e quais as recomendações seguras de suplementação em caso de diagnóstico de deficiência (MAEDA et al., 2014).

Nesse sentido, o objetivo deste capítulo é realizar uma revisão sobre a temática, inicialmente abordando aspectos fisiológicos do metabolismo da vitamina D e seus benefícios no corpo humano, além de

abordar de forma geral a avaliação e as recomendações de suplementação da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia.

A vitamina D e sua importância no crescimento e desenvolvimento corporal humano

A vitamina D é a nomenclatura generalista que designa um grupo de compostos lipossolúveis secosteroides, derivados do 7-desidrocolesterol (7 DHC ou pró-vitamina D3), que são cruciais para a manutenção do equilíbrio mineral do organismo. Apesar da denominação clássica de vitamina, esses compostos lipossolúveis que compõem o grupo das chamadas vitaminas D devem ser conceitualmente considerados como hormônios e pró-hormônios, pois podem ser produzidos no próprio organismo, e os níveis desses metabólitos são regulados por um mecanismo complexo de *feedback*, envolvendo enzimas e receptores, o que sugere uma regulação mais semelhante à dos hormônios do que a dos nutrientes (ARANTES et al., 2013).

No entanto, essas estruturas ainda são descritas como vitaminas, devido ao uso dessa denominação há quase um século. Os estoques corporais de Vitamina D dependem fundamentalmente da síntese cutânea pela exposição aos raios ultravioleta-B (UVB). Na maioria dos indivíduos, a exposição ao sol é o principal determinante do estado de vitamina D, o que representa 80-90% das reservas corporais de vitamina D (BUENO; CZEPIELEWSKI, 2008).

Além de a vitamina D ser produzida por exposição da pele aos raios solares, sua obtenção pode ser proveniente do consumo dietético. Entretanto, poucos alimentos são boas fontes de vitamina D, como a gema de ovo, fígado, manteiga, cogumelo e leite integral. Também são ricos em vitamina D peixes como o atum, o linguado, o bacalhau, o salmão, a cavala, a sardinha, a enguia, o arenque e óleos de fígado de peixes. De modo geral, carnes e peixes magros têm apenas traços de vitamina D (BUENO; CZEPIELEWSKI, 2008).

As formas consumíveis de vitamina D são o ergocalciferol (vitamina D2) e o colecalciferol (D3). A principal diferença entre as vitaminas D2 e a D3 é a fonte nutritiva. Em síntese, a vitamina D é fornecida

por fontes vegetais e fúngicas, sob a forma de vitamina D₂, enquanto que aquela fornecida pelas fontes animais é a vitamina D₃. O colecaciferol difere apenas pela presença de uma ligação dupla adicional e um grupo metil incorporados à longa cadeia lateral da forma biológica denominada vitamina D₂ (WACKER; HOLIACK, 2013).

O ergocalciferol é produzido a partir do ergosterol, ingerido em fungos e vegetais, pela incidência dos raios ultravioletas (UV) B (290-315 nm). Em mamíferos, o início da síntese fotoquímica endógena da vitamina D₃ ocorre nas camadas mais profundas da epiderme (subcamadas espinhosa e basal). Quando sintetizada na pele, a vitamina D (7-deidrocolesterol) necessita de duas etapas metabólicas de hidroxilação para sua ativação. A primeira hidroxilação converte em a 7-deidrocolesterol em calcidiol. A segunda reação metabólica transforma o calcidiol em calcitriol, a vitamina D biologicamente ativa, que atua como um verdadeiro hormônio essencial para praticamente todas as células do organismo humano (HAMILTON, 2010).

Na derme e epiderme, encontra-se uma forma de pró-vitamina D, o 7-deidrocolesterol (ou calciferol), que é transformado em vitamina D₃, sob a ação de raios ultravioleta B (UVB). A vitamina D₃, ainda não fisiologicamente ativa, é, então, transportada pela corrente sanguínea até o fígado. Nos hepatócitos, a vitamina D₃ sofre uma hidroxilação no carbono 25, tornando-se a 25-hidroxivitamina D [25(OH)₂D] ou calcidiol. A maior parte do calcidiol produzido no fígado é depositada na hipoderme (BUENO; CZEPIELEWSKI, 2008).

Para se tornar a vitamina D fisiologicamente ativa, o calcidiol precisa passar ainda por uma última hidroxilação na posição 1. Essa hidroxilação ocorre nas mitocôndrias dos túbulos contornados proximais do rim, sob ação da enzima 1 α hidroxilase. Após essa última reação metabólica nos rins, forma-se a 1,25 dihidroxivitamina D [1,25(OH)₂D] ou calcitriol, a forma biologicamente ativa da vitamina D.

Essa passagem renal, ao contrário da hepática, é estreitamente regulada por vários fatores. A elevação plasmática do PTH e a diminuição do fosfato estimulam a atividade da 1- α hidroxilase. A 1,25(OH)₂D retroregula sua própria produção, inibindo a atividade da 1- α hidroxilase.

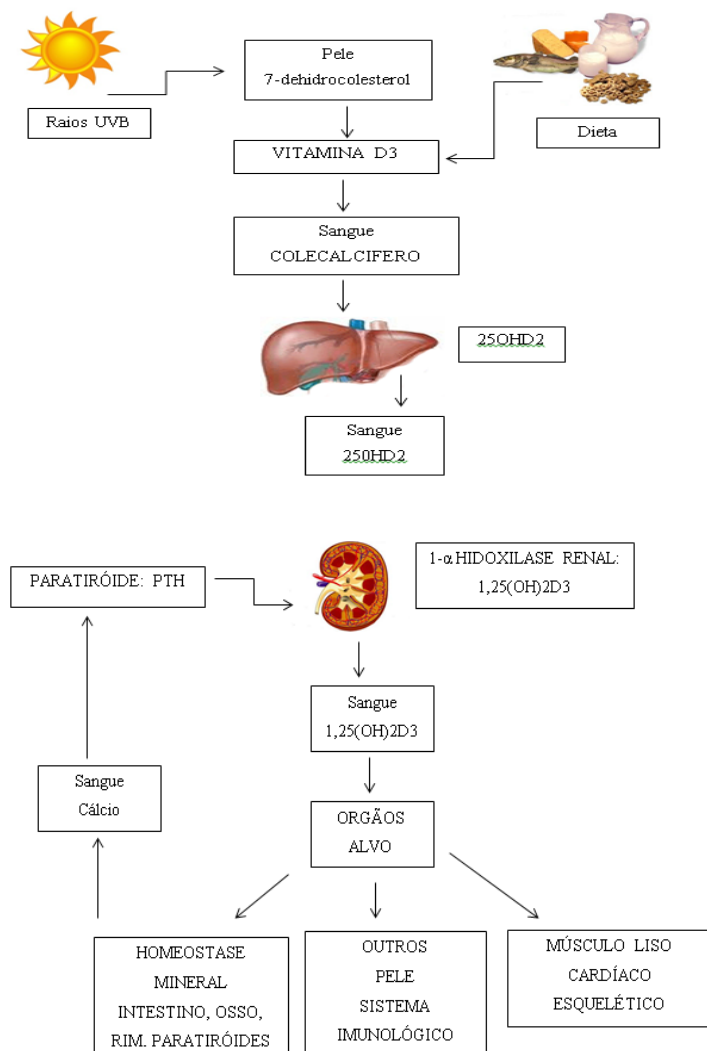
lase. O calcitriol também regula o PTH (paratormônio) e a eleva à concentração plasmática de fosfato (Figura 1) (PEDROSA, 2005).

A vitamina D é um hormônio esteroide, cuja função mais estudada consiste na regulação da homeostase do cálcio e fósforo. Essa regulação ocorre por uma interação com as paratireoides, rins e intestinos. Ao manter os níveis séricos de cálcio e fósforo em um estado normal, o calcitriol é capaz de propiciar condições à maioria das funções metabólicas, entre elas, a mineralização óssea (HOLICK, 2006; GRÜDTNER; WEINGRILL; FERNANDES, 1997). Por estar envolvida no crescimento esquelético, a vitamina D torna-se essencial durante a infância e a adolescência (GORDON et al., 2004).

O cálcio (Ca) é necessário em inúmeras reações metabólicas do organismo. É, por exemplo, crucial ao crescimento e desenvolvimento dos ossos e dentes, para a formação e manutenção da matriz óssea, estabilização membranas de células excitáveis, como músculos e nervos, no processo de coagulação sanguínea e na atividade de diversas enzimas. A concentração de cálcio nos tecidos é variável. Dentro das células, o Ca é encontrado, principalmente, no retículo endoplasmático e nas mitocôndrias. Representa o mineral mais abundante do corpo humano e corresponde de 1 a 2% do peso corporal. Os principais locais de armazenamento de cálcio no organismo humano são os ossos, que reservam cerca de 99% desse mineral. O cálcio não presente nos ossos encontra-se principalmente no sangue, no espaço extracelular e nas células de tecidos moles (GRÜDTNER; WEINGRILL; FERNANDES, 1997).

Durante a infância e a adolescência, devido à alta demanda de cálcio relacionado ao crescimento, níveis séricos normais de vitamina D promovem a absorção de mais de 60-80% de do cálcio dietético (HOLICK, 2004). Quando há deficiência de vitamina D, apenas 10-15% do cálcio dietético é absorvido. Por isso, especialmente durante a infância, a deficiência de vitamina D pode causar retardo de crescimento, anormalidades ósseas e aumento do risco de fraturas na vida adulta (ROVNER et al., 2008). A deficiência de vitamina D é a causa mais comum de raquitismo, pois impede a absorção eficiente de cálcio

Figura 1 – Representação esquemática da sequência de eventos envolvidos na síntese da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$



Fonte: Adaptado de Pedrosa (2005)

dietético, gerando as deformidades ósseas características da doença. (HOLICK, 2006).

Apesar de a função mais estudada da vitamina D ser a regulação da homeostase do cálcio e fósforo, esses compostos são essenciais a centenas, ou talvez milhares de funções metabólicas humanas. Já foram encontrados receptores em diversas células do sistema imune, glândulas mamárias e sexuais, neurônios, adipócitos, enterócitos e fibras musculares lisas, esqueléticas e cardíacas. Estima-se que a chamada Resposta Genômica da Vitamina D seja um processo que envolva cerca de 5% de todo genoma humano (SCHUCH et al., 2013).

Ações fisiológicas da vitamina D no corpo

Mineralização óssea

A 1,25(OH)₂D₃ induz a diferenciação de células estromais para células osteoblásticas. Os osteoblastos respondem pela elaboração de todos os componentes da matriz óssea. Essas células também secretam a fosfatase alcalina necessária à alcalinização do meio, pois favorecerão a deposição de minerais. Os osteoblastos maduros secretam, ainda, a osteocalcina. Essa proteína, em conjunto o ácido γ -carboxiglutâmico, é responsável pela formação do resíduo γ -carboxiglutamil, que efetiva a mineralização do tecido ósseo (AVOLIO et al., 2008).

Um sensor de cálcio presente nas glândulas paratireoides detecta a diminuição dos níveis séricos de cálcio. Quando esses sensores paratireoideanos detectam a diminuição sérica de cálcio, a paratireoide aumenta a síntese e secreção do hormônio paratireoide ou paratormônio (PTH). O PTH item como função fisiológica promove a maior reabsorção de cálcio e diminui a reabsorção de fósforo nos rins (HOLICK, 2006).

Contração muscular

Com a deficiência de vitamina D, o transporte ativo do cálcio para o interior do retículo sarcoplasmático (RS) de coelhos encontra-se reduzido e se normaliza com o pré-tratamento com vitamina D (CURRY;

BASTEN; FRANCIS, 1974). A $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ seria a responsável pela estimulação do transporte ativo de cálcio para o interior do RS pela cálcio-ATPase e a atividade dessa enzima é regulada pela fosforilação de proteínas na membrana do RS estimulada pela $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (BOLAND et al., 1983; POLLY; TAN, 1986).

Na célula muscular esquelética, a vitamina D está ligada ao metabolismo e à síntese proteica. A adição de calcitriol em cultura de tecido de músculo de ratos com a deficiência vitamínica aumentou o conteúdo intracelular de ATP e tropomina C em músculo de coelhos raquíticos. A proteína supramencionada compõe o complexo actinomiosina com alta afinidade pelo cálcio e encontrava-se com níveis diminuídos comparados aos níveis presentes nos músculos de animais normais (PEDROSA, 2005). Rejnmark (2011), em sua revisão das evidências de ensaios clínicos randomizados em humanos, aponta que os efeitos da suplementação de vitamina D são avaliados benéficamente sobre a função muscular em termos de uma força muscular melhorada, um balanço do corpo reduzido, um teste funcional TUG (*Timer Up Go*) melhorado, uma velocidade de marcha aumentada em 12 minutos ou uma medida melhorada de habilidades físicas.

Apesar de os estudos ainda não serem conclusivos, muitas pesquisas têm apontado para os efeitos benéficos da vitamina D em vários sistemas orgânicos. O Quadro 1 sintetiza os principais efeitos da ação da vitamina D no corpo humano de acordo com os achados de diversos estudos.

Quadro 1 – Principais benefícios da ação da vitamina D no corpo humano

Local ou sistema corporal	Benefícios encontrados
Sistema Musculoesquelético	Fortalecimento ósseo e protege os músculos de lesões
Metabolismo Lipídico	Auxilia no processo de perda de peso em pacientes com obesidade
Sistema Imunológico	Modulação dos linfócitos T, auxiliando a resposta imune contra infecções

Local ou sistema corporal	Benefícios encontrados
Sistema Cardiovascular	Auxilia no músculo cardíaco, estimula a produção de insulina, auxiliando no tratamento do diabetes e hipertensão arterial
Sistema Nervoso	Auxilia na proteção neuronal em pacientes com esclerose múltipla e outras doenças neurológicas degenerativas

Fonte: Adaptado de Holick et al. (2011, 2012) e Maeda et al. (2014).

Avaliação sérica da vitamina D

O calcidiol sérico é considerado o parâmetro mais confiável e apurado para definir o estado da vitamina D, visto que representa a forma circulante em maior quantidade e tem uma semivida de aproximadamente duas semanas. A produção da 25(OH)₂D no fígado sofre pouca regulação. Desse modo, os níveis plasmáticos do calcidiol refletem de forma mais realística a reserva corporal de vitamina D. O calcitriol [1,25(OH)₂D], apesar de ser a forma metabolicamente ativa da vitamina, não é considerado uma forma adequada para avaliar a concentração sérica de Vitamina D, uma vez que apresenta uma semivida curta (cerca de 4 horas) e a sua concentração é 1000 vezes menor do que seu precursor, o calcidiol [25(OH)₂D].

O calcitriol pode ter suas concentrações séricas modificadas a qualquer instante, pela ação de inúmeras modificações metabólicas e hormonais. Além disso, sempre que um déficit de vitamina D é detectado pelo organismo, ocorre um aumento da secreção da PTH, que estimula o rim a produzir mais calcitriol. Dessa forma, quando há deficiência de vitamina D, observa-se diminuição dos níveis de cardiol, enquanto os níveis calcitriol apresentam-se dentro da normalidade ou até elevados (ARANOW, 2011; MARQUES et al., 2010).

Ainda hoje não existe consenso sobre as concentrações ideais de vitamina em humanos. O *Institute of Medicine* (IOM) e a *Endocrine Society* definem como deficiência vitamínica D valores inferiores a 20 ng/mL (50 nmol/L). No entanto, o IOM e a *Endocrine Society* (ES) são discordantes no que se refere aos níveis considerados suficientes e ideais

CIÊNCIAS DA SAÚDE: SABERES E PRÁTICAS INTERDISCIPLINARES

de vitamina D. O IOM considera como suficientes níveis de vitamina D superiores a 20 ng/mL (50 nmol/L). Já a ES segundo considera ideais os níveis de vitamina D acima 30 ng/mL (75 nmol/L) (MARQUES et al., 2010).

Também não existe consenso na literatura médica internacional acerca dos níveis ideais de vitamina D. Diferentes trabalhos têm sugerido que os níveis suficientes da referida vitamina apresentam distintos parâmetros comparando-se as doenças mediadas pelo sistema imune, a homeostase óssea e mineral. Os valores ideais para a os níveis séricos de Vitamina D, baseados em estudos populacionais com ênfase na homeostase do cálcio e na saúde óssea, variam de 20 a 32 ng/mL (50 a 80 nmol/L) (HEANEY et al., 2003; REID; AVENELL, 2011; SILVA et al., 2008).

Especialistas defendem que, para correção do hiperparatireoidismo secundário, redução do risco de quedas e fraturas e a máxima absorção de cálcio, o melhor ponto de corte de $25(\text{OH})_2\text{D}$ é de 30 ng/mL (75 nmol/L) (HOLICK et al., 2011; NORMAN; BOUILLON, 2010). Por isso, concentrações séricas de $25(\text{OH})_2\text{D}$ abaixo de 30 ng/mL (75 nmol/L) são consideradas como hipovitaminose D. Portanto, concentrações séricas abaixo de 20 ng/mL (50 nmol/L) são classificadas como deficiência, entre 20 e 29 ng/mL (50 e 74 nmol/L), como insuficiência, e entre 30 e 100 ng/mL (75 e 250 nmol/L), como suficiência (HOLICK et al., 2011, 2012; REID; AVENELL, 2011; VIETH; BISCHOFF-FERRARI; BOUCHER, 2007).

A Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) recomenda que concentrações de $25(\text{OH})\text{D}$ acima de 30 ng/mL são desejáveis e devem ser as metas para populações de maior risco, pois, acima dessas concentrações, os benefícios da vitamina D são mais evidentes, especialmente no que se refere a doenças osteometabólicas e redução de quedas (MAEDA et al., 2014).

Segundo a *Endocrine Society*, é recomendável a suplementação de crianças até 1 ano com pelo menos 400 UI/dia para alcançar uma melhor saúde óssea. Para indivíduos com idade entre 1 e 70 anos, é recomendável pelo menos 600 UI/dia, e para indivíduos com mais de

70 anos, preconiza-se uma suplementação de 800 UI/dia (HOLICK et al., 2011). Porém, deve-se tomar cuidado com o excesso de vitamina D, para evitar a chamada hipervitaminose D. Níveis séricos de cardiol superiores a 150 ng/mL (375 nmol/L) podem causar intoxicação aguda de vitamina D com hipercalcemia, hipercalcúria e calcificações em diferentes órgãos (MARQUES et al., 2010).

A concentração sérica de $25(\text{OH})_2\text{D}$ circulante é considerado em todo o mundo como o melhor método para se avaliar os níveis corpóreos de vitamina D. Alguns fatores devem ser considerados quando se avaliam os níveis dessa vitamina. Por exemplo, a falta de um controle regulatório fisiológico preciso (*feedback*), a variabilidade dos métodos e padrões e a inclusão de metabólitos contaminantes na análise. O radioimunoensaio (RIA) utilizado no passado foi substituído por imunoensaios automatizados quimioluminescentes ou ensaios imunoenzimáticos (ELISA) que medem a $25(\text{OH})\text{D}$ total. Ou seja, atualmente, os ensaios laboratoriais medem a combinação da vitamina D2 ($25(\text{OH})\text{D}_2$) e vitamina D3 ($25(\text{OH})\text{D}_3$) (LAI et al., 2010).

Apesar de os imunoensaios serem os testes mais utilizados na rotina laboratorial de medição da vitamina D, os métodos tidos como referência e considerados o padrão-ouro de avaliação são a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) aliada à espectrometria de massa (LC-MS). Essa metodologia associada pode distinguir níveis individuais de $25(\text{OH})\text{D}_2$ e $25(\text{OH})\text{D}_3$ (HEANEY, 2013). Os resultados para avaliar o status de vitamina D podem ser expressos em nanograma por mililitro (ng/mL) ou nanomol por litro (nmol/L). Simplificadamente falando, os métodos automatizados e o ELISA são rápidos e utilizados em rotinas clínicas, mas apresentam níveis de $25(\text{OH})\text{D}_2$ e $25(\text{OH})\text{D}_3$ em conjunto. Enquanto isso, métodos de HPLC aliados ao LC-MS podem distinguir entre $25(\text{OH})\text{D}_2$ e $25(\text{OH})\text{D}_3$, sendo úteis, portanto, na avaliação da efetividade da suplementação de D2 versus D3 endógena. Esses métodos cromatográficos, embora mais precisos, são mais trabalhosos e mais caros (ONG et al., 2012).

Considerando-se o custo relativamente elevado para mensuração de $25(\text{OH})\text{D}$, o Departamento de Metabolismo Ósseo e Mineral da

Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) está de acordo com as diretrizes publicadas pela *Endocrine Society* e não recomenda a avaliação da vitamina D para a população geral. Atualmente, recomenda-se a avaliação laboratorial apenas em indivíduos com risco para a hipovitaminose D ou naqueles cuja situação clínica seja relevante. Os candidatos à mensuração seriam: idosos com história de quedas e fraturas, pacientes com quadro de raquitismo ou osteomalácia, portadores de osteoporose, grávidas, lactentes, obesos, pacientes com síndromes de má-absorção (fibrose cística, doença inflamatória intestinal, doença de *Crohn*, cirurgia bariátrica), hiperparatireoidismo, insuficiência renal ou hepática, doenças granulomatosas e linfomas. A avaliação da vitamina D também é recomendável em indivíduos em uso de medicações que interfiram no metabolismo da vitamina D (anticonvulsivantes, glicocorticoides, antifúngicos, antirretrovirais, colestiramina, orlistat) (HOLICK et al., 2011; MCDUFFIE et al., 2002).

Doses diárias recomendadas para manutenção de vitamina D

A hipovitaminose D é descrita na literatura como um problema clínico de proporções globais. Estima-se que um bilhão de pessoas em todo o mundo sejam acometidas pela hipovitaminose D. Porém, a maioria dos casos não são diagnosticados adequadamente, ocasionando uma epidemia oculta em diversos países do mundo (LAI et al., 2010). Uma revisão sistemática de 2014 mostra que a situação da hipovitaminose D pode ser ainda mais preocupante e que um terço de toda a população mundial sofre com essa moléstia (HILGER et al., 2014).

As doses de manutenção diárias de vitamina D, recomendadas para população geral e para população de risco para deficiência, estão descritas no Quadro 2, de acordo com as recomendações da SBEM. As dosagens descritas não variam muito entre as faixas etárias de crianças, adolescentes e adultos.

Quadro 2 – Doses de manutenção diárias de vitamina D recomendadas para população geral e para população de risco para deficiência

Faixas etárias	População geral (UI)	População de risco (UI)
0 – 12 meses	400	400 – 1.000
1 – 8 anos	400	600 – 1.000
9 – 18 anos	600	600 – 1.000
19 – 70 anos	600	1.500 – 2.000
> 70 anos	800	1.500 – 2.000
Gestantes 14 – 18 anos	600	600 – 1.000
Gestantes >18 anos	600	1.500 – 2.000
Lactantes 14 – 18 anos	600	600 – 1.000
Lactantes > 18 anos	600	1.500 – 2.000

Fonte: Maeda et al. (2014)

No Brasil, os estudos indicam valores subótimos de vitamina D, verificando-se alta prevalência de hipovitaminose D em diversas faixas etárias. A tabela 3 apresenta alguns dos estudos brasileiros e dois multinacionais (que incluíram o Brasil), sobre a hipovitaminose D, publicados na última década. A maioria dos estudos abordou principalmente idosos e mulheres na pós-menopausa, que são populações de risco para osteoporose. Dois estudos envolvendo adolescentes mostraram uma alta prevalência de hipovitaminose D nessa parcela da população brasileira (MAEDA et al., 2014)

A população geriátrica é mais suscetível à hipovitaminose D por vários fatores. Dentre eles, elenca-se a reduzida exposição ao sol, a redução na capacidade de produção cutânea de vitamina D, alimentação inadequada, menor absorção de vitamina D pelo trato gastrointestinal, utilização de múltiplas drogas que interferem na absorção/metabolização da vitamina D e comprometimento renal. Dentro desse grupo, pacientes institucionalizados têm um risco ainda maior para essa situação, que se reflete em um aumento de até 10,5 vezes no risco de fratura (SARAIVA et al., 2007).

Tabela 1 – Prevalência de hipovitaminose D em regiões do Brasil nos estudos pesquisados

Título do Artigo	Citação	n	População	Idade (anos) Média ± DP	Local/ Latitude	25 (OH)D (ng/mL) Média ± DP	Prevalência (%)	Suplementa- ção oral ou ingestão de Vitamina D
Prevalência de deficiência e insuficiên- cia de vitamina D e sua correlação com PTH, marcadores de remodelação óssea e densidade mineral óssea, em pacientes ambulatoriais	(SILVA et al., 2008)	180	Pacientes ambulatoriais de endocrino- logia, 14-91 anos, 165 M e 15 H	58	Belo Horizonte	39,6 ± 16,8	42	Doses variadas
Increases in summer serum 25-hydroxyvita- min D (25 OHD) concentrations in elderly subjects in São Paulo, Brazil	(MAEDA et al., 2010)	99	55– 83 anos, 52 M e 47 H	67,4 ±6,0	Indaítuba SP	78,9 ±30,9 nmol/ L no inverno 91,6 ±31,7 nmol/ L no verão	19	Doses variadas
Concentração plasmática de 25 hidroxivitamina D em mulheres na pós-meno- pausa com baixa densidade mineral óssea	(RUSSO et al., 2009)	251	Voluntárias na pós-meno- pausa com baixa massa óssea, 50-85 anos	67±6	Rio de Janeiro	26,0±10,4	68,3	Sem suplementação

Título do Artigo	Citação	n	População	Idade (anos) Média ± DP	Local/ Latitude	25 (OH)D (ng/mL) Média ± DP	Prevalência (%)	Suplementa- ção oral ou ingestão de Vitamina D
Vitamin D status, parathyroid function, bone turnover, and BMD in postmenopausal women with osteoporosis global perspective	(KUCHUK et al., 2009)	1486	Mulheres na pós-meno-pausa com osteoporose, 50–85 anos	-	Latitude 15°S-23° S	28,0 ±7,6	66	Valores não mencionados
Vitamin D insufficiency: a risk factor to vertebral fractures in community-dwelling elderly women	(LOPES et al., 2009)	415	Mulheres pós-meno-pausa com e sem fraturas	Sem fratura: 72,1 ±4,4 Com fratura: 74,6± 5,8	São Paulo (SP) 23°S	Sem fratura: 20,7± 10,7 Com fratura: 16,9± 8,2	Sem fratura: 82,3% Com fratura: 93,65%	Usuários de suplementação foram excluídos
Vitamin D status in a sunny country: where has the sun gone	(UNGER et al., 2010)	603	Funcionários e estudantes da USP, 18–90 anos, 485 M e 118 H	47± 13	São Paulo (SP) 23°S	Mediana pós-inverno: 21,4 Pós-verão: aumento de 10,6	77	Parâmetros não avaliados
Vitamin D deficiency and its relationship with bone mineral density among postmenopausal women living in the tropics	(BANDEIRA et al., 2010)	93	Mulheres saudáveis na pós-meno-pausa	65± 7	Recife (PE) 8°S	28,8± 14,8	24	Parâmetros não avaliados

Título do Artigo	Citação	n	População	Idade (anos) Média ± DP	Local/ Latitude	25 (OH)D (ng/mL) Média ± DP	Prevalência (%)	Suplementa- ção oral ou ingestão de Vitamina D
Concentrações de 25-hidroxitamina D em níveis pressóricos em idosos hipertensos	(NEVES et al., 2012)	91	Idosos com HAS, >60 anos, 81 M e 10 H	69± 7	João Pessoa (PB) 7°S	Adequados: 44,8± 12,5 Inadequados: 24,0± 3,5	33	Sem suplementação
Vitamin D deficiency in girls from South Brazil: a cross-sectional study on prevalence and association with vitamin D receptor gene variants	(SANTOS et al., 2012)	234	Adolescentes 7– 18 anos	13,0± 1,9	Curitiba (PR) 25°	Variou de 20,8 a 22,0 nos tercis estudados	90,6	Sem suplementação
Factors affecting vitamin D status in different populations in the city of São Paulo, Brazil: the São Paulo vitamin D Evaluation Study (SPADES)	(MAEDA et al., 2013)	591	Voluntários, 17– 100 anos, 388 M e 203 H	Institucional: 76,2± 9,0 Comunidade: 79,6± 5,3 Exercício: 67,6± 5,4 Jovens: 23,9± 2,8	São Paulo (SP) 23°S	Institucionalizados: 15,0± 11,9 Comunidade: 19,8± 11,0 Exercício: 31,5± 12,4 Jovens: 34,5± 14,0	73	6% com suplementação oral: 200– 400 UI
Correlation between 25-hydroxyvitamin D levels and latitude in Brazilian postmenopausal women: from the Arrozifene Generations Trial	(ARANTES et al., 2013)	1933	Mulheres na pós-meno-pausa com baixa massa óssea, 60– 85 anos	67± 5	Latitude 8°S – 33°S	27,2± 8,4	68,3	Parâmetros não avaliados

Título do Artigo	Citação	n	População	Idade (anos) Média ± DP	Local/ Latitude	25 (OH)D (ng/mL) Média ± DP	Prevalência (%)	Suplementa- ção oral ou ingestão de Vitamina D
Prevalence and correlates of calcium and vitamin D status adequacy in adolescents, adults, and elderly from the Health Survey- São Paulo	(MARTINI et al., 2013)	636	Adolescentes, adultos e idosos	-	São Paulo (SP) 23°S	M: 19,2 H: 16,7	-	Ingestão variou de 108 a 140 UI/d
Prevalence of vitamin D deficiency during the summer and its relationship with sun exposure and skin phototype in elderly men living in the tropics	(CABRAL et al., 2013)	284	Homens	69,4± 6,5	Recife (PE) 8°S	28,0± 13,6	66,7	2,5% tomavam suplementos

Fonte: Próprios autores (2017)

Considerações finais

Com base no exposto, verifica-se que a vitamina D é importante para o funcionamento adequado do corpo humano, especialmente nas populações mais vulneráveis, tais como lactentes e idosos. Para a Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM), em casos de deficiência de vitamina D, as doses de ataque deveriam ser de 7000 UI/dia por períodos de 2 a 3 meses. De modo geral, recomenda-se também que a população não faça o uso indiscriminado da vitamina sem realizar acompanhamento médico adequado para controle periódico dos níveis séricos de vitamina D.

Nos pacientes em que há prescrição de suplementação, o Sistema Único de Saúde (SUS) já fornece a dose de 400 UI Vitamina D em associação com sais de cálcio, embora a maioria dos pacientes não precise de suplementação de cálcio. Indubitavelmente, a suplementação da referida vitamina deveria ser integrada no escopo de programas de Promoção e Prevenção da Saúde e no Tratamento de Doenças da Rede Pública de Saúde de forma a otimizar a relação custo-benefício dos cofres públicos e na qualidade de vida do cidadão.

A importância da temática impulsiona o avanço científico nos campos de investigação da vitamina D e seus efeitos na saúde pública no Brasil, especialmente no que se refere ao crescimento e desenvolvimento corporal humano. Apesar dos achados até o momento, ainda é escassa a quantidade de pesquisas científicas a respeito dos efeitos da vitamina D e de sua suplementação. Futuros estudos abrangendo essa temática poderão produzir importantes desdobramentos aplicados à saúde de populações específicas, tais como crianças, jovens, idosos, pacientes com doenças autoimunes, sedentários, obesos e cardiopatas.

Referências

- ARANOW, C. Vitamin D and the Immune System. **Journal of Investigative Medicine**, v. 59, n. 6, p. 881–886, 2011.
- ARANTES, H. P.; KULAK, C. A. M.; FERNANDES, C. E.; ZERBINI, C.; BANDEIRA, F.; BARBOSA, I. C.; BRENOL, J. C. T.; RUSSO, L. A.; BORBA, V. C.; CHIANG, A. Y.; BILEZIKIAN, J. P.; LAZARETTI-CASTRO, M. Correlation

between 25-hydroxyvitamin D levels and latitude in Brazilian postmenopausal women: from the Arzoxifene generations trial. **Osteoporosis International**, v. 24, n. 10, p. 2707–2712, 2013.

AVOLIO, G.; OLIVEIRA, J. X.; COSTA, C.; ALONSO, G. O papel da vitamina D 3 e da osteocalcina no metabolismo ósseo : uma análise necessária para se otimizar a osseointegração. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v. 26, n. 3, p. 347–350, 2008.

BANDEIRA, F.; GRIZ, L.; FREESE, E.; LIMA, D. C.; THÉ, A. C.; DINIZ, E. T.; MARQUES, T. F.; LUCENA, C. S. Vitamin D deficiency and its relationship with bone mineral density among postmenopausal women living in the tropics. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 54, n. 2, p. 227–232, 2010.

BOLAND, R.; BOLAND, A. R.; RITZ, E.; HASSELBACH, W. Effect of 1, 25 dihydroxycholecalciferol on sarcoplasmic reticulum calcium transport in strontium fed chicks. **Calcified Tissue International**, v. 35, n. 2, p. 190–4, 1983.

BUENO, A. L.; CZEPIELEWSKI, M. A. The importance for growth of dietary intake of calcium and vitamin D. **Jornal de Pediatria**, v. 84, n. 5, p. 386–394, 2008.

CABRAL, M. A.; BORGES, C. N.; MAIA, J. M. C.; AIRES, C. A. M.; BANDEIRA, F. Prevalence of vitamin D deficiency during the summer and its relationship with sun exposure and skin phototype in elderly men living in the tropics. **Clinical Interventions in Aging**, v. 8, p. 1347–1351, 2013.

CURRY, O. B.; BASTEN, J. F.; FRANCIS, M. J. S. R. Calcium uptake by sarcoplasmic reticulum of muscle from vitamin D deficient rabbits. **Nature**, v. 249, p. 83–84, 1974.

GORDON, C. M.; DEPETER, K.C.; FELDMAN, H.A.; GRACE, E.; EMANS, S.J. Prevalence of vitamin D deficiency among healthy adolescents. **Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine**, v. 158, n. 6, p. 531–537, 2004.

HAMILTON, B. Vitamin D and human skeletal muscle. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 20, n. 2, p. 182–90, 2010.

HEANEY, R. P.; DOWELL, M. S.; HALE, C.; BENDICH, A. Calcium absorption varies within the reference range for serum 25-hydroxyvitamin D. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 22, p. 142–146, 2003.

HEANEY, R. P. What is vitamin D insufficiency? And does it matter? **Calcified Tissue International**, v. 92, n. 2, p. 177–183, 2013.

HOLICK, M. F. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers , and cardiovascular disease 1 – 4. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, p. 1678–1688, 2004.

HOLICK, M. F. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. **The Journal of Clinical Investigation**, v.116, n.8, p. 2062-2072, 2006.

HOLICK, M. F.; BINKLEY, N. C.; BISCHOFF-FERRARI, H. A.; GORDON, C. M.; HANLEY, D. A.; HEANEY, R. P.; MURAD, M. H.; WEAVER, C. M. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: An endocrine society clinical practice guideline. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, n. 7, p. 1911-1930, 2011.

HOLICK, M. F.; BINKLEY, N. C.; BISCHOFF-FERRARI, H. A.; GORDON, C. M.; HANLEY, D. A.; HEANEY, R. P.; MURAD, M. H.; WEAVER, C. M. Guidelines for preventing and treating vitamin D deficiency and insufficiency revisited. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 97, n. 4, p. 1153-1158, 2012.

KUCHUK, N. O.; VAN SCHOOR, N. M.; PLUIJM, S. M.; CHINES, A.; LIPS, P. Vitamin D Status, Parathyroid Function, Bone Turnover, and BMD in Postmenopausal Women With Osteoporosis: Global Perspective. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 24, n. 4, p. 693-701, 2009.

LAI, J. K. C.; LUCAS, R. M.; CLEMENTS, M. S.; HARRISON, S. L.; BANKS, E. Assessing vitamin D status: Pitfalls for the unwary. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 54, n. 8, p. 1062-1071, 2010.

LOPES, J. B.; DANILEVICIUS, C.F.; TAKAYAMA, L.; CAPARBO, V. F.; SCAZUFCA, M.; BONFÁ, E.; PEREIRA, R. M. R. Vitamin D insufficiency: A risk factor to vertebral fractures in community-dwelling elderly women. **Maturitas**, v. 64, n. 4, p. 218-222, 2009.

MAEDA, S. S.; KUNII, I. S.; HAYASHI, L. F.; LAZARETTI-CASTRO, M. Increases in summer serum 25-hydroxyvitamin D (25OHD) concentrations in elderly subjects in Sao Paulo, Brazil vary with age, gender and ethnicity. **BMC Endocrine Disorders**, v. 10, n. 1, p. 12, 2010.

MAEDA, S. S.; SARAIVA, G. L.; KUNII, I. S.; HAYASHI, L. F.; CENDOROGLO, M. S.; RAMOS, L. R.; LAZARETTI-CASTRO, M. Factors affecting vitamin D status in different populations in the city of São Paulo, Brazil: the São Paulo vitamin D Evaluation Study (SPADES). **BMC Endocrine Disorders**, v. 13, p. 1-8, 2013.

MAEDA, S. S.; BORBA, V. Z. C.; CAMARGO, M. B. R.; SILVA, D. M. W.; BORGES, J. L. C.; BANDEIRA, F.; CASTRO, M. L. Recomendações da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) para o diagnóstico e tratamento da hipovitaminose D. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, n. 5, p. 411-433, 2014.

MARQUES, C. D. L.; DANTAS, A. T.; FRAGOSO, T. S.; DUARTE, A. L. B. P. A importância dos níveis de vitamina D nas doenças autoimunes. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 1, p. 67–80, 2010.

MARTINI, L. A. VERLY, E.; MARCHIONI, D. M. L.; FISBERG, R. M. Prevalence and correlates of calcium and vitamin D status adequacy in adolescents, adults, and elderly from the Health Survey-São Paulo. **Nutrition**, v. 29, n. 6, p. 845–850, 2013.

MCDUFFIE, J. R.; CALIS, K. A.; BOOTH, S. L.; UWAIFO, G. I.; YANOVSKI, J. A. Effects of orlistat on fat-soluble vitamins in obese adolescents. **Pharmacotherapy**, v. 22, n. 7, p. 814–22, 2002.

NEVES, J. P. R.; SILVA, A. S.; MORAIS, L. C. S. L.; DINIZ, A. S.; COSTA, M. J. C.; ASCIUTTI, L. S. R.; GONÇALVES, M. C. R. Concentrações de 25-hidroxivitamina D e níveis pressóricos em idosos hipertensos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 56, n. 7, p. 415–422, 2012.

NORMAN, A. W.; BOUILLON, R. Vitamin D nutritional policy needs a vision for the future. **Experimental Biology and Medicine**, v. 235, n. 9, p. 1034–1045, 2010.

ONG, L.; SAW, S.; BTE, N.; TENG, K. Clinica Chimica Acta Current 25-hydroxyvitamin D assays : Do they pass the test ? Clinica Chimica Acta, v. 413, n. 13–14, p. 1127–1134, 2012.

PEDROSA, M. A. C. C. Papel da Vitamina D na Função Neuro-Muscular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 49, n. 4, p. 495–502, 2005.

POLLY, P.; TAN, T. C. Role of Vitamin D in Skeletal Muscle Function. **The Endocrine Society**, v. 7, p. 434–447, 1986.

REID, I. R.; AVENELL, A. Why the IOM Recommendations for Vitamin D Are Deficient. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 3, p. 455–457, 2011.

REJNMARK, L. Effects of vitamin d on muscle function and performance: a review of evidence from randomized controlled trials. **Therapeutic Advances in Chronic Disease**, v. 2, n. 1, p. 25–37, 2011.

ROVNER, A. J.; STALLINGS, V. A.; KAWCHAK, D. A.; SCHALL, J. I.; OHENE-FREMPONG, K.; ZEMEL, B. S. High Risk of Vitamin D Deficiency in Children with Sick Cell Disease. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 108, n. 9, p. 1512–1516, 2008.

RUSSO, L. A. T.; GREGÓRIO, L. H.; LACATIVA, P. G. S.; MARINHEIRO, L. P. F. Concentração plasmática de 25 hidroxivitamina D em mulheres na pós-menopausa com baixa densidade mineral óssea. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 9, p. 1079–1087, 2009.

SANTOS, B. R.; MASCARENHAS, L. P. G.; SATLER, F.; BOGUSZEWSKI, M. C. S.; SPRITZER, P. M. Vitamin D deficiency in girls from South Brazil: a cross-sectional study on prevalence and association with vitamin D receptor gene variants. **BMC pediatrics**, v. 12, n. 62, p. 1–7, 2012.

SARAIVA, G. L.; CENDOROGLO, M. S.; RAMOS, L. R.; ARAÚJO, L. M. Q.; VIEIRA, J. G. H.; MAEDA, S. S.; BORBA, V. Z.C.; KUNII, I.; HAYASHI, L. F.; LAZARETTI-CASTRO, M. Prevalência da deficiência, insuficiência de vitamina D e hiperparatireoidismo secundário em idosos institucionalizados e moradores na comunidade da cidade de São Paulo, Brasil. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, n. 3, p. 437–442, 2007.

SILVA, B. C. C.; CAMARGOS, B. M.; FUJII, J. B.; DIAS, E. P.; SOARES, M. M. S. Prevalência de deficiência e insuficiência de vitamina D e sua correlação com PTH, marcadores de remodelação óssea e densidade mineral óssea, em pacientes ambulatoriais. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 3, p. 482–488, 2008.

GRÜDTNER, V. S.; WEINGRILL, P.; FERNANDES, A. L. Absorption aspects of calcium and vitamin D metabolism. **Revista Brasileira Reumatol**, v. 37, n. 3, p. 143–151, 1997.

UNGER, M. D.; CUPPARI, L.; TITAN, S. M.; MAGALHÃES, M. C. T.; SASSAKI, A. L.; DOS REIS, L. M.; JORGETTI, V.; MOYSÉS, R. M. A. Vitamin D status in a sunny country: Where has the sun gone? **Clinical Nutrition**, v. 29, n. 6, p. 784–788, 2010.

VIETH, R.; BISCHOFF-FERRARI, H.; BOUCHER, B. J. The urgent need to recommend an intake of vitamin D that is effective. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, n. 3, p. 649–50, 2007.

WACKER, M.; HOLIACK, M. F. Vitamin D-effects on skeletal and extraskeletal health and the need for supplementation. **Nutrients**, v. 5, n. 1, p. 111–148, 2013. pesquisas podem levar a aplicações práticas preciosas na atenção à saúde da gestante e da criança em desenvolvimento e também suscitar a adoção de políticas públicas que envolvam a grande população (FORMIGA; PEDRAZZANI; TUDELLA, 2010).

12.

PRODUTOS NÃO ALOPÁTICOS APLICADOS À SAÚDE: A PERSPECTIVA DA PSICOLOGIA NA INTERVENÇÃO EM ONCOLOGIA

ISABELA JUBÉ WASTOWSKI
DANIELA SACRAMENTO ZANINI
GRAZIELE LOPES TELES

O conceito de saúde-doença passou por diversas modificações ao longo da história, em função das condições histórico-culturais e da organização social da época, além dos diferentes aspectos privilegiados em cada período histórico. Desde a medicina pré-histórica e os tratamentos à base de trepanação (perfuração do crânio que tinha como objetivo liberar os espíritos causadores do mal estar no indivíduo) até a atualidade, muito se desenvolveu no campo da saúde e da compreensão da relação entre os estados de saúde-doença (OGDEN, 1999).

Ao longo da história da humanidade, alguns aspectos contribuíram significativamente para a mudança de paradigma na compreensão do processo de saúde-doença. Entre eles, podem-se citar as medidas de saneamento básico e políticas de saúde pública realizados na Grécia e em Roma, por volta dos séculos V e I a.C.; a postulação realizada por Hipócrates (460 a 377 a.C) de que a doença é um fenômeno natural (e, portanto, não místico) e suas causas, tratamento e prevenção podem ser conhecidos e estudados; a comparação do corpo humano a uma máquina, proposição da separação de mente e corpo e atribuição de leis causais diferenciadas para ambos, realizada por René Descartes (1596-1650) (STRAUB, 2005).

Em conjunto, essas mudanças sociais propiciaram significativos avanços na medicina, na primeira metade do século XX, e contribuiu para o nascimento do **modelo biomédico** de saúde (STRAUB, 2005). Este modelo sustenta que: 1 – as doenças sempre podem ser descritas em níveis biológicos, sendo causadas por fatores externos aos indivíduos (tais como bactérias, vírus ou desequilíbrios bioquímicos), ou por predisposições genéticas; 2 – o indivíduo é vítima dessas forças externas que provocam mudanças biológicas; 3 – cabe ao profissional da área da saúde o tratamento medicamentoso, cirúrgico ou outro correspondente que devolva o estado de saúde do indivíduo (OGDEN, 1999). Como consequência, pode-se concluir que, a partir desse modelo, saúde e doença são dois pólos de uma mesma moeda em que, ou se está saudável ou se está doente.

No modelo biomédico, prevalece a concepção cartesiana de mente-corpo como instâncias separadas. Na prática, entendia-se que determinados estados de doença poderiam ter consequências ou influenciar os aspectos psicológicos, mas não o inverso, ou seja, que aspectos psicossociais ou emocionais influenciassem fisiologicamente o indivíduo (OGDEN, 1999). Tratava-se, portanto, de uma relação unilateral ou unidirecional.

Contudo, com o contínuo avanço da ciência, de técnicas de neuroimagem, o desenvolvimento social e o surgimento de patologias até então não descritas, começou-se, no século XX, a se questionar o papel dos patógenos como únicos determinantes das doenças. Aliado a isso, alguns questionamentos quanto à própria definição da saúde da Organização Mundial de Saúde, por meio de uma descrição negativa (saúde era considerada como a ausência de doença), impulsionou uma mudança de paradigma. Dessa forma, em 1958, a Organização Mundial de Saúde postula a saúde como “o completo bem-estar biopsicossocial” (PERESTRELO, 1974), inaugurando o **modelo biopsicossocial**.

O modelo biopsicossocial, diferentemente do modelo anterior (biomédico), amplia a concepção de saúde e propõe que, para se compreenderem os processos de saúde-doença, é necessário analisar ao menos três dimensões da esfera humana: o aspecto biológico, o psicoló-

gico e o social. Essas esferas são determinantes para o desenvolvimento de saúde-doença, além de influenciarem na vivência deste processo, na resposta ao tratamento, nas complicações associadas e etc.

Outro aspecto que cabe destacar é que essa definição também evidencia que saúde é um conceito utópico e difícil (ou mesmo impossível) de ser atingido, uma vez que não se consegue chegar a um completo bem-estar biopsicossocial. Dessa forma, pode-se pensar que os estados de saúde-doença são, em realidade, dois extremos de um *continuum* (e não mais dois pólos opostos), em que o que se busca é pender para o lado da saúde, mesmo sabendo que o completo bem-estar não é atingível.

Por último, cabe ressaltar que a definição de saúde da OMS, em 1958, introduz a ideia da avaliação que o indivíduo realiza de seus estados internos e externos, sejam eles em nível biológico, psicológico ou social. Dessa forma, essa definição insere a ideia de uma avaliação subjetiva e centrada no paciente e no processo de saúde-doença e chama a atenção dos atuais profissionais da área de saúde para a importância da percepção do indivíduo sobre si mesmo e sobre o que o cerca, tornando-se uma definição mais apropriada para explicação de problemas de saúde relacionados a aspectos psicossociais ou aspectos biológicos em interação com aspectos psicossociais (STRAUB; BERGER, 2004).

Algumas doenças descrevem claramente essa interação biopsicossocial. A Fibromialgia pode ser descrita como um claro exemplo disso. Apesar da existência de marcadores biológicos relacionados a seu diagnóstico e a possibilidade de tratamento farmacológico, sua compreensão passa, necessariamente, pela avaliação dos aspectos psicossociais envolvidos e, mais especificamente, pela avaliação subjetiva do indivíduo de seus estados alterados, motivo pelo qual seu diagnóstico torna-se complexo e, muitas vezes, discutível dentro da perspectiva médica.

Por outro lado, geralmente, a apresentação sintomatológica relaciona-se fortemente às atividades desenvolvidas pelos indivíduos, seus traços de personalidade e características pessoais, o meio social que está inserido, seu trabalho, etc., e não apenas à predisposição genética.

Por fim, pode-se dizer que, a partir dessa definição de saúde mais positiva e baseada na avaliação do bem-estar do indivíduo, houve uma mudança do enfoque dado aos processos e intervenção em saúde. Em termos gerais, podemos dizer que avanços significativos foram realizados em termos do descobrimento do que adoecce os indivíduos, contudo, pouco é sabido sobre os aspectos que mantêm os indivíduos saudáveis mesmo quando confrontados com fatores de riscos. Dessa forma, estudos atuais buscam ressaltar menos os aspectos deficitários ou estados alterados para valorizar os aspectos saudáveis do indivíduo e a compreensão de como desenvolvê-los (ALDWIN, 1987; KAZDIN et al., 1997). Tendo em vista que a ausência total de doença, assim como o estado de saúde total, é impossível, resta, aos profissionais de saúde, buscar a potencialização dos aspectos saudáveis dos indivíduos em detrimento dos aspectos disfuncionais.

Por essas e outras questões, a definição de Saúde da OMS e o modelo biopsicossocial representam uma quebra de paradigma do conceito de saúde e inauguram uma nova forma de se pensar em saúde que vai além de meros aspectos fisiológicos. Além disso, introduz a ideia de que: 1 – as doenças são resultado da interação do indivíduo com o meio e, portanto, são fruto de um desequilíbrio biopsicossocial; 2 – existe uma participação ativa do indivíduo no seu processo de saúde-doença assim como em todas as etapas de seu tratamento; 3 – cabe à equipe multiprofissional o tratamento em todas as esferas do indivíduo (biopsicossocial) (OGDEN, 1999).

É nessa perspectiva que o presente capítulo pretende discutir o impacto psicológico sobre o desenvolvimento do câncer, considerando-se a perspectiva da neuroendocrinoimunologia, bem como apresentar possibilidade de intervenção não-alopática, que vai além da atuação fisiológica, englobando o desenvolvimento da saúde nas esferas psicossociais, conforme preconizado pela OMS desde 1958.

Fatores psicossociais e o câncer

O câncer caracteriza-se como um grupo heterogêneo de doenças apresentando distintas etiologias e patofisiologia. Geralmente, é classifi-

cado em decorrência do tecido onde originou-se. Carcinomas são originários de células epiteliais; sarcomas são oriundos de tecido conectivo e linfomas e leucemias afetam células da resposta imune e células formadoras de leucócitos e células sanguíneas, respectivamente (HANAHAH; WEINBERG, 2011).

A associação entre fatores psicossociais e o desenvolvimento de tumores malignos tem sido discutida desde o século II. Nessa época, Claudius Galeno, médico grego, propôs que mulheres deprimidas eram mais propensas a desenvolver cânceres. Atualmente, vários estudos têm avaliado o impacto de fatores psicossociais, como a ansiedade, o estresse, a raiva e a repressão de emoções sobre a carcinogênese e evolução clínica de diversos cânceres, incluindo o pulmonar, colorretal, do aparelho reprodutor feminino, próstata, estômago, fígado, cabeça e pescoço, sanguíneos e cerebrais (ANDERSEN et al., 1998; ANTONI et al., 2009; LUTGENDORF et al., 2005; NELSON et al., 2008; SEPTON et al., 2013; THORNTON et al., 2007).

Nesses estudos, observou-se que a maior suscetibilidade para o desenvolvimento de um tumor estaria associada a falhas na resposta imune, que poderiam ser desencadeadas por fatores psicossociais. Gold et al. (2003) demonstraram que mulheres com risco genético aumentado para o câncer apresentavam problemas na resposta imune e anormalidades da resposta endócrina ao estresse. Levy e colaboradores (1987, 1985, 1990) documentaram, em estudos clínicos, a associação entre depressão e apoio social, à atividade de células *Natural Killer* (NK), um importante tipo celular da resposta imune contra tumores. Outros pesquisadores observaram que o estresse e o isolamento social estão associados à anormalidade da resposta imune contra diversos tumores, dentre eles, de mama, ovário e cervical (SEPTON et al., 2013).

Os fatores psicossociais podem influenciar, não apenas o processo de carcinogênese, mas também a evolução clínica da doença. Estudos envolvendo pacientes com cânceres de células do sistema imune demonstraram que o estado depressivo, o estresse psicológico, a falta de apoio social e a falta de qualidade de vida estão associados à menor sobrevida (LAMKIN; SLAVICH, 2016).

No entanto, os mecanismos pelos quais os fatores psicossociais atuam sobre a carcinogênese e a evolução clínica de diferentes tipos de tumores não estão esclarecidos. Todavia, há um consenso sugerindo que, pelo menos em parte, o impacto desses fatores seria decorrente da influência de tais fatores sobre o sistema nervoso autônomo, o sistema endócrino e o sistema imune (LISSONI et al., 2001).

A área do conhecimento que busca compreender as diversas conexões entre o sistema neurológico, endócrino e imunológico e, dessa forma, descrever como as emoções e comportamentos podem influenciar no desenvolvimento de doenças denomina-se Psiconeuroendocrinoinmunologia (MARQUES-DEAK; STERNBERG, 2004).

A relação entre a imunossupressão e o câncer foi demonstrada em diversos estudos clínicos e experimentais. No entanto, a deficiência da resposta imune parece não estar associada a danos primários do sistema imune, mas sim à alteração da regulação psiconeuroendócrina da resposta antitumoral (LISSONI et al., 2001).

A carcinogênese sob a perspectiva da psiconeuroendocrinoinmunologia

O Eixo Hipotálamo-Pituitário-Adrenal (HPA)

O eixo HPA e os corticoides têm função central na resposta adaptativa aos diversos tipos de estresse. Esse eixo é formado por três componentes: o núcleo paraventricular do Hipotálamo (NPV), a glândula pituitária e o córtex das glândulas adrenais (NADER et al., 2010).

O NPV é o componente central e contém neurônios que secretam o Hormônio Liberador de Corticotropina (CRH) e arginina-vasopressina (AVP). Esses hormônios são liberados no sistema porta da pituitária e estimulam a secreção do Hormônio Adrenocorticotrópico (ACTH) por essa glândula. O ACTH liberado age sobre a *zona fasciculata* do córtex adrenal, estimulando a produção e secreção de glicocorticoides (CHROUSOS, 2009).

Em um estado basal, o eixo HPA apresenta atividade circadiana que é controlada pelo Núcleo Supraquiasmático do Hipotálamo. Essa atividade é caracterizada pela típica flutuação diurna de corticóides (NICOLAIDES et al., 2010). Quando exposto a estressores, o eixo HPA perde o controle circadiano regular e secreta grande quantidade de corticóides para ajustar a resposta do organismo ao estresse. Após a resposta, o eixo HPA retorna à atividade e ciclos normais (CHROUSOS, 2009).

A resposta neuroimune e a carcinogênese

Em decorrência do estresse excessivo ou persistente, o eixo HPA será continuamente ativado e grande quantidade de corticóides será liberada, causando vários problemas ao Sistema Nervoso Central (SNC) e aos órgãos periféricos. Receptores para glicocorticóides estão presentes em praticamente todos os órgãos e tecidos, incluindo o SNC.

Os efeitos do estresse sobre células do sistema imune já observados incluem o decréscimo da função de células T e células NK e redução da capacidade de fagocitose de macrófagos. As alterações provocadas nesses tipos celulares prejudicam a resposta anti-tumoral (KRONFOL; REMICK, 2000).

Os glicocorticóides, a norepinefrina e a epinefrina alteram, ainda, a síntese e a liberação de diversas citocinas, dentre elas, a IL-12. Essa citocina é importante para estimular a resposta imune do perfil Th1, ou resposta celular citotóxica, que é crucial no combate a células tumorais (KIM; MAES, 2003).

Além dos efeitos dos glicocorticóides, uma segunda via de regulação neuroendócrina do sistema imune durante o estresse é através da liberação de catecolaminas da medula adrenal ou terminações nervosas do sistema nervoso autônomo. Os principais órgãos imunes (timo, baço e linfonodos) são abundantemente inervados por fibras nervosas autônomas e linfócitos possuem receptores β -adrenérgicos (FELTEN, 1993). A ativação do sistema nervoso simpático causa alterações no tráfego de leucócitos (SCHEDLOWSKI, 1996).

Os corticoides adrenais, juntamente com as catecolaminas, aumentam ainda a disponibilidade de glicose, através da gliconeogênese, glicogenólise e lipólise. As alterações metabólicas induzidas pelas corticoides aumentam também o estresse oxidativo com aumento da produção de radicais livres (ROS) (GROENEWEG et al., 2011). Além disso, os corticoides estimulam a angiogênese, ou seja, a formação de novos vasos, favorecendo, dessa forma, o desenvolvimento de tumores, pois aumenta o aporte de sangue e nutrientes para as células tumorais (BAUER, 2004).

Falhas no reparo do DNA e bloqueio da apoptose, processos que favorecem a carcinogênese, também têm sido associadas ao estresse (BAUER, 2004).

Intervenção terapêutica psicológica no câncer

O maior potencial dos estudos sobre a influência dos fatores psicossociais sobre o surgimento do câncer é o desenvolvimento de intervenções que minimizem a suscetibilidade à doença e melhorem a evolução clínica, caso já esteja instalada.

Diversos estudos têm confirmado que a atitude mental pode influir sensivelmente na evolução de um tumor. Uma pesquisa considerada marco na temática foi realizada em 1970. Pacientes com câncer de mama que receberam suporte psicológico semanal por 12 meses apresentaram aumento de duas vezes na sobrevida. Em outro estudo, pacientes com melanoma que participaram de terapia de grupo por seis semanas apresentaram redução do distresse psicológico e alterações imunológicas favoráveis ao combate do tumor. Após seis anos, a intervenção mostrou-se associada ao aumento da sobrevida (LAMKIN; SLAVICH, 2016).

Os tratamentos psicológicos, em pacientes oncológicos, têm demonstrado ser eficiente a intervenção para reduzir o distresse e a depressão, o tempo de hospitalização, atenuar os efeitos colaterais da quimioterapia, melhorar a resposta imune e a qualidade de vida.

Relato de intervenção: o jogo como proposta de intervenção psicológica em oncologia pediátrica

A atuação do psicólogo hospitalar com pacientes oncológicos visa possibilitar assistência psicológica, suporte emocional, orientação e acesso a informações (GASPAR, 2011). Perina (2002) propõe que o atendimento psicológico com crianças hospitalizadas visa compreender o seu mundo nos seus aspectos emocionais e sociais, por meio da utilização de instrumentos lúdicos que possibilitarão um aumento da expressão, seja pelo desenhar, pelo falar e pelo brincar. É através da linguagem simbólica que o psicólogo vai compreender os aspectos mais profundos da criança, quanto às suas emoções, expectativas, sonhos, frustrações, sentimentos de culpa, dentre outras questões relevantes para a sua realidade naquele momento (RIBEIRO; ANGELO, 2005).

Nesse sentido, o estudo teve como objetivo propor uma alternativa de intervenção psicológica por meio do jogo “Imagem e Ação”, entre crianças de 6 a 10 anos, adaptado ao contexto hospitalar. Mais especificamente, pretendeu-se avaliar esse modelo de intervenção e verificar como a criança expressa, através do jogo, seus aspectos físicos, emocionais e sociais.

Foi realizada uma pesquisa exploratória, de caráter descritivo e transversal, com abordagem qualitativa. Participaram quatro crianças em atendimento no serviço de pediatria do Hospital Araújo Jorge, no mês de agosto de 2016. As crianças estavam internadas, apresentavam diagnóstico de Leucemia Linfóide Aguda de células “B”. Nesse estudo, elas receberam nomes de heróis, que foram escolhidos por elas ou que se enquadravam com a sua personalidade.

Como instrumento de intervenção psicológica, foi utilizado o jogo “Imagem e Ação” adaptado ao contexto da hospitalização e ao tratamento do câncer. Na adaptação do jogo foram utilizados tabuleiro, uma ampulheta, 50 cartas desenvolvidas especificamente para esta pesquisa, folhas A4, lápis de escrever, borracha e o espaço físico da sala de psicologia da Pediatria.

Após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/ ACCG, foram contatados responsáveis e as crianças, a fim de realizar o convite para participação na pesquisa. Foi realizada uma entrevista com os responsáveis, com o objetivo de coleta de dados quanto à história de vida e, no segundo encontro, foi proposto o jogo “Imagem e Ação” com um grupo de duas crianças.

Os resultados são sumarizados e discutidos a seguir:

Descrição do jogo Imagem e Ação

O jogo foi proposto entre crianças de 6 a 10 anos, adaptado ao contexto hospitalar e de tratamento oncológico, com o objetivo de possibilitar um atendimento psicológico diferenciado entre um grupo de duas crianças. Cada criança pertencia a equipes diferentes, no entanto, deveriam realizar as mímicas ou desenhos para que a outra acertasse, andando a quantidade de casas que a carta indicasse. Nos dois grupos, a cada palavra que era sorteada, o participante emitia um comentário ou a pesquisadora propunha um espaço acolhedor para as crianças expressarem o que elas tinham de experiência e de informação relacionada àquela temática.

Quando pertinente, era lembrado e relacionado com a rotina hospitalar. Nos dois grupos, foi possível observar uma competição entre os participantes, principalmente os do sexo masculino, que demonstravam uma reação de frustração quando perdiam alguma rodada. Tal atitude que corrobora o que Chateau (1987) propõe quanto aos jogos com meninos a partir de 7 anos: predominam jogos de valentia e de competição, em que cada um deve demonstrar o seu valor.

Temáticas expressadas durante o jogo

a) Aspectos físicos

Um dos objetivos dos procedimentos para tratamento é a cura. Segundo a Mulher Maravilha, “Curar é quando a gente machuca a pessoa e ajuda a pessoa a sarar o machucado. Quando a gente tá com uma doença, a gente vem pra um hospital pra ser curada”. Percebeu-se,

aqui, a associação da cura com a passagem por algum procedimento que envolvesse dor, visto que a definição de curar passou antes pelo ato de machucar. Dessa forma, Ferro (1995) propõe que, através da expressão da criança pelo jogo, é possível fazer com que ela elabore angústias ou conteúdos difíceis, como no caso de Mulher Maravilha, que começa a integrar o conceito de cura como a obtenção do bem-estar através de uma intervenção dolorosa.

Os procedimentos invasivos foram expressos durante o jogo através da fala: “Quando eu tomo injeção, dói, eu choro” (Supergirl), “Quando eu tomo, eu não sinto muita dor, não” (Dead Pool). Esses procedimentos foram falados como situações difíceis, apesar de cada pessoa apresentar uma reação emocional diferente, corroborando a preocupação de Straub, (2005) que diz que os procedimentos podem criar um ambiente de hospitalização difícil de conviver, uma vez que há a perda de controle pelo próprio corpo quando necessitam ser submetidos a tais condições.

Em relação aos efeitos colaterais, uma das crianças relatou: “Tomei ontem plaqueta, por isso que eu tô com febre” (Dead Pool), o que corrobora Gaspar (2009), que diz que a utilização de quimioterápicos pode provocar efeitos colaterais, como o caso de Dead Pool, que teve de tomar uma bolsa de plaqueta para repor a quantidade de células no sangue.

b) Aspectos emocionais

Quanto às estratégias de enfrentamento, Thor compartilhou com a Mulher Maravilha qual era a estratégia que ele utilizava para não punccionar a mão direita, que era utilizada para realizar suas atividades. Ele relatou: “Quando foi pôr a agulha, eu falei que tava doendo, mas não tava, só pra colocar na outra”. Pode-se perceber que a estratégia de enfrentamento que ele utilizou foi focada na razão e na emoção, que Simonetti (2004) descreve como utilização de ideias e emoções para a expressão de sentimento diante do desconforto emocional e da situação estressante.

No contexto de manifestações emocionais, a Mulher Maravilha relatou: “Lembra hospital? Já chega de hospital. Tô cansada do hospital,

quero ir embora”. Dead Pool também expressou: “Quando eu brigo com meus irmãos, eu fico com raiva. É muito ruim ficar com raiva”. Dessa forma, as crianças, ao verbalizarem, na situação do jogo, assuntos relacionados a situações e sentimentos difíceis, acabam compartilhando e transformando angústias (Ferro, 1995).

As fantasias eram relacionadas a jogos, filmes e desenhos animados, como nas falas: “Eu queria ser a Mulher Maravilha” (Mulher Maravilha), “Eu queria ser o Thor, porque ele é o rei do trovão, aí eu podia voar, voar e voar” (Thor). Dessa maneira, Ribeiro e Angelo (2005) propõem que cabe ao psicólogo compreender a linguagem simbólica de cada herói para compreender os aspectos mais profundos da criança.

c) Aspectos sociais

As crianças descreveram o contexto hospitalar, remetendo a internação, profissionais que tinham contato e espaço físico que conviviam, como pode se observar nas verbalizações: “Essa profissão tem aqui no hospital” (Dead Pool), “O palhaço que vem sábado é chato porque ele vem só pra cantar” (Dead Pool) e “Lugar aqui no hospital... tem os quartos, tem a salinha, tem o posto, recepção, cadeira, consulta, tem o elevador” (Thor). Dessa forma, as exposições das temáticas relacionadas à rotina hospitalar visaram compreender o mundo de cada criança em seus aspectos emocionais e sociais (PERINA, 2002). Pelo tempo em que se encontravam em tratamento era importante que descrevessem e se apossassem mais e mais do universo hospitalar.

Durante o jogo também foi falado o quanto as pessoas significativas servem como suporte emocional em situações difíceis na hospitalização, principalmente em intervenções como a injeção ou a punção venosa “Quando eu vou tomar injeção, eu gosto que a minha mãe esteja comigo” (Super-Girl). Confirmando a teoria de Straub (2005) que diz que cada indivíduo lida de maneira diferente com situações aversivas de acordo com os fatores biológicos, sociais e psicológicos como a presença do apoio emocional da família sendo utilizado como estratégia de enfrentamento.

Avaliação do modelo de intervenção

Pode-se verificar que a utilização do Jogo é uma possibilidade de intervenção eficaz para o psicólogo hospitalar, uma vez que se trabalhou conteúdos relacionados a história de vida e a realidade dos participantes, proporcionando um ambiente de escuta para exposição de aspectos sociais, físicos, emocionais e biológicos. Além de ser uma ferramenta para amenizar a dor, ansiedade e angústia que a criança estivesse passando durante a internação e contribuindo para a construção e fortalecimento dos vínculos entre os participantes e a pesquisadora. O que condiz com a teoria de Perina (2002) em que o psicólogo vai propiciar um ambiente de escuta, de assistência psicológica e suporte emocional, por meio da utilização de instrumentos lúdicos como o jogo, aumentando a expressão de conteúdos significativos por meio do simbolismo do brincar.

Conclusões

Os cânceres desenvolvem-se sob a influência de fatores presentes no microambiente, mas também em todo o contexto ambiental ligado ao paciente. A maioria dos modelos sobre mortalidade e sobrevida livre de doença considera apenas as características do tumor e a exposição aos tratamentos como indicadores (MERLETTI et al., 2011; WARD et al., 2004; WEI et al., 2010). Colditz e Wei (2012) afirmam que a projeção tradicional acerca da mortalidade em câncer falha em quantificar adequadamente as interações múltiplas entre aspectos fisiológicos, psíquicos, sociais e ambientais e fatores comportamentais. Modelos mais dinâmicos que captem a exposição a diversos tipos de riscos, não puramente fisiológicos, e a fatores protetivos, prometem melhorar o entendimento das diferenças nos riscos ao desenvolvimento de tumores e da sobrevida em diversas populações e individualmente. Além disso, pesquisas que avaliem a perspectiva biopsicossocial da doença tumoral têm fundamentado o desenvolvimento e a aplicação de intervenções não-alopáticas complementares que favoreçam a prevenção, o tratamento e a melhoria da qualidade de vida de pacientes oncológicos (EVANS; KIM, 2010).

Referências

- ALDWIN, C.; REVENSON, T. Does coping help? A Reexamination of the relation between coping and mental health. **Journal of Personality and Social Psychology**, v. 53, p. 337-348, 1987.
- ANDERSEN, B. L.; FARRAR, W. B.; GOLDEN-KREUTZ, D.; KUTZ, L. A.; MACCALLUM, R.; COURTNEY, M. E.; GLASER, R. Stress and immune responses after surgical treatment for regional breast cancer. **Journal of National Cancer Institute**, v. 90, p. 30-36, 1998.
- ANTONI, M.H. Psychoneuroendocrinology and psychoneuroimmunology of cancer: plausible mechanisms worth pursuing? **Brain Behavior and Immunity**, v. 17 (Supl.1), p. S84–S91, 2003.
- BAUER, M. E. How do the psychologic factors have influence on the arise and cancer progression? **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**, v. 1, n. 1, p. 33-40, 2004.
- BAUER, S. M. Psychoneuroimmunology and cancer: an integrated review. **Journal of Advanced Nursing**, v. 19, p. 1114-1120, 1994.
- CHÂTEAU, J. Os jogos, as idades e os caracteres. In: CHÂTEAUS, J. **O jogo e a criança**. São Paulo: Summus, 1987, p. 96-106.
- CHROUSOS, G. P. Stress and disorders of the stress system. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 5, p. 374-381, 2009.
- COLDITZ, G. A.; WEI, E. K. Preventability of cancer: the relative contributions of biologic and social and physical environmental determinants of cancer mortality. **Annual Review of Public Health**, v. 33, p. 137-156, 2012.
- EVANS, G. W.; KIM, P. Multiple risk exposure as a potential explanatory mechanism for the socioeconomic status–health gradient. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1186, p. 174-189, 2010.
- FELTEN, D. Direct innervation of lymphoid organs: substrate for neurotransmitter signaling of cells of the immune system. **Neuropsychobiology**, v. 28, p. 326-334, 1993.
- FERRO, A. O Jogo. In: FERRO, A. **A técnica na psicanálise infantil: a criança e o analista da relação ao campo emocional**. Rio de Janeiro: Imago, 1995, p.77-89.
- GASPAR, K. C. Psicologia Hospitalar e a Oncologia. In: ANGERAMI-CAMON, V. A. (Org.). **Psicologia da saúde: um novo significado para a prática clínica**. São Paulo: Cengage Learning, 2011. p. 79-126.

- GOLD, S.M.; ZAKOWSKI, S.G.; VALDIMARSDOTTIR, H.B.; BOVBJERG, D.H. Stronger endocrine responses after brief psychological stress in women at familial risk of breast cancer. **Psychoneuroendocrinology**, v. 28, p. 584-593, 2003.
- GROENEWEG, F. L.; KARST, H., DE KLOET, E. R.; AND JOELS, M. Rapid non- genomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response. **Journal of Endocrinology**, v. 209, p. 153-167, 2011.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674, 2011.
- KAZDIN, A. E.; KRAEMER, H. C.; KESSLER, R. C.; KUPFER, D. J.; OFFORD, D. R. Contributions of risk-factor research to developmental psychopathology. **Clinical Psychology Review**, v. 17, n. 4, p. 375-406, 1997.
- KIM, Y.K.; MAES, M. The role of the cytokine network in psychological stress. **Acta Neuropsychiatrica**, v. 15, p. 148-55, 2003.
- KRONFOL, Z.; REMICK, D. Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry. **The American Journal of Psychiatry**, v. 157, p. 683-94, 2000.
- LAMKIN, D. M.; SLAVICH, G. M. Psychosocial factors and cancer. In: MILLER, H. L. (Ed.). **The SAGE encyclopedia of theory in psychology**. Thousand Oaks, CA: Sage Publications, 2016. p. 768-770. Disponível em <www.uclastresslab.org>; acesso em: 10/01/2017.
- LEVY, S. M.; HERBERMAN, R. B.; MALUISH, A. M.; SCHLIEN, B.; LIPPMAN, M. Prognostic risk assessment in primary breast cancer by behavioral and immunological parameters. **Health Psychology**, v. 4, p. 99-113, 1985.
- LEVY, S. M.; HERBERMAN, R. B.; WHITESIDE, T.; SANZO, K.; LEE, J.; KIRKWOOD, J. Perceived social support and tumor estrogen/progesterone receptor status as predictors of natural killer cell activity in breast cancer patients. **Psychosomatic Medicine**, v. 52, p.73-85, 1990.
- LEVY, S.; HERBERMAN, R.; LIPPMAN, M.; D'ANGELO, T. Correlation of stress factors with sustained depression of natural killer cell activity and predicted prognosis in patients with breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 5, p. 348-353, 1987.
- LISSONI, P.; CANGEMI, P.; PIRATO, D.; ROSELLI, M.G.; ROVELLI, F.; BRIVIO, F.; MALUGANI, F.; MAESTRONI, G. J. M.; CONTI, A.; LAUDON, M.; MALYSHEVA, O.; GIANI, L. A review on cancer-psychospiritual interactions. **Neuroendocrinology Letters**, v. 22, p. 175-180, 2001.
- LUTGENDORF, S. K.; SOOD, A. K.; ANDERSON, B.; MCGINN, S.; MAISERI, H.; DAO, M.; SOROSKY, J. I.; DEGEEST, K.; RITCHIE, J.; LUBAROFF, D. M.

Social support, distress, and natural killer cell activity in ovarian cancer patients. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, p. 7106-7113, 2005.

MARQUES-DEAK, A.; STERNBERG, E. Psiconeuroimunologia. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 26, n. 3, p. 143-4, 2004.

MERLETTI, F.; GALASSI, C.; SPADEA, T. The socioeconomic determinants of cancer. **Environmental Health**, v. 10, p. 1-7, 2011.

NADER, N.; CHROUSOS, G. P.; KINO, T. Interactions of the circadian CLOCK system and the HPA axis. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 21, p. 277-286, 2010.

NELSON, E. L.; WENZEL, L. B.; OSANN, K.; DOGAN-ATES, A.; CHANTANA, N.; REINA-PATTON, A.; LAUST, A. K.; NISHIMOTO, K. P.; CHICZ-DEMET, A.; DU PONT, N.; MONK, B. J. Stress, immunity, and cervical cancer: biobehavioral outcomes of a randomized clinical trial [corrected]. **Clinical Cancer Research**, v. 14, p. 2111-2118, 2008.

NICOLAIDES, N. C. The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. **Steroids**, v. 75, p. 1-12, 2010.

OGDEN, J. **Psicologia da Saúde**. 2. ed. Lisboa: Climepsi Editores, 2004, 456p.

PERESTRELLO, D. **A medicina da pessoa**. 5 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2006, 210p.

PERINA, E. M. Câncer infantil: a difícil trajetória. In: CARVALHO, M. M. M. J. (Org.). **Introdução à psiconcologia**. São Paulo: Livro pleno, 2002. p. 79-94.

RIBEIRO, C.; ANGELO, M. O significado da hospitalização para a criança pré-escolar: um modelo teórico. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 39, n. 4, p. 391-400, 2005.

SCHEDLOWSKI, M.; HOSCH, W.; OBERBECK, R. et al. Catecholamines modulate human NK cell circulation and function via spleen-independent beta2-adrenergic mechanisms. **Journal of Immunology**, v. 156, p. 93-99, 1996.

SEPHTON, S. E.; LUSH, E.; DEDERT, E. A.; FLOYD, A. R.; REBHOLZ, W. N.; DHABHAR, F. S.; SPIEGEL, D.; SALMON, P. Diurnal cortisol rhythm as a predictor of lung cancer survival. **Brain Behavior and Immunity**, v. 30, p. S163-170, 2013.

SIMONETTI, A. **A terapêutica. Manual de psicologia hospitalar: o mapa da doença**. São Paulo: Casa do Psicólogo, 2004. p. 115-125.

STRAUB, R. O. **Psicologia da Saúde**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 384p.

STRAUB, R. O.; Berger. K. S. **The developing person through the life span**. 9. ed. USA: W.H. Freeman, 2004.

THORNTON, L. M.; ANDERSEN, B. L.; CRESPI, T. R.; CARSON, W. E. Individual trajectories in stress covary with immunity during recovery from cancer diagnosis and treatments. **Brain Behavior and Immunity**, v. 21, p. 185-194, 2007.

WARD, E.; JEMAL, A.; COKKINIDES, V.; SINGH, G.K.; CARDINEZ, C.; GHAFOR, A.; THUN, M. Cancer disparities by race/ethnicity and socioeconomic status. **A Cancer Journal of Clinicians**, v. 54, p. 78-93, 2004.

WEI, E. K., WOLIN, K. Y., COLDITZ, G. A. Time course of risk factors in cancer etiology and progression. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, p. 4052-4057, 2010.

Parte III

Pesquisa e inovação em Saúde

Da tecnologia farmacêutica
aos ensaios de toxicidade em animais

13.

CHALCONA: DEFINIÇÃO, SÍNTESE, ATIVIDADE BIOLÓGICA E ESTUDOS ESPECTROMÉTRICOS

JAQUELINE EVANGELISTA DE QUEIROZ

GIULIANA MUNIZ VILA VERDE

GILBERTO LUCIO BENEDITO DE AQUINO

As chalconas pertencem ao grupo dos flavonoides e são precursores naturais desses importantes metabólitos secundários de plantas, sintetizados a partir da via dos fenilpropanoides, oriundos de aminoácidos aromáticos, como a fenilalanina, tirosina e unidades de acetato (CAMPOS, 2010; ZUANAZZI, 2001).

Os flavonoides são polifenóis de relativa abundância nos vegetais. Possuem grande diversidade estrutural quando comparados a outros produtos de origem vegetal. Contudo, essa variabilidade estrutural pertence às angiospermas, já que esses compostos são praticamente ausentes em algas e de pouca ocorrência em briófitas, fungos e pteridófitas. Os flavonoides, por serem os pigmentos das plantas, participam da fase luminosa da fotossíntese, na qual catalisam o transporte de elétrons (CAMPOS, 2010).

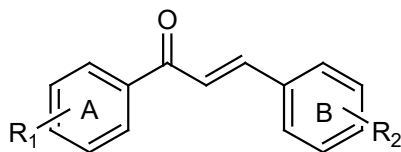
Assim, as chalconas constituem os pigmentos amarelos das flores e podem ser armazenadas em várias partes das plantas, como raiz, rizomas, cerne, brotos, folhas, flores e sementes. São comumente encontradas em espécies pertencentes aos gêneros *Angelica*, *Sophora*, *Glycyrrhiza*, *Humulus*, *Scutellaria*, *Parartocarpus*, *Morus* e *Artocarpus* (YADAV et al., 2011).

As chalconas possuem potencial químico e farmacológico, visto que inúmeros trabalhos relatam suas atividades biológicas (DIMMOCK et al., 1999; NI et al., 2004; NOWAKOWSKA et al., 2007), fazendo delas moléculas promissoras na busca de novos fármacos.

Estrutura das chalconas

O termo chalcona foi introduzido em 1899 por Kostanecki e Tabor (KOSTANECKI, et al., 1899). Estruturalmente, pertencem a um grupo de compostos que possui um esqueleto 1,3-difenil-2-propen-1-ona que corresponde a um flavonoide de cadeia aberta, sendo dois anéis aromáticos separados por um grupo cetona α,β -insaturado ($-C(O)CH=CH-$), demonstrado na Figura 1. Quimicamente, elas podem ser facilmente ciclizadas por adição de Michael na posição β do sistema carbonil para formar uma flavona. A existência da ligação dupla resulta em formas cis-trans isoméricas das chalconas na natureza, em que a forma trans é termodinamicamente mais estável (ØYVIND et al., 2006).

Figura 1– Estrutura geral das chalconas



Fonte: Próprios autores (2017).

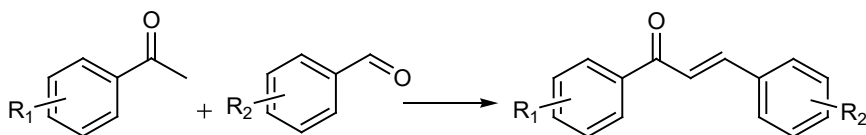
As chalconas são encontradas na forma de dímeros, oligômeros, adutos de Diels-Alder e conjugados de vários tipos. Substituições nos anéis aromáticos da estrutura básica também contribuem para sua variação estrutural (ØYVIND et al., 2006).

Síntese de chalconas

As chalconas podem ser obtidas de fontes naturais e sintéticas. A condensação de Claisen-Schmidt é a rota sintética mais simples e comum para sua obtenção, caracterizada pela reação de uma acetofe-

nona substituída com aldeídos, substituídos por aromáticos apropriados (Esquema 1), usando metanol ou etanol como solvente e hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio como catalisador (VOGEL et al., 1989).

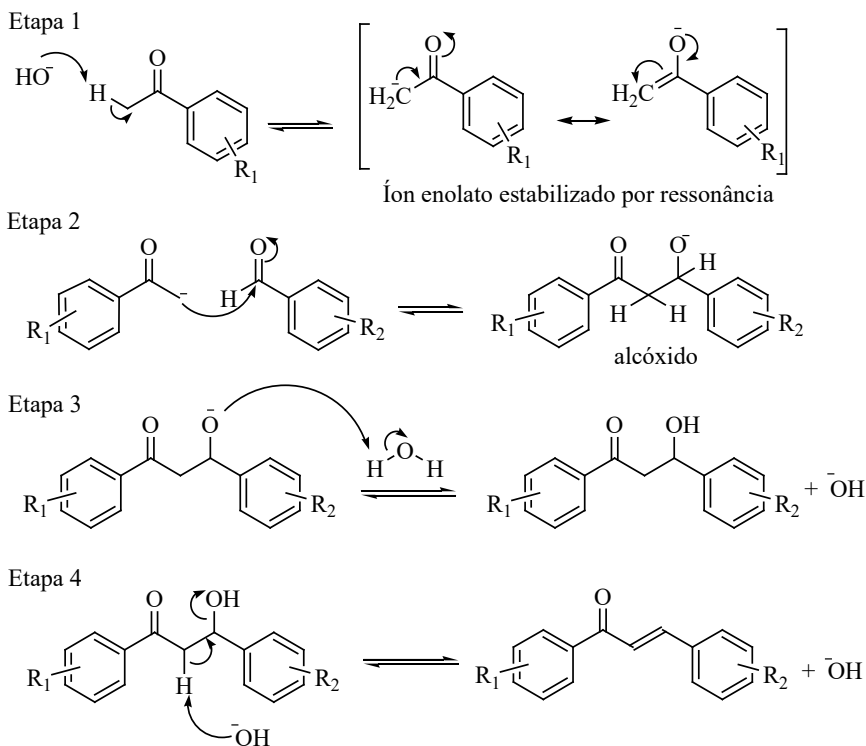
Esquema 1 – Reação de acetofenona e benzaldeído substituídos para formar a chalcona



Fonte: Próprios autores (2017).

A síntese de chalconas via catálise básica ocorre em quatro etapas (Esquema 2). A primeira etapa é caracterizada pela catálise básica do NaOH, que desprotona um próton do carbono α da carbonila da acetofenona, formando o íon enolato. O íon formado é estabilizado por ressonância. Na segunda etapa, o íon enolato reage como nucleófilo, atacando o carbono carbonílico do aldeído aromático substituído, produzindo o alcóxido que, na terceira etapa, desprotona uma molécula de água para formar o aldol. Na quarta etapa, ocorre a remoção do hidrogênio α da carbonila, devido a sua acidez. Em seguida, ocorre a estabilização do produto final pela ressonância das duplas ligações conjugadas (CAREY et al., 2007; PATIL et al., 2010).

Esquema 2 – Mecanismo da reação de condensação aldólica via catálise básica

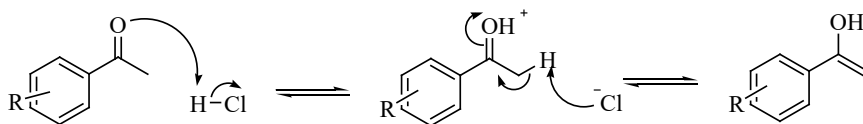


Fonte: Carey et al. (2007).

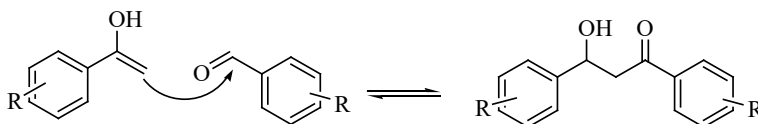
O mecanismo reacional via catálise ácida (Esquema 3) ocorre na presença de $\text{SOCl}_2/\text{EtOH}$. O HCl é gerado *in situ* pela reação do SOCl_2 com etanol absoluto. Em seguida, o oxigênio carbonílico desprotona o ácido gerado, formando o íon enolato, que se estabiliza por ressonância (CAREY et al., 2007). O grupo carbonílico do aldeído é ativado para o ataque nucleofílico por meio da protonação do oxigênio. Assim, os elétrons da dupla ligação do enol adicionam-se ao carbânion formado. Em seguida, ocorre a formação direta do aldol, levando à remoção do hidrogênio α carbonila.

Esquema 3 – Mecanismo da reação aldólica de chalconas via catálise ácida

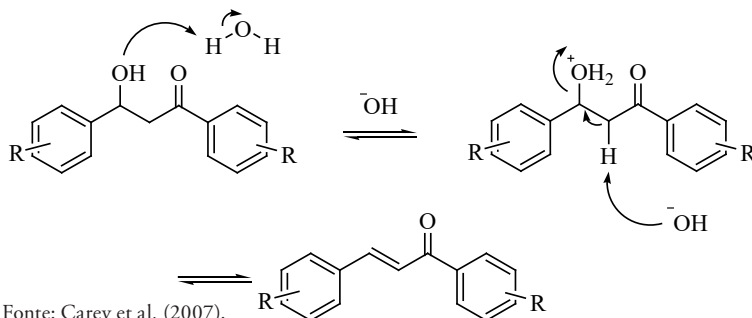
Etapa 1: Enolização



Etapa 2: Adição



Etapa 3: Desidratação



Fonte: Carey et al. (2007).

Variações da condensação de Claisen-Schmidt têm sido descritas, como, por exemplo, a utilização de ultrassom e uso de reator de micro-ondas para acelerar a reação, melhorar os rendimentos e estar em consonância com a química verde (CHENG et al., 2008; GO et al., 2005).

Estudos demonstram que reações orgânicas podem ocorrer mais rapidamente quando aquecidas por energia na faixa das micro-ondas do que quando aquecidas por outros meios. O aquecimento por irradiação de micro-ondas pode ser mais uniforme, não sendo influenciado pelas limitações de processos condutivos ou convectivos ou pelas características de alta viscosidade do sistema (GAVIN et al., 1994; HAYES et al., 2002). Em substituição ao aquecimento conven-

cional, o uso da irradiação de micro-ondas nas reações orgânicas leva a uma diminuição dos tempos de reação e redução de produtos indesejáveis (SOUZA et al., 2012).

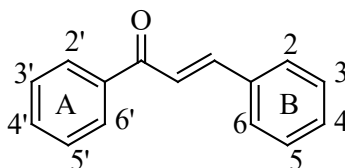
Relação estrutura atividade das chalconas

Chalconas e seus análogos desempenham diversas atividades biológicas (DI CARLO et al., 1999). A presença da dupla ligação em conjugação com o sistema cetona α , β -insaturado, é essencial para as atividades biológicas das chalconas, uma vez que a remoção dessa funcionalidade torna-as inativas (GUIDA et al., 1997).

Estudos sobre as suas múltiplas atividades biológicas, incluindo antimicrobiana (TRISTÃO et al., 2012), antioxidante (SIVAKUMAR et al., 2011), antibacteriana (BASIC et al., 2014), anti-inflamatória (BHATIA et al., 2010), antitubercular (SIVAKUMAR et al., 2010), larvicida (PASQUALE et al., 2012), antileishmania (BELLO et al., 2011) e inibição da formação de biofilme por *Haemophilus influenza* (KUNTHALERT et al., 2014) são alguns exemplos da sua vasta gama de ação.

A relação estrutura-atividade quantitativa (QSAR, do inglês, *Quantitative Structure–Activity Relationship*) para as atividades descritas a seguir foram realizadas de acordo com a estrutura básica das chalconas da Figura 2.

Figura 2 – Estrutura da chalcona para estudo da relação estrutura-atividade



Fonte: Próprios autores (2017). Legenda: **A**: anel fenila A; **B**: Anel fenila B; **2',6', 2 e 6**: posições orto (*o*); **3', 5', 3 e 5**: posições meta (*m*); **4' e 4**: posições para (*p*).

Atividade Antimicrobiana

Tristão et al. (2012) sintetizaram análogos de chalcona (amino, acetamido e nitrochalconas) para avaliação da atividade antibacteriana/antifúngica por estudos QSAR e citotoxicidade dos compostos. Sobre a influência do substituto no anel A, foi verificado que a adição do grupo amino ou grupo acetamida resultou em redução da atividade, ao passo que essas moléculas são comparáveis com as chalconas sem substituinte no anel A. Avaliando as nitrochalconas, verificou-se que chalconas com substituintes 3,4-dicloro e 4-cloro no anel A foram ativas contra *A. niger*, evidenciando a influência do grupo retirador de elétron. O composto com o grupo metoxila na posição 4 (elétron doador), no entanto, foi inativo contra *A. niger*, mas foi ativo contra outras espécies de fungos (*T. mentagrophytes*). Chalconas com substituições amino no anel A exibiram maior grau de toxicidade, quando comparado com os outros substituintes. Grupos eletronegativos na posição B diminuem a citotoxicidade, já que o deslocamento da densidade eletrônica desse sistema diminui a reatividade do grupo amino no anel A (TRISTÃO et al., 2012).

Atividade Antioxidante

O potencial antioxidante das chalconas está relacionado com a (I) capacidade de doação de hidrogénio ou elétrons, (II) capacidade para estabilizar e deslocalizar o elétron não emparelhado e (III) o potencial para quelar os íons metálicos de transição.

Sivakumar et al. (2011) sintetizaram uma série de chalconas com metoxila, tiometoxila, dimetilamino no anel A e avaliaram sua atividade antioxidante. Chalconas com hidroxilas (OH) no anel A e -tiometil ($p\text{-SCH}_3$) no anel B demonstraram alto potencial de redução. Muitas das chalconas sintetizadas exibiram atividade antioxidante mais elevada do que o ácido ascórbico, fármaco padrão. Todos os compostos ativos têm essencialmente substituição hidroxila no anel A. Grupos retiradores de elétrons no anel fenila B diminuem a atividade antioxidante (SIVAKUMAR et al., 2011).

Atividade Antibacteriana

Basic et al. (2014) evidenciaram que chalconas dihidroxiladas apresentaram alta atividade antimicrobiana, enquanto metilchalconas apresentaram uma menor atividade. As chalconas halogenadas e ortometoxichalconas apresentaram atividade antimicrobiana moderada. A atividade das chalconas trifluorometiladas e cloradas é ligeiramente melhor em comparação com as chalconas fluoradas. A presença de grupos hidroxilas no anel B tende a ter um efeito menor ou a diminuir a eletrofilicidade do carbono β . Contudo, esses derivados foram considerados os mais ativos (BASIC et al., 2014).

Atividade Anti-Inflamatória

Bhatia et al. (2010) sintetizaram uma série de chalconas e testaram sua atividade anti-inflamatórias, evidenciando que a presença de um átomo eletronegativo distante do sistema carbonilo α , β -insaturado, p.e. como um substituinte no anel B, aumenta a atividade das chalconas. Chalconas com múltiplos substituintes como metoxilas e dimetilamino diminuem a atividade. O aumento da hidrofilicidade e polaridade das chalconas contribui positivamente para o aumento da atividade (BHATIA et al., 2010).

Atividade Antitubercular

Sivakumar et al (2010) avaliaram uma série de chalconas para elucidar o requisito para a atividade anti-infecciosa em termos de substituições no anel A e B através de estudos QSAR, evidenciando que substituições p-sulfonilmetil ($p\text{-SO}_2\text{CH}_3$) no anel B aumentam a atividade; substituições o-cloro ($o\text{-Cl}$) no anel A e/ou B aumentam a atividade e grupos hidrófilos nas posições 3 ou 4' aumentam a atividade. A importância do volume, refratividade molar e peso molecular dos compostos na atividade foram evidenciados por QSAR (SIVAKUMAR et al., 2010).

Atividade Larvicida

Pasquale et al. (2012) avaliaram a atividade larvicida de chalconas, evidenciando a influência da densidade eletrônica em um ou ambos os anéis. Grupo *o*-hidroxila, elétron doador, no anel A, aumenta a atividade, sugerindo que a ligação -hidrogênio assistida por ressonância no anel A aumenta a densidade eletrônica no anel B. Chalconas com *p*-Cl no anel B apresentaram alta atividade e chalconas com um grupo *o*-OH no anel A tiveram redução na atividade. A presença de grupo elétron-retirador (p.e., *p*-NO₂) no anel A diminui a atividade (PASQUALE et al., 2012).

Atividade Antileishmania

Bello et al. (2011) avaliaram a atividade antileishmania de chalconas e evidenciaram um alto perfil de atividade para substituintes metoxila nos anéis A e B em comparação com a substituição de um átomo de cloro. A inserção de metoxilas diorto no anel A impõe rigidez estrutural e reduz a liberdade conformacional do anel fenila A que melhora a atividade leishmanicida. Ângulos de torção diedros são definidos como a diferença angular entre o plano do grupo carbonila e o anel fenila A. Os derivados com atividade antileishmanial significativa têm variação maior nos ângulos de torção diedros, que são influenciados pelo grupo metoxila na posição orto. Esses dados apontam para a importância estérica do grupo carbonila e da porção do anel fenila A para a atividade antileishmania. Compostos com melhor atividade antileishmanial possuem densidade alta densidade eletrônica no anel fenila A, enquanto os inativos apresentaram no anel fenila B (distante do grupo carbonila) (BELLO et al., 2011).

Inibição da Formação de Biofilme por *Haemophilus influenza*

Kunthalert et al. (2014) avaliaram a inibição da formação de biofilme de chalconas frente à *Haemophilus influenza* e evidenciaram que chalconas com hidroxilas (-OH) nos anéis A e B inibiram a formação de biofilme e foram mais potentes que azitromicina, fármaco padrão, indicando que a função oxigenada é essencial para a atividade. A chalcona com hidroxila na posição meta do anel B exibiu alta ativi-

dade, cerca de seis vezes mais ativa que a azitromicina. A inserção de um grupo metoxila adicional na posição 4 dessa chalcona provocou uma diminuição da atividade, indicando que o grupo hidroxila deve estar livre. Tomadas em conjunto, essas observações indicam que um grupo hidroxila livre na posição meta no anel B é um requisito estrutural crucial para a atividade antibiofilme de chalconas (KUNTHALERT et al., 2014).

ESTUDOS ESPECTROMÉTRICOS DE CHALCONAS

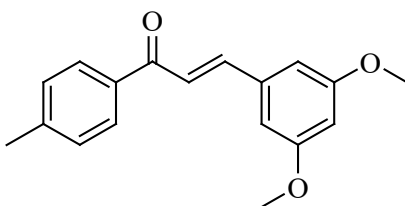
Estudos dos dados espectrométricos são úteis para a elucidação de estruturas moleculares, estereoquímica e propriedades físico-químicas de compostos orgânicos, bem como determinação qualitativa e quantitativa de compostos orgânicos e inorgânicos. Os métodos espectroscópicos de análise são baseados na medida da quantidade de radiação produzida ou absorvida pelas moléculas ou pelas espécies atômicas de interesse. Os métodos espectroscópicos são classificados de acordo com a região do espectro eletromagnético envolvida na medida (SKOOG et al., 2006). Entre as técnicas utilizadas para elucidação estrutural das chalconas, podem-se citar a Espectroscopia de infravermelho (IV), Espectrometria de Ressonância Nuclear Magnética (RNM), Espectrometria de Massa (EM) e Cristalografia de Raio X.

Espectroscopia de infravermelho (IV)

No espectro IV de chalcones assimétricas e de estiramento simétrico, são observadas vibrações das ligações aromáticas C-H a $3120\text{--}3080\text{ cm}^{-1}$ e $3060\text{--}3040\text{ cm}^{-1}$ com duas bandas de baixa intensidade. A banda de estiramento C-H do grupo $=\text{C-H}$ é observada a $3030\text{--}3010\text{ cm}^{-1}$. As bandas a $1610\text{--}1570\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas às vibrações do anel aromático. A deformação em plano da ligação $=\text{C-H}$ aparece como banda fraca larga a $1460\text{--}1430\text{ cm}^{-1}$. As vibrações de estiramento carbonílico para as enonas ($=\text{C-C=O}$) podem ser encontradas entre 1650 e 1685 cm^{-1} (ISSA et al., 1983). O grupo cetona conjugado apresenta um pico a 1640 cm^{-1} e o pico de ligação dupla apareceu em torno de 1580 cm^{-1} (KAMAKSHI et al., 2008).

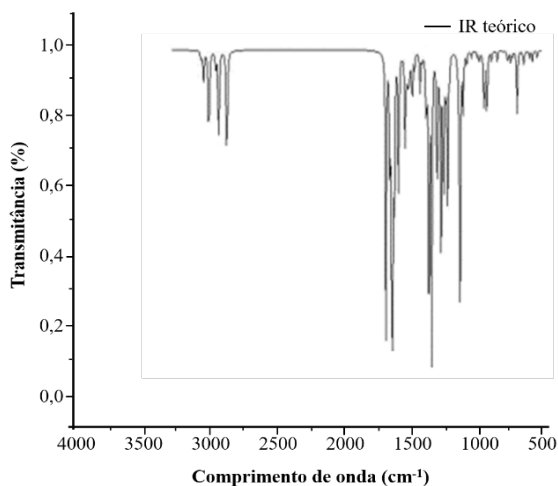
A chalcona (E)-3-(3,5-dimetoxifenil)-1-p-toluilprop-2-en-1-ona, $C_{18}H_{18}O_3$, (Figura 3) possui espectro de infravermelho teórico, conforme Figura 1. Os picos característicos, descritos anteriormente, e os específicos dos substituintes metila e metoxila podem ser visualizados no espectro da Figura 4.

Figura 3 – Estrutura da (E)-3-(3,5-dimetoxifenil)-1-p-toluilprop-2-en-1-ona



Fonte: Próprios autores (2017).

Figura 4 – Espectro de IR teórico da (E)-3-(3,5-dimetoxifenil)-1-p-toluilprop-2-en-1-ona



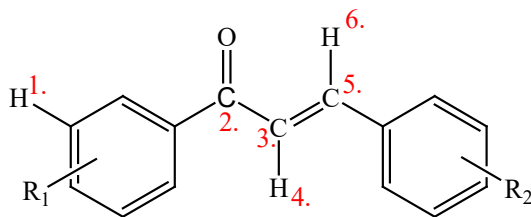
Fonte: Adaptado de Ternavisk et al. (2014).

Espectrometria de Ressonância Nuclear Magnética (RNM)

Uma vez que os compostos flavonoides contêm, em geral, poucos prótons, a espectroscopia de ressonância magnética de prótons (P-NMR) é uma ferramenta útil na elucidação estrutural. Os prótons H- α e H- β (Figura 6) das chalconas ocorrem como dois dupletos ($J = 17$ Hz) nas faixas de 6,7-7,4 ppm (H- α) e 7,3-7,7 ppm (H- β) nos espectros de ^1H -NMR (MABRY; MARKHAM, 1970).

Os prótons aromáticos aparecem geralmente entre δ 6,9-8,0, dependendo do tipo de anel aromático/heteroaromático e também com base nos efeitos eletrônicos dos substituintes presentes nesses anéis. O carbono carbonílico das chalconas aparece habitualmente entre δ 188,6 e 194,6 no seu espectro de ^{13}C -RMN (PELTER et al., 1976).

Figura 6 – Carbonos e hidrogênios característicos das chalconas



Fonte: Próprios autores (2017).

Legenda: 1. Hidrogênio aromático; 2. Carbono carbonílico; 3. Carbono alfa; 4. Hidrogênio alfa; 5. Carbono beta; 6. Hidrogênio beta.

A (E)-1,3-dip-tolylprop-2-en-1-one apresenta os espectros de RMN para Carbono-13 (^{13}C) e Hidrogênio-1 (^1H), conforme Figuras 7 e 8, respectivamente.



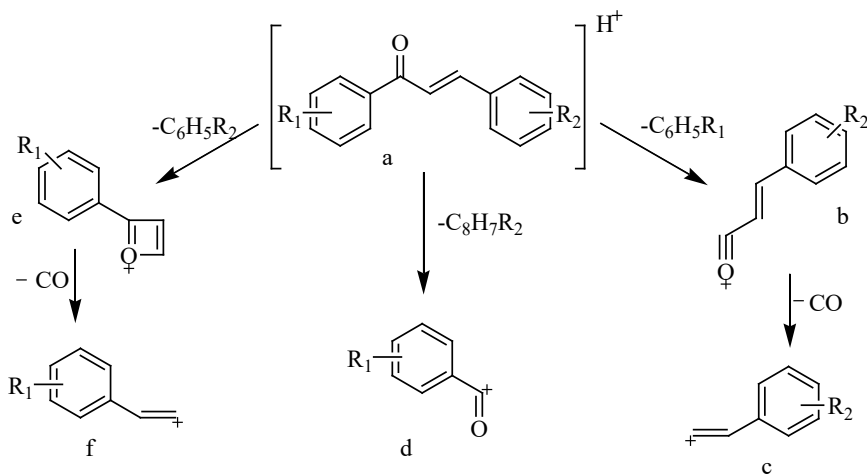
10



Espectrometria de Massa (EM)

O espectro de massa da chalcona foi registado pela primeira vez por Beynon e as principais fragmentações desse composto foram racionalizadas e consideradas características. O mecanismo de isomerização em solução aquosa envolve um próton do solvente pela isomerização intramolecular. As vias de fragmentação básicas das chalconas são obtidas pela perda do grupo fenila do anel A ou B, perda de H_2O , perda de CO e dos substituintes nos anéis A ou B (Esquema 4), quando presentes (VAN et al., 1972).

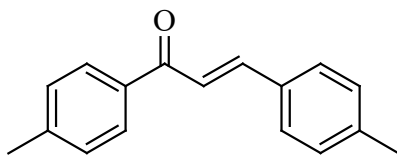
Esquema 4 – Mecanismo proposto de fragmentação de chalconas protonadas



Fonte: Van et al. (1972).

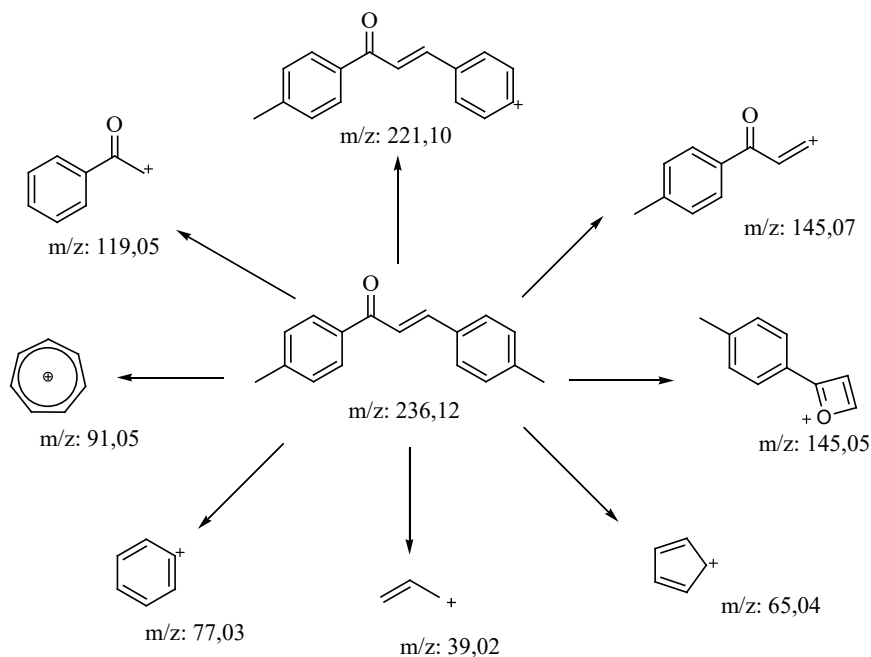
A metilchalcona (E)-1,3-di-*p*-toluilprop-2-en-1-one (Figura 9) possui padrão de fragmentação, de acordo com o esquema 5, e espectro de massa, conforme Figura 10, em que o pico de 236 *m/z* equivale ao íon molecular.

Figura 9 – Estrutura da (E)-1,3-dip-toluilprop-2-en-1-ona (236,3 g/mol)



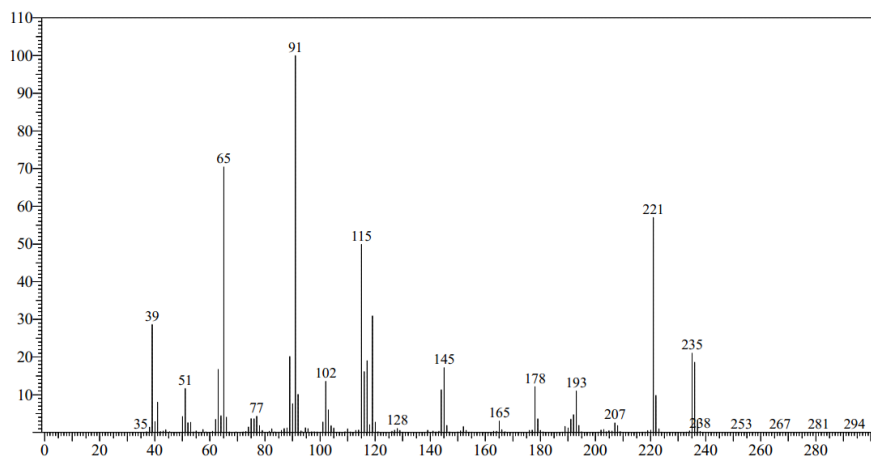
Fonte: Próprios autores (2017).

Esquema 5 – Fragmentação da (E)-1,3-di-p-toluil-prop-2-en-1-ona



Fonte: Próprios autores (2017).

Figura 10 – Espectro de massas da (E)-1,3-di-p-toluil-prop-2-en-1-one



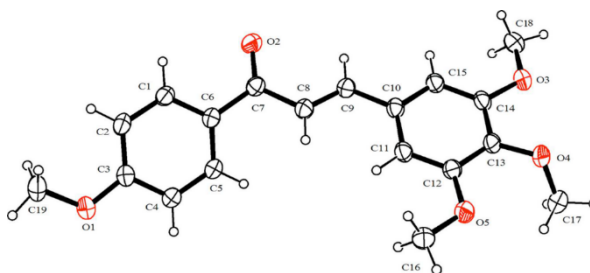
Fonte: Próprios autores (2017).

Cristalografia de Raio X

A cristalografia de raios X tem por objetivo obter uma estrutura molecular tridimensional a partir de um cristal exposto a um feixe de raios X. Os padrões de difração resultantes podem então ser processados para produzir informação sobre a simetria do cristal. A estrutura resultante é refinada para e adotar uma conformação termodinamicamente favorecida e assim definir a estrutura molecular. As propriedades cristalográficas variam para cada molécula (SMYTH et al., 2000). A disposição molecular na rede cristalina determina as propriedades fundamentais do material, tais como estabilidade, solubilidade, cor, resistência e, como resultado, as suas aplicações farmacológicas e tecnológicas (KERNS et al., 2010).

A metoxichalcona (E)-1-(4-metoxifenil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil) prop-2-en-1-ona ($C_{19}H_{20}O_5$), sistema cristalino monoclinico, possui grupo espacial $P2_1/c$ e $Z=4$. A molécula refinada é apresentada na Figura 11 e possui uma conformação não planar. A estrutura cristalina é estabilizada por ligações intermoleculares de hidrogênio (C-H...O) (CARVALHO Jr et al., 2011).

Figura 11 – Molécula refinada (E)-1-(4-metoxifenil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona



Fonte: Carvalho Jr et al. (2011).

Considerações finais

Diante do exposto, as chalconas apresentam-se como moléculas altamente promissoras e a realização de estudos que contemplem a exploração de seu potencial estrutural certamente terão significativa importância na área farmacêutica.

Agradecimentos

Os autores são gratos à Universidade Estadual de Goiás (UEG), pelo suporte técnico; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

Referências

- BASIC, J.; KALINIC, M.; IVKOVIC, B.; ERIC, S.; MILENKOVIC, M. VLADIMIROV, S.; VUJIC, Z. Synthesis, QSAR analysis and mechanism of antibacterial activity of simple 2-hydroxy chalcones. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 9, p. 1537-1546, 2014.
- BELLO, M.L.; CHIARADIA, L.D.; DIAS, L.R.; PACHECO, L.K.; STUMPF, T.R.; MASCARELLO, A.; STEINDEL, M.; YUNES, R.A.; CASTRO, H.C.; NUNES, R.J.; RODRIGUES, C.R. Trimethoxy-chalcone derivatives inhibit growth of *Leishmania braziliensis*: Synthesis, biological evaluation, molecular modeling and structure–activity relationship (SAR). **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 5046-5052, 2011.

BHATIA, N.M.; MAHADIK, K.R.; BHATIA M.S. Exploring the influence of steric, electronic and lipophilic descriptors of 1,3-diaryl propenones on their anti-inflammatory activity. **Daru**, v. 18, n. 3, p. 230 -236, 2010.

CAMPOS, M.G. Flavonoides. In: CUNHA, A.P. (org.). **Farmacognosia e Fitoquímica**, 3. ed. 670p. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2010. Cap. 13. p. 238-289. ISBN 13 9789723111422.

CAREY, F.A.; SUNDBERG, J.R. **Advanced Organic Chemistry, Part B: reactions and synthesis**. 5. ed. New York: Springer, 2007. ISBN 978-0-387-71481-3.

CARVALHO Jr, P.S.; SALLUM, L.O.; CIDADE, A.F.; AQUINO, G. L. B.; NAPOLITANO, H.B. (E)-1-(4-Methoxyphenyl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one. **Acta Crystallographica Section E**, v. E67, p. 2126-2137, 2011.

CHENG, J.H.; HUNG, C.F.; YANG, S.C.; WANG, J.P.; WON, S.J.; LIN, C.N. Synthesis and cytotoxic, anti-inflammatory, and anti-oxidant activities of 2',5'-dialkoxychalcones as cancer chemo preventive agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 7270-7276, 2008.

CIDADE, A.F. **Síntese e avaliação biológica de intermediários sintéticos de derivados pirazolidínicos e isoxazolidínicos**. 2011. 134p. Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares) – Programa de Mestrado em Ciências Moleculares, Campus de Ciências Exatas e Tecnológicas, UEG. Anápolis, 2011.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A.A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, v. 65, p. 337-353, 1999.

DIMMOCK, J.R.; ELIAS, D.W.; BEAZELY, M.A.; KANDEPU, N.M. Bioactivities of chalcones. **Current Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 12, p. 1125-1149, 1999.

GAVIN, W. A Basic Introduction to Microwave Chemistry and Microwave Heating Mechanisms. **Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy**, v. 29, n 4, 8p. 1994.

GO, M.L.; WU, X.; LIU, X.L. Chalcones: an update on cytotoxic and chemoprotective properties. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 483-499, 2005.

GUIDA, A.; LHOUTY, M.H.; TICHIT, D.; FIGUERAS, F.; GENESTE, P. Hydrotalcites as base catalysts. Kinetics of Claisen-Schmidt condensation, intramolecular condensation of acetonylacetone and synthesis of chalcone. **Applied Catalysis A: General**, v. 164, p. 251-264, 1997.

HAYES, B.L. Microwave Synthesis: chemistry at the speed of light. **CEM Publishing**, p. 11-93, 2002.

ISSA, F.M.; EL-ANSARY, A.L.; EL-KERCH, M.M.; ISSA, R.M. Spectroscopic investigation of some chalcones. **Chemistry and Chemical Engineering**, v. 29, p. 256-268, 1983.

KAMAKSHI, R.; REDDY, B.S.R. Synthesis of chalcone-based fluorescent polymers: Diels-Alder reaction of chalcones and their polymerization through ROMP. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 46, p. 1521-1531, 2008.

KERNS, E.; DI, L. **Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods**. 5ed. Academic Press, Elsevier Science, London, 2010. 552p. ISBN: 978-0-12-369520-8.

KOSTANECKI, S.V.; TABOR, J. Ueber die sechs isomeren Monooxybenzalacetophenone (Monooxychalkone). **Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v. 32, p. 1921-1926, 1899.

KUNTHALERT, D.; BAOTHONG, S.; KHETKAM, P.; CHOKCHASIRI, S.; SUKSAMRARN, A. A chalcone with potent inhibiting activity against biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenza*. **Microbiology and Immunology**, v. 58, p. 581-589, 2014.

MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. **The systematic identification of flavonoids**. 1ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1970. 354p. ISBN 978-3-642-88458-0.

NI, L.; MENG, C.Q.; SIKORSKI, J.A. Recent advances in therapeutic chalcones. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 14, p. 1669-1691, 2004.

NOWAKOWSKA, Z. A review of anti-inflammatory chalcones. **European Journal of Chemistry**, v. 42, p. 125-137, 2007.

ØYVIND, M.A.; KENNETH, R.M. **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications**. 1ed. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton. 2006. 1256p. ISBN 9780849320217.

PASQUALE, G.; ROMANELLI, G.P.; AUTINO, J.C.; GARCÍA, J.; ORTIZ, E.V.; DUCHOWICZ, P.R. Quantitative structure-activity relationships of mosquito larvicidal chalcone derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 8, p. 692-697, 2012.

PATIL, A.S.; GACCHE, N.R.; KORBAD, L.B. Synthesis and biological evaluation of nitrogen-containing chalcones. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 20, p. 730-733, 2010.

PELTER, A.; WARD, R.S.; GRAY, T.I. The carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of flavonoids and related compounds. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, v. 23, p. 2475-2483, 1976.

SIVAKUMAR, P.M.; KUMAR, V.; SEENIVASAN, S.P.; MOHANAPRIYA, J.; DOBLE, M. Anti tubercular activity of chalcones – Experimental and QSAR studies. **Advances in Biomedical Research**, WSEAS Press, University of Cambridge, UK, p. 168-172, 2010.

SIVAKUMAR, P.M.; PRABHAKAR, P.K.; DOBLE, M. Synthesis, antioxidant evaluation, and quantitative structure–activity relationship studies of chalcones. **Medicinal Chemistry Research**, v. 20, p. 482–492, 2011.

SKOOG, D.A., WEST, D.M., HOLLER, F.J., CROUCH, S.R. **Fundamentos de Química Analítica**, 8 ed. Editora Thomson, 2006. 1124p. ISBN-10: 8522104360.

SMYTH, M.S.; MARTIN, J.H.J. x Ray crystallography. **Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology**, v. 53, p. 8-14, 2000.

SOUZA, R.O.; MIRANDA, L.S.M. Irradiação de micro-ondas aplicada à síntese orgânica: uma história de sucesso no Brasil. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 497-506, 2011.

TERNAVISK, R.R.; CAMARGO, A.J.; MACHADO, F.B.; ROCCO, J.A.; AQUINO, G.L.; SILVA, V.H.; NAPOLITANO, H.B. Synthesis, characterization, and computational study of a new dimethoxy-chalcone. **Journal of Molecular Modeling**, v. 20, p. 2526-2537, 2014.

TRISTÃO, T.C.; CAMPOS, -B.F.; CORRÊA, R.; CRUZ, R.C.; CECHINEL FILHO, V.; BELLA, C.A. Antimicrobial and Cytotoxicity Potential of Acetamido, Amino and Nitrochalcones. **Arzneimittelforschung**, v. 62, p. 590-594, 2012.

VAN, S.C.; SERUM, J.W.; VANDEWALLE, M. Studies in organic Mass spectrometry-XII: Mass spectra of chalcones and flavanones. The isomerisation of 2'-hydroxy-chalcone and flavanone. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 6, p. 1333-1345, 1972.

VOGEL, A.I. **Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry**, 5 ed. New York: John Wiley & Sons, 1989. 1017p. ISBN-13: 978-0582462366.

YADAV, V.R.; PRASAD, S.; SUNG, B.; AGGARWAL, B.B. The role of chalcones in suppression of NF-κB-mediated inflammation and câncer. **International Immunopharmacology**, v. 11, p. 295-309, 2011.

ZUANAZZI, J.A.S. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O. (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 3 ed. Florianópolis: Editora da UFSC, Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2001. Cap. 23. p. 499-526, 2011.

14.

ESTRATÉGIAS PARA FORMULAÇÃO DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS MUCOADESIVOS

RAYANE SANTA CRUZ MARTINS DE QUEIROZ ANTONINO
ELIANA MARTINS LIMA
THAIS LEITE NASCIMENTO

O avanço em tecnologias que buscam melhorias e inovações na área da saúde inclui o desenvolvimento de novos produtos e materiais. Os frutos dessas pesquisas visam atender as necessidades de terapias com objetivos cada vez mais específicos e refinados (CAMBLIN et al., 2016; LATHEESHJAL et al., 2011).

Na área de tecnologia farmacêutica, a pesquisa em medicamentos busca maior eficácia, segurança e melhoria do bem-estar do paciente em tratamento (PATIL et al., 2016). Essa busca movimentou três setores importantes da sociedade: pesquisa, indústria e clínica. Dentro das inúmeras estratégias de desenvolvimento de novas formas farmacêuticas, estão as formulações mucoadesivas, que têm como objetivo aumentar o tempo de contato do fármaco com a superfície mucosa, aumentando sua absorção e eficiência terapêutica (LAFFLEUR, 2016; RAJARAM; LAXMAN, 2017).

Neste capítulo, o leitor será introduzido às definições sobre muco e o processo de interação de formulações com as mucosas. As formas farmacêuticas mucoadesivas e os materiais que as compõem, assim como as técnicas e ensaios utilizados para quantificarem a mucoadesão de formulações, serão abordados.

Muco e mucoadesão

Para o desenvolvimento de formulações mucoadesivas, faz-se necessário compreender as bases fisiológicas, composição, função e localização do muco no corpo humano. A mucosa representa a superfície úmida que recobre algumas regiões do corpo, como a cavidade oral, trato respiratório, trato gastrointestinal (TGI), região vaginal e conjuntiva ocular (LAFFLEUR, 2016).

Além de desempenharem um papel importante na proteção do epitélio celular contra danos químicos e mecânicos, as membranas mucosas também proporcionam lubrificação e molhabilidade do epitélio da célula e regulam o seu teor de umidade (KHUTORYANSKIY, 2011). A mucosa é composta por proteínas livres, lipídios, glicoproteínas, sais minerais e água (Quadro 1), sendo essa composição variável de acordo com a localização do muco no organismo.

Quadro 1 – Representação geral da composição química do muco

Constituintes	Proporções
Proteínas livres	0,5 – 1%
Lipídios e glicoproteínas	1 – 5%
Sais minerais	0,5 – 5%
Água	95%

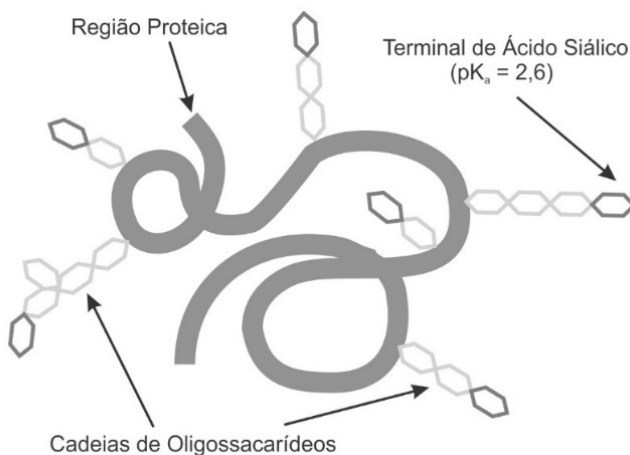
Fonte: Adaptado de Kharenko et al. (2009) e Laffleur (2016)

A mucina é a principal glicoproteína do muco, responsável por formar uma camada de gel viscoelástico quando hidratada, que confere ao muco sua viscosidade característica. Essa biomacromolécula tem elevado peso molecular (0,5 – 40 MDa), com subunidades de 500 KDa unidas por ligações peptídicas e pontes dissulfeto de cisteína – cisteína intramoleculares (KHUTORYANSKIY, 2011; PEPPAS; SAHLIN, 1996) e pode estar estruturada de forma linear ou não linear.

Cada unidade de mucina é composta por cadeias de oligossacarídeos associadas a agregados proteicos. A região proteica representa 12 a

17% do peso total da mucina e é 70% composta pelos aminoácidos prolina, treonina e serina. Já as cadeias de oligossacarídeos são feitas de N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, galactose, fucose e ácido N-acetilneurâmico (ácido siálico) (YANG; ROBINSON, 1998). As cadeias de oligossacarídeos recobrem mais de 60% da fração proteica, sendo o restante não glicosilado (KHARENKO et al., 2009). A cobertura dos oligossacarídeos confere carga negativa à mucina, devido à presença dos grupamentos carboxilatos do ácido siálico e dos ésteres sulfatados em algumas unidades de açúcar (Figura 1). O pKa aproximado desses grupos ácidos está entre 1,0 a 2,6, resultando na sua ionização sob condições fisiológicas (LAFFLEUR, 2016).

Figura 1 – Imagem esquemática da subunidade de mucina

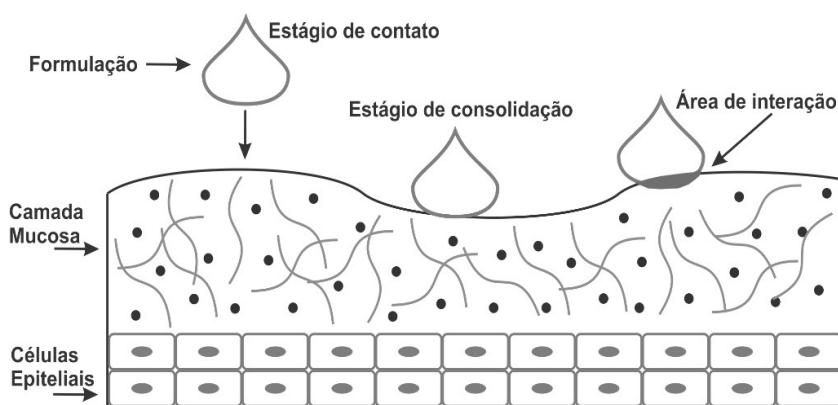


Fonte: Adaptado com autorização de Macromolecular Bioscience (Khutoryanskiy, 2011).

Em 1986, Longer e Robinson definiram o termo bioadesão como a “ligação de uma macromolécula sintética ou natural a uma superfície biológica” (LONGER; ROBINSON, 1986; SALAMAT-MILLER et al., 2005). Já a mucoadesão é definida como a interação entre duas superfícies, sendo uma delas material natural ou sintética e a outra, o muco (humano ou animal) e/ou uma superfície epitelial (RAJARAM; LAXMAN, 2017; SMART, 2005).

O processo de mucoadesão acontece em dois estágios, o estágio de contato e o de consolidação. O primeiro é caracterizado pelo umedecimento, expansão e inchaço da formulação adesiva, aumentando o contato com a mucosa (CAMBLIN et al., 2016; RAJARAM; LAXMAN, 2017). No estágio de consolidação, a umidade facilita o movimento das moléculas poliméricas mucoadesivas. Essas moléculas separam-se umas das outras e começam a interagir com o muco/epitélio através de forças de van der Waals, atrações eletrostáticas, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas (SMART, 2005). Evidentemente, para que a adesão das duas superfícies seja consolidada, é necessário que as forças atrativas sejam mais dominantes que as forças repulsivas (REINEKE et al., 2013) (Figura 2).

Figura 2 – Esquema ilustrativo dos estágios de mucoadesão



Fonte: Adaptado com autorização de Elsevier (Patil et al., 2016)

As teorias que baseiam os mecanismos pelos quais acontece o processo de mucoadesão serão abordadas no próximo tópico deste capítulo.

Mecanismos de mucoadesão

O processo de mucoadesão é extensamente detalhado na literatura por algumas teorias. Alguns autores consideram cinco teorias

(KHARENKO et al., 2009; LAFFLEUR, 2016) e outros, seis (KHUTORYANSKIY, 2011; SMART, 2005). Abordaremos aqui as seis teorias que explicam os mecanismos de mucoadesão, sendo elas:

- 1) Teoria eletrônica – Aplica-se quando o material mucoadesivo e o muco tem diferentes características eletrônicas, gerando uma transferência de elétrons e atração eletrostática devido às cargas opostas (AHUJA et al., 1997; KHUTORYANSKIY, 2011);
- 2) Teoria da adsorção – Considera-se que a atração entre o muco e os polímeros mucoadesivos é conseguida através de interações específicas, como ligação de hidrogênio e forças de van der Waals, como também as interações hidrofóbicas, quando o material mucoadesivo tem características anfífilas. Considera, ainda, a possibilidade de formar fortes ligações covalentes entre a mucina e o material mucoadesivo (SMART, 2005; UGWOKÉ et al., 2005);
- 3) Teoria da molhabilidade – Aplicável principalmente a sistemas líquidos, considera a energia superficial e a interfacial. Correlaciona a tensão superficial do muco e do material mucoadesivo com a sua capacidade de se espalhar sobre a camada de muco. A afinidade de um líquido para uma superfície pode ser determinada considerando o ângulo de contato do líquido na superfície. A regra geral é de que, quanto menor o ângulo de contato, maior a afinidade do líquido na superfície (RAJARAM; LAXMAN, 2017; SHANKAR et al., 2010);
- 4) Teoria da difusão – Descreve a interdifusão de macromoléculas mucoadesivas no gel de muco. Esse processo é conduzido pelo gradiente de concentração e sofre influência do peso molecular do material adesivo e da sua mobilidade de cadeia. A profundidade de interpenetração depende do coeficiente de difusão e do tempo de contato (GARTI, 2008; LAFFLEUR, 2016);
- 5) Teoria da fratura – Relaciona a dificuldade de separação de duas superfícies após a adesão. Essa teoria é bastante aceita e descreve que a força de fratura (ou tensão de tração) é a força

necessária para separar as duas superfícies após a adesão. A força de fratura pode ser calculada pela seguinte equação (RAJARAM; LAXMAN, 2017):

$$Sm = Fm/Ao$$

Em que:

Sm – Força de fratura

Fm – Força máxima de desprendimento

Ao – Área de superfície

- 6) Teoria mecânica – Essa teoria considera o efeito da rugosidade superficial, favorecendo a adesão devido à maior área de contato. A contribuição dos efeitos da teoria mecânica na mucoadesão torna-se mais importante para os materiais ásperos e porosos (BATCHELOR, 2004a).

Cada teoria aqui apresentada é igualmente importante para descrever o processo de mucoadesão. Nenhuma delas isoladamente explica a mucoadesão das variadas formulações farmacêuticas já desenvolvidas, pois tal processo resulta da combinação de vários mecanismos (RAJARAM; LAXMAN, 2017).

Alguns autores explicam a mucoadesão em fases sequenciais, estando cada uma das fases associadas a um mecanismo diferente. Primeiramente, o material mucoadesivo molha e dilata (teoria de molhagem), sequencialmente, são criadas ligações (físicas) não covalentes, dentro da interface muco/polímero (teorias eletrônicas e de adsorção). Em seguida, as cadeias de polímero e mucina interpenetram-se (teoria da difusão) e entrelaçam-se, formando ligações não covalentes e covalentes adicionais (teorias eletrônicas e de adsorção) (KHUTORYANSKIY, 2011; SMART, 2005).

Formulações farmacêuticas mucoadesivas

Os materiais utilizados na obtenção de formulações mucoadesivas podem ser classificados quanto a sua natureza química, sendo eles: metálicos, cerâmicos e poliméricos. Polímeros são macromoléculas arranjadas por meio de ligações químicas entre pequenas unidades repetidas, os monômeros. Essas moléculas são a base das formulações mucoadesivas, devido à sua capacidade de formar ligações químicas com outras superfícies. Polímeros mucoadesivos devem ser não tóxicos, não irritantes, podem ser solúveis ou insolúveis em água e devem interagir com a mucosa rapidamente (PATIL et al., 2016). Eles podem também ser divididos quanto as suas propriedades (Quadro 2).

Quadro 2 – Classificação dos polímeros mucoadesivos quanto às suas propriedades

Natural	Alginato de sódio, pectina, gelatina, carragenina, goma xantana, goma Guar
Sintético	Polivinil álcool (PVA), poliamidas, policarbonatos, celulose e seus derivados, polimetacrilatos
Biocompatível	Ésteres de ácido hialurônico, polivinil acetato, etilenoglicol
Biodegradável	Polilactatos, quitosana, policaprolactona (PCL), poliglicoides, óxido de polietileno

Fonte: Adaptado de Lohani e Chaudhary (2012).

As formulações farmacêuticas mucoadesivas podem estar na forma sólida, líquida e semissólida. No estado sólido, os comprimidos mucoadesivos são aplicados, principalmente, na cavidade oral, mas podem também ter aplicação ginecológica (KHARENKO et al., 2009). Os comprimidos que se ligam à mucosa bucal têm sido bem sucedidos comercialmente, como as formulações de testosterona (Striant®, Columbia Laboratories Inc, EUA) e nitroglicerina (Nitrogard®, Forest Pharmaceuticals Inc., USA). Com o objetivo de melhorar as propriedades mucoadesivas desses comprimidos, polímeros mucoadesivos como carbômeros, gomas, resinas naturais e derivados de celulose são adicio-

nados à formulação. Apesar da eficácia dos comprimidos mucoadesivos para aplicação local, a principal restrição à sua ampla utilização decorre do seu tamanho e forma (VAN ROEY et al., 2004).

Filmes poliméricos mucoadesivos também são comumente propostos para aplicação oral e oftálmica (AHUJA et al., 2006; CHUN et al., 2003; OKAMOTO et al., 2001). Ao contrário dos comprimidos, os filmes têm maior flexibilidade para se adequar à superfície de aplicação. Eles também apresentam algumas vantagens em comparação a formulações semissólidas (cremes e géis), uma vez que podem manter uma dose precisa de fármaco no local de aplicação (BIRUDARAJ et al., 2005; SALAMAT-MILLER et al., 2005). Filmes para aplicação ocular, em comparação às formulações líquidas, apresentam vantagens, como maior tempo de retenção, maior tempo de meia vida de eliminação, maior precisão da dosagem e maior estabilidade (LUDWIG, 2005).

As formulações no estado líquido são utilizadas normalmente com finalidade terapêutica ou protetora (BATCHELOR, 2004b). Lágrimas artificiais e saliva artificial, por exemplo, são formulações líquidas à base de polímeros mucoadesivos (carbomeros e corboximetilcelulose de sódio), cuja função é proteger os olhos e a boca ou auxiliar no tratamento da síndrome do olho seco e na secura da boca (xerostomia) (ALBIETZ; DOUGLAS, 2003; PREETHA; BANERJEE, 2005).

Os líquidos mucoadesivos também são utilizados para a proteção da mucosa esofágica. Por exemplo, o medicamento Gaviscon (Gaviscon Liquid®, Reckitt Benckiser Healthcare, Reino Unido), que usa alginato de sódio como polímero mucoadesivo, pode aderir à mucosa esofágica durante 1 hora após o uso, proporcionando proteção ao esôfago contra o suco gástrico em casos de refluxo estomacal (BATCHELOR, 2004b; YADAV; DESHMUKH, 2016). Formulações mucoadesivas para aplicação no esôfago têm sido estudadas para o tratamento de disfunções motoras, infecções fúngicas e tumores esofágicos (BATCHELOR, 2005; ZHANG et al., 2008).

Formulações contendo líquidos formadores de géis têm sido propostas para tratamento ocular, nasal e transdérmico (KHARENKO et al., 2009; LEE et al., 2000; UGWOKKE et al., 2005). Essas formula-

ções contêm poloxamer, pectina, carbopol ou ácido hialurônico (GÉRAUD et al., 2017; SOUSA et al., 2017; WILLATS et al., 2006), que são polímeros caracterizados por transições de fase e a formação de géis viscoelásticos em resposta à temperatura, força iônica ou pH (LUDWIG, 2005). A adição de polímeros mucoadesivos aumenta o tempo de contato do gel com o local de ação, melhorando a eficácia terapêutica. Os produtos NyoGel® (timolol, Novartis, Suíça, contendo um carbomero e álcool polivinílico) e Pilogel® (cloridrato de pilocarpina, Alcon Laboratories, Suíça, contendo carbopol 940) são exemplos comerciais de géis poliméricos mucoadesivos para tratamento oftálmico. Um outro exemplo de formação de gel mucoadesivo é o Zilactin® (Zilactin®, Zila Pharmaceuticals, EUA), produto contendo benzocaína e lidocaína, indicado para o tratamento sintomático do herpes nos lábios (LUDWIG, 2005; VALENTA, 2005; ZHANG et al., 2008).

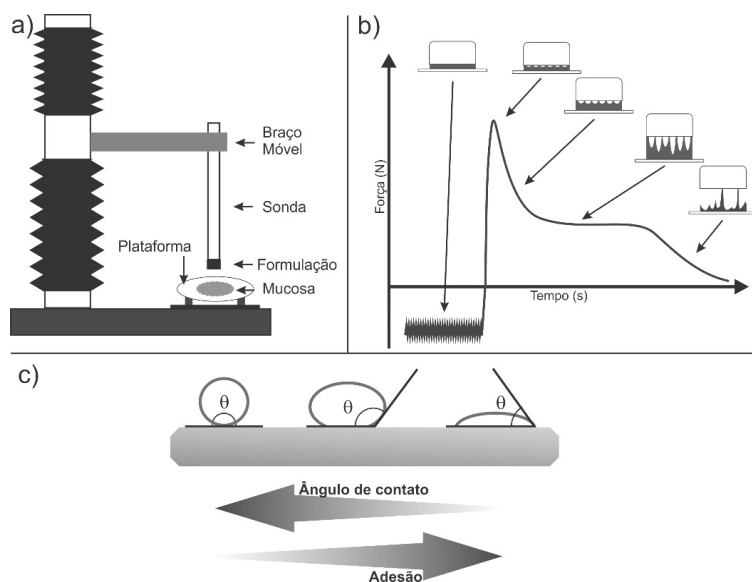
Sistemas micro e nanoestruturados também têm sido desenvolvidos para aplicação em formulações mucoadesivas (PATIL et al., 2016). Micro e nanopartículas oferecem a possibilidade de aumentar a superfície e o tempo de contato do fármaco com o local de ação, proporcionando vantagens adicionais à terapia medicamentosa (NAPPINNAI; SIVANESWARI, 2013). Essas partículas podem ser obtidas a partir de polímeros biocompatíveis (derivados de celulose e amido, polietilenoglicol e seus copolímeros, álcool polivinílico, ácido hialurônico e seus ésteres) e polímeros biodegradáveis (polilactatos, poliglicólidos, policaprolactonas e quitosana), bem como misturas de polímeros e complexos polieletrólitos (COSTANTINO et al., 2007; VASIR et al., 2003). A maior parte dos estudos de sistemas micro e nanoestruturados mucoadesivos ainda é realizada em centros de pesquisa. A complexidade do escalonamento do nível laboratorial para o industrial é, atualmente, o principal desafio para sua ampla comercialização (KHARENKO et al., 2009; LAFFLEUR, 2016).

Ensaio de mucoadesão *in vitro*

Os ensaios de mucoadesão são importantes para quantificar a eficácia da formulação em aderir ao muco. Variados métodos de carac-

terização, desenvolvidos em diferentes centros de pesquisa, estão descritos na literatura. Contudo, um método de ensaio normatizado e padrão para os ensaios de mucoadesão ainda não foi definido (DAVIDOVICH-PINHAS; BIANCO-PELED, 2010; PEPPAS; SAHLIN, 1996;), devido à grande variabilidade entre as formulações e possibilidade de avaliação da mucoadesão. De forma geral, essas técnicas podem ser classificadas em medidas diretas e indiretas e estão apresentadas nesta seção. A Figura 3 apresenta de forma esquemática exemplos de método direto e indireto, texturômetro e ângulo de contato, respectivamente.

Figura 3 – Representação esquemática de métodos direto e indireto que medem a mucoadesão in vitro; (a) equipamento texturômetro; (b) gráfico força x tempo do texturômetro; (c) medição por ângulo de contato

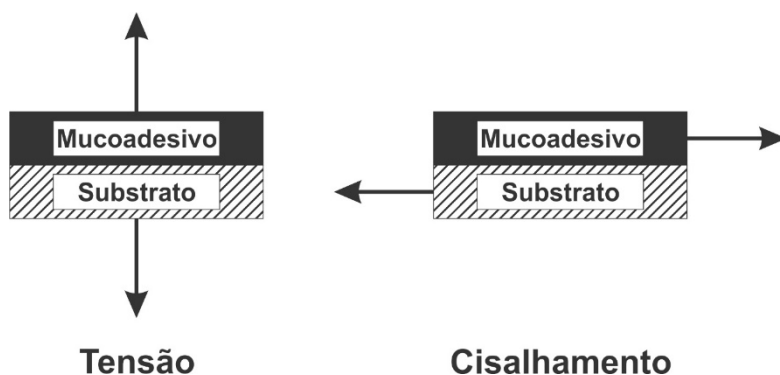


Fonte: Adaptado com autorização de Springer (Alam et al., 2007) e Wolters Kluwer Medknow Publications (Latheeshjal et al., 2011).

Métodos Diretos

A determinação direta da mucoadesão de uma formulação normalmente envolve a quantificação da força necessária para separar a superfície mucoadesiva do muco. Outra abordagem possível é a determinação de outro parâmetro quantitativo envolvido nessa separação, como o tempo. Esses ensaios de mucoadesão *in vitro* são comumente realizados em modo de tensão, no qual a força aplicada atua na direção axial, ou no modo de cisalhamento, e a força atua na direção tangencial (Figura 4).

Figura 4 – Tipos de forças aplicadas em ensaios de mucoadesão *in vitro*



Fonte: Adaptado com autorização de Taylor & Francis (Davidovich-Pinhas e Bianco-Peled, 2010)

O ensaio de tensão é realizado utilizando instrumentos comercialmente disponíveis, tais como máquinas de ensaios mecânicos ou analisadores de textura (texturômetros). Os resultados são normalmente apresentados como força de desprendimento máxima e trabalho total de adesão, que significam a força máxima necessária para quebrar a ligação adesiva e a área sob a curva representando o trabalho de desprendimento, respectivamente (BALOĞLU et al., 2003). O tipo de substrato utilizado para o teste é um parâmetro que influencia diretamente os resultados obtidos. O substrato mais próximo das condições fisiológicas é a superfície mucosa fresca, obtida de fonte animal. Devido à sua disponibilidade limitada, a utilização de outras superfícies é comum (GRABOVAC et al., 2005; VENTER et al., 2006). Os pós de mucina,

por exemplo, são comercialmente disponíveis e amplamente usados na pesquisa. Eles podem ser preparados como solução aquosa concentrada (gel), disco comprimido parcialmente hidratado, filme hidratado ou podem ainda ser utilizados para embeber discos de papel de filtro com solução de mucina (FRANSÉN et al., 2008; MUNASUR et al., 2007). Nesse tipo de teste, há uma variedade de fatores que afetam os resultados, como o tipo de amostra (estado físico, geometria), condições ambientes (seco ou úmido) até os parâmetros de análise (velocidade de desprendimento, força de pré-carga e tempo de contato) (PATIL et al., 2016; PEPPAS; SAHLIN, 1996).

O ensaio dinâmico sob força de cisalhamento pode ser realizado por tempo de duração de mucoadesão, com o método do cilindro rotativo, ou como ensaio de fluxo contínuo. No primeiro, avalia-se a capacidade de formulações mucoadesivas sólidas ou semissólidas de manter contato com a superfície mucosa sob forças de cisalhamento. O parâmetro quantitativo mensurado é o tempo de desprendimento, desintegração e/ou erosão da formulação (BERNKOP-SCHNÜRCH; STEININGER, 2000). No ensaio de fluxo contínuo, a capacidade de um polímero para manter a ligação com a superfície da mucosa sob força de cisalhamento, quando submetida a um fluxo contínuo, é quantificada (BELGAMWAR et al., 2009).

A microscopia de força atômica também permite que as forças moleculares e superficiais sejam mensuradas em uma escala quase molecular, sendo, portanto, adequada para o monitoramento da interação mucina-polímero. O uso dessa técnica estende-se ainda à caracterização da alteração na rugosidade da superfície que ocorre com ligações entre o polímero adesivo e o tecido mucoso (BASSI DA SILVA et al., 2017; Cleary et al., 2004).

Métodos Indiretos

Os ensaios de reologia, espectroscópicos e de energia de superfície / ângulo de contato são uns dos principais métodos indiretos de quantificação da mucoadesividade de uma formulação. Por meio da reologia, é possível monitorar a força de interação das cadeias poliméricas com a

mucina e prever a capacidade de mucoadesão. Dois tipos de experimentos reológicos são empregados: a medida de viscosidade e a relação entre o módulo elástico (G') e o módulo viscoso (G'') (HAY et al., 2017), módulos viscosimétricos que relacionam o comportamento viscoelástico da formulação e sua capacidade de armazenamento e perda de energia frente à deformação (BASSI DA SILVA et al., 2017).

O método espectroscópico detecta a interação do polímero e do muco em ligações químicas. Por meio de um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) acoplado ao modo de reflexão total atenuada (ATR), é possível analisar as interações interfaciais ou a interpenetração entre o filme polimérico e a amostra de mucina hidratada (CILURZO et al., 2005; SRIAMORNSAK et al., 2008). Já as medições dos ângulos de contato podem prever a natureza mucoadesiva da amostra devido ao papel da energia superficial no processo de mucoadesão. Ângulos de contato maiores são indicativos de melhor molhabilidade e indicam o aumento da adesão (DAVIDOVICH-PINHAS; BIANCO-PELED, 2010; SANTOS et al., 2003).

Conclusão

A superfície úmida e aderente da camada mucosa contribui para a aplicação de sistemas mucoadesivos. Essas formulações apresentam-se como alternativas promissoras para o transporte de fármacos para epitélios cobertos por muco, já que podem ser delineadas para promover proteção da mucosa, liberação controlada e direcionamento de agentes ativos a sítios-alvo específicos. Deve-se ter em mente, durante o desenvolvimento de formulações mucoadesivas, quais são as características particulares da mucosa alvo na qual a formulação será administrada e como adaptar a formulação para seu alvo. Diversos métodos para avaliar o desempenho mucoadesivo de formulações são descritos na literatura. Sua padronização e validação, a fim de se obter resultados mais confiáveis e intercambiáveis entre diferentes estudos e centros de pesquisa, são fundamentais e devem acompanhar a evolução da pesquisa na área.

Referências

- AHUJA, A.; ALI, J.; RAHMAN, S. Biodegradable periodontal intrapocket device containing metronidazole and amoxycillin: formulation and characterisation. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 61, n. 1, p. 25-29, 2006.
- AHUJA, A.; KHAR, R. K.; ALI, J. Mucoadhesive drug delivery systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 23, n. 5, p. 489-515, 1997.
- ALAM, M. A.; AHMAD, F. J.; KHAN, Z. I.; KHAR, R. K.; ALI, M. Development and evaluation of acid-buffering bioadhesive vaginal tablet for mixed vaginal infections. **AAPS PharmSciTech**, v. 8, n. 4, p. 229-236, 2007.
- ALBIETZ, D. J.; DOUGLAS, I. Ocular therapeutics. **Clinical and Experimental Optometry**, v. 86, n. 2, p. 131-132, 2003.
- BALOĞLU, E.; ÖZYAZICI, M.; HIZARCIÖĞLU, S.; KARAVANA, H. An in vitro investigation for vaginal bioadhesive formulations: bioadhesive properties and swelling states of polymer mixtures. **Il Farmaco**, v. 58, n. 5, p. 391-396, 2003.
- BASSI DA SILVA, J.; FERREIRA, S. B. D. S.; DE FREITAS, O.; BRUSCHI, M. L. A critical review about methodologies for the analysis of mucoadhesive properties of drug delivery systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, n. just-accepted, p. 1-67, 2017.
- BATCHELOR, H. The Drug Delivery Companies Report. **Autumn/Winter, Pharma Ventures Ltd**, v. 16, 2004a.
- BATCHELOR, H. Novel bioadhesive formulations in drug delivery. **The Drug Delivery Companies Report Autumn/Winter, Pharma Ventures Ltd**, p. 17-21, 2004b.
- BATCHELOR, H. Bioadhesive dosage forms for esophageal drug delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 2, p. 175-181, 2005.
- BELGAMWAR, V.; SHAH, V.; SURANA, S. Formulation and evaluation of oral mucoadhesive multiparticulate system containing metoprolol tartarate: an in vitro-ex vivo characterization. **Current Drug Delivery**, v. 6, n. 1, p. 113-121, 2009.
- BERNKOP-SCHNÜRCH, A.; STEININGER, S. Synthesis and characterisation of mucoadhesive thiolated polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 194, n. 2, p. 239-247, 2000.
- BIRUDARAJ, R.; MAHALINGAM, R.; LI, X.; JASTI, B. R. Advances in buccal drug delivery. **Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 22, n. 3, 2005.

CAMBLIN, M.; BERGER, B.; HASCHKE, M.; KRÄHENBÜHL, S.; HUWYLER, J.; PUCHKOV, M. CombiCap: A novel drug formulation for the basel phenotyping cocktail. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 512, n. 1, p. 253-261, 2016.

CHUN, M.-K.; KWAK, B.-T.; CHOI, H.-K. Preparation of buccal patch composed of carbopol, poloxamer and hydroxypropyl methylcellulose. **Archives of Pharmacal Research**, v. 26, n. 11, p. 973-978, 2003.

CILURZO, F.; SELMIN, F.; MINGHETTI, P.; MONTANARI, L. The effects of bivalent inorganicsalts on the mucoadhesive performance of a polymethylmethacrylate sodium salt. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 301, n. 1, p. 62-70, 2005.

CLEARY, J.; BROMBERG, L.; MAGNER, E. Adhesion of polyether-modified poly (acrylic acid) to mucin. **Langmuir**, v. 20, n. 22, p. 9755-9762, 2004.

COSTANTINO, H. R.; ILLUM, L.; BRANDT, G.; JOHNSON, P. H.; QUAY, S. C. Intranasal delivery: physicochemical and therapeutic aspects. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 337, n. 1, p. 1-24, 2007.

DAVIDOVICH-PINHAS, M.; BIANCO-PELED, H. Mucoadhesion: a review of characterization techniques. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 7, n. 2, p. 259-271, 2010.

FRANSÉN, N.; BJÖRK, E.; EDSMAN, K. Changes in the mucoadhesion of powder formulations after drug application investigated with a simplified method. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 9, p. 3855-3864, 2008.

GARTI, N. **Delivery and controlled release of bioactives in foods and nutraceuticals**. Elsevier, 2008.

GÉRAUD, B.; JØRGENSEN, L.; YBERT, C.; DELANOË-AYARI, H.; BARENTIN, C. Structural and cooperative length scales in polymer gels. **The European Physical Journal E**, v. 40, n. 1, p. 5, 2017.

GRABOVAC, V.; GUGGI, D.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Comparison of the mucoadhesive properties of various polymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 11, p. 1713-1723, 2005.

HAY, W. T.; BYARS, J. A.; FANTA, G. F.; SELLING, G. W. Rheological characterization of solutions and thin films made from amylose-hexadecylammonium chloride inclusion complexes and polyvinyl alcohol. **Carbohydrate Polymers**, 2017.

KHARENKO, E.; LARIONOVA, N.; DEMINA, N. Mucoadhesive drug delivery systems (Review). **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 43, n. 4, p. 200-208, 2009.

KHUTORYANSKIY, V. V. Advances in mucoadhesion and mucoadhesive polymers. **Macromolecular Bioscience**, v. 11, n. 6, p. 748-764, 2011.

LAFFLEUR, F. Mucoadhesive therapeutic compositions: a patent review (2011-2014). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 26, n. 3, p. 377-388, 2016.

LATHEESHJAL, L.; MURALA, S.; VAIDYA, M.; SWETHA, G. Mucoadhesive Drug Delivery System: An Overview. **International Journal of PharmTech Research**, v. 3, n. 1, p. 42-49, 2011.

LEE, J. W.; PARK, J. H.; ROBINSON, J. R. Bioadhesive-based dosage forms: The next generation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, n. 7, p. 850-866, 2000.

LOHANI, A.; CHAUDHARY, G. P. Mucoadhesive microspheres: A novel approach to increase gastroretention. **Chronicles of Young Scientists**, v. 3, n. 2, p. 121, 2012.

LONGER, M.; ROBINSON, J. Fundamental-aspects of bioadhesion. **Pharmacy International**, v. 7, n. 5, p. 114-117, 1986.

LUDWIG, A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 11, p. 1595-1639, 2005.

MUNASUR, A. P.; GOVENDER, T.; MACKRAJ, I. Using an experimental design to identify and quantify the effects of environment related test parameters on the in vitro mucoadhesivity testing of a propranolol buccal tablet. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 33, n. 7, p. 709-716, 2007.

NAPPINNAI, M.; SIVANESWARI, S. Formulation optimization and characterization of gastroretentive cefpodoxime proxetil mucoadhesive microspheres using 3 2 factorial design. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7, n. 4, p. 304-309, 2013.

OKAMOTO, H.; TAGUCHI, H.; IIDA, K.; DANJO, K. Development of polymer film dosage forms of lidocaine for buccal administration: I. Penetration rate and release rate. **Journal of Controlled Release**, v. 77, n. 3, p. 253-260, 2001.

PATIL, H.; TIWARI, R. V.; REPKA, M. A. Recent advancements in mucoadhesive floating drug delivery systems: A mini-review. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 31, p. 65-71, 2// 2016.

PEPPAS, N. A.; SAHLIN, J. J. Hydrogels as mucoadhesive and bioadhesive materials: a review. **Biomaterials**, v. 17, n. 16, p. 1553-1561, 1996.

PREETHA, A.; BANERJEE, R. Comparison of artificial saliva substitutes. **Trends Biomater Artif Organs**, v. 18, n. 2, p. 178-186, 2005.

RAJARAM, D. M.; LAXMAN, S. D. Buccal Mucoadhesive Films: A Review. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 8, n. 1, 2017.

REINEKE, J.; CHO, D.; DINGLE, Y.; CHEIFETZ, P.; LAULICHT, B.; LAVIN, D.; FURTADO, S.; MATHIOWITZ, E. Can bioadhesive nanoparticles allow for

more effective particle uptake from the small intestine? **Journal of Controlled Release**, v. 170, n. 3, p. 477-484, 2013.

SALAMAT-MILLER, N.; CHITTCHANG, M.; JOHNSTON, T. P. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 11, p. 1666-1691, 2005.

SANTOS, C.; FREEDMAN, B.; GHOSN, S.; JACOB, J.; SCARPULLA, M.; MATHIOWITZ, E. Evaluation of anhydride oligomers within polymer microsphere blends and their impact on bioadhesion and drug delivery in vitro. **Biomaterials**, v. 24, n. 20, p. 3571-3583, 2003.

SHANKAR, N. B.; KUMAR, R. P.; KUMAR, N. U.; BRATA, B. B. Development and characterization of bioadhesive gel of microencapsulated metronidazole for vaginal use. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR**, v. 9, n. 3, p. 209, 2010.

SMART, J. D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 11, p. 1556-1568, 2005.

SOUSA, J.; ALVES, G.; OLIVEIRA, P.; FORTUNA, A.; FALCÃO, A. Intranasal delivery of ciprofloxacin to rats: A topical approach using a thermoreversible in situ gel. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, p. 30-37, 2017.

SRIAMORNSAK, P.; WATTANAKORN, N.; NUNTHANID, J.; PUTTIPIATKHACHORN, S. Mucoadhesion of pectin as evidence by wettability and chain interpenetration. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 3, p. 458-467, 2008.

UGWOKE, M. I.; AGU, R. U.; VERBEKE, N.; KINGET, R. Nasal mucoadhesive drug delivery: background, applications, trends and future perspectives. **Advanced Drug Delivery reviews**, v. 57, n. 11, p. 1640-1665, 2005.

VALENTA, C. The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 11, p. 1692-1712, 2005.

VAN ROEY, J.; HAXAIRE, M.; KAMYA, M.; LWANGA, I.; KATABIRA, E. Comparative efficacy of topical therapy with a slow-release mucoadhesive buccal tablet containing miconazole nitrate versus systemic therapy with ketoconazole in HIV-positive patients with oropharyngeal candidiasis. **JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 35, n. 2, p. 144-150, 2004.

VASIR, J. K.; TAMBWEKAR, K.; GARG, S. Bioadhesive microspheres as a controlled drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 255, n. 1, p. 13-32, 2003.

VENTER, J.; KOTZE, A.; AUZELY-VELTY, R.; RINAUDO, M. Synthesis and evaluation of the mucoadhesivity of a CD-chitosan derivative. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 313, n. 1, p. 36-42, 2006.

WILLATS, W. G.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 3, p. 97-104, 2006.

YADAV, A. J.; DESHMUKH, G. A Comprehensive Review on Gastro-retentive Drug Delivery System. **International Research Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, p. 1-28, 2016.

YANG, X.; ROBINSON, J. Bioadhesion in mucosal drug delivery. **Biorelated Polymers and Gels, Academic Press, San Diego, CA**, p. 135-192, 1998.

ZHANG, L.; RUSSELL, D.; CONWAY, B. R.; BATCHELOR, H. Strategies and therapeutic opportunities for the delivery of drugs to the esophagus. **Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 25, n. 3, 2008.

15.

ADMINISTRAÇÃO PULMONAR DE FÁRMACOS: BARREIRAS BIOLÓGICAS E DESAFIOS A SEREM TRANSPOSTOS

ANA PAULA BERNARDES ALMEIDA
ELIANA MARTINS LIMA
THAIS LEITE NASCIMENTO

Esforços crescentes têm sido empregados no desenvolvimento de formulações de fármacos para administração local nos pulmões. A aplicação direta nos pulmões oferece as vantagens de permitir o acesso imediato do fármaco no local de ação e de facilitar a administração não-invasiva de grande quantidade de fármaco (NASCIMENTO et al., 2012). A via inalatória de administração possibilita ainda atingir maiores concentrações pulmonares locais do agente terapêutico com uma dose total consideravelmente menor do que a necessária para a administração sistêmica, resultando em menor risco de toxicidade e efeitos adversos. A administração de fármacos através dessa via envolve vários desafios (NASCIMENTO et al., 2012).

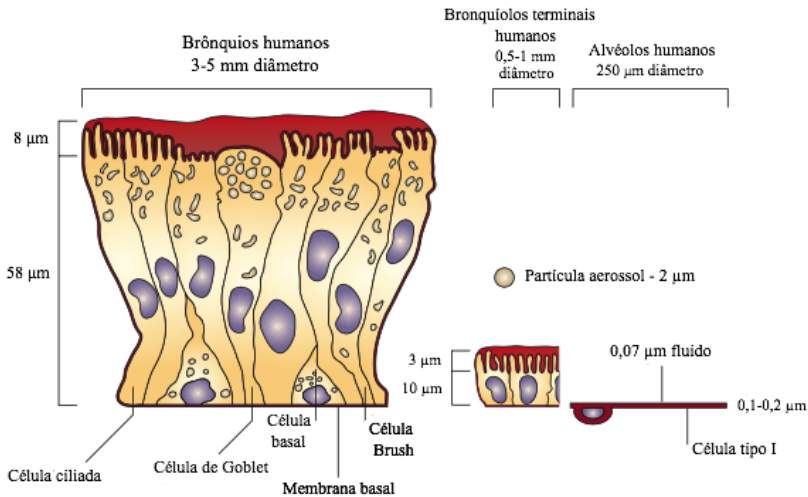
Este capítulo tem como objetivo a descrição das barreiras biológicas e desafios que as formulações para administração pulmonar precisam transpor para promover o efeito terapêutico desejado. Propriedades aerodinâmicas da formulação, depuração mucociliar, estabilidade da formulação no fluido bronco-alveolar e penetração celular são aspectos relacionados à interação da formulação com o caminho percorrido até as células e estão diretamente relacionados ao sucesso da terapia. Assim, este estudo contribuirá para o delineamento de formulações para administração local nos pulmões. Ele orientará o desenvolvimento de formu-

lações destinadas a esta via de administração altamente relevante, promovendo avanço do conhecimento na área.

O sistema respiratório como via de administração

O sistema respiratório possui diferentes superfícies que se modificam de acordo com a evolução da sua segmentação. O trato respiratório superior, que compreende traqueia, brônquios e bronquíolos, possui um epitélio colunar povoado por células ciliadas e secretoras de muco que culmina em uma fina membrana (0,1-0,2 μm de espessura), composta por células alveolares tipo I nos alvéolos após 16-17 sucessivas bifurcações (PATTON, 1996). As células alveolares tipo I têm como função primária o revestimento da unidade funcional dos pulmões, enquanto que as células alveolares tipo II contribuem para o reparo local, diferenciando-se em células alveolares tipo I quando necessário. Os sacos alveolares possuem uma vasta área de superfície de mais de 100 m^2 (FEHRENBACH, 2001), onde ocorrem as trocas gasosas entre meio externo e corrente sanguínea, com absorção de oxigênio pelo órgão e liberação de dióxido de carbono através de barreiras semipermeáveis, as células tipo I (Figura 1) (PATTON; BYRON, 2007; STONE et al., 1992;).

Figura 1 – Espessura das diferentes regiões do epitélio pulmonar. Quanto mais profunda a região, mais fino é o epitélio que separa o meio externo da corrente sanguínea. Nos alvéolos, o epitélio possui apenas 0,1-0,2 μm de espessura. A camada em vermelho representa a barreira aquosa (muco ou surfactante alveolar) que diminui progressivamente até a espessura de <1 μm nos alvéolos



Fonte: Adaptado com autorização de Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Drug Discovery (Patton e Byron, 2007).

A terapia inalatória conquistou grande atenção nos últimos anos como forma de administração alternativa de fármacos e outros ativos biológicos (BACKMAN et al., 2014; LIM et al., 2009; MANSOUR; RHEE; WU, 2009; SHAM et al., 2004). O estabelecimento de uma interface de fácil acesso pelo meio externo caracteriza essa via como promissora, principalmente para administração de proteínas e ácidos nucleicos (NASCIMENTO et al., 2015; YANG et al., 2013; ZHAO et al., 2011). Isso porque, nos alvéolos pulmonares, a distância que separa o espaço alveolar da corrente sanguínea é de apenas 0,5 μm e 1,0 μm de comprimento, devido à reduzida espessura do epitélio alveolar (SCHEUCH et al., 2006).

Assim, a escolha da via pulmonar para administração de substâncias terapêuticas apresenta vantagens em relação às demais vias, como: diminuição de efeitos adversos, devido à menor exposição sistêmica ao fármaco; o escape dos efeitos de primeira passagem pelo fígado, já que os ativos entram diretamente na circulação sistêmica; o caráter não invasivo da administração, comparado à via parenteral, e o rápido início de ação, pois, ao ser inalado e depositado nos alvéolos pulmonares, o fármaco é absorvido dentro de minutos a segundos à corrente sanguínea (PATTON; BYRON, 2007; SCHEUCH et al., 2006). A via pulmonar, dessa forma, pode ser explorada tanto para o tratamento local, direcionado às condições patológicas e/ou outras desordens do trato respiratório, como para tratamento sistêmico de outras doenças no organismo.

Barreiras biológicas à administração de medicamentos

O conhecimento dos mecanismos de barreira de que dispõe a via respiratória é fundamental para o sucesso no desenvolvimento de formulações a serem administradas nos pulmões. Dentre eles, dois podem ser citados como principais: a barreira mecânica, relacionada à própria fisiologia e anatomia do pulmão e das vias aéreas superiores (GRONEBERG et al., 2003) e a barreira imunológica, basicamente composta pelos sistemas de imunidade inata e de imunidade adquirida. Os macrófagos alveolares e neutrófilos recrutados compõem a imunidade inata atuante no pulmão, enquanto que a imunidade adquirida é realizada por linfócitos T e B, células plasmáticas e imunoglobulinas (Ig) secretadas (LAMBRECHT; NEYT; GEURTSVANKESSEL, 2011).

A barreira mecânica de proteção do sistema respiratório inicia-se nas narinas. Os cílios presentes nessa região impedem mecanicamente a passagem de micro-organismos e partículas presentes no ar. Por isso, apesar de a administração de aerossóis poder ser feita via nasal ou inalação oral, a última é preferida (GRONEBERG et al., 2003). O segundo mecanismo que constitui a defesa mecânica do sistema respiratório é sua segmentação progressiva em traqueia, brônquios, bronquíolos e alvéolos pulmonares (RUDOKAS et al., 2016). Durante seu trajeto, dependendo do diâmetro e densidade, as partículas colidem sucessiva-

mente nas paredes da árvore brônquica e acabam se depositando antes de atingir as porções mais profundas dos pulmões (LAMBRECHT; NEYT; GEURTSVANKESSEL, 2011).

Quando todos esses mecanismos falham na expulsão de partículas do sistema respiratório, a depuração mucociliar irá aprisionar e deslocar as partículas e micro-organismos que aderiram ao muco pulmonar em direção à orofaringe. Consequentemente, eles serão deglutidos e eliminados através do trato gastrointestinal (LAMBRECHT; NEYT; GEURTSVANKESSEL, 2011). A depuração mucociliar ocorre com a ajuda das células ciliadas, que se encontram na parede epitelial das vias aéreas e são responsáveis pela propulsão do muco através do batimento ciliar (DE SOUZA CARVALHO; DAUM; LEHR, 2014).

O muco é constituído basicamente por fibras de mucinas em ligações cruzadas. As mucinas são glicoproteínas produzidas predominantemente pelas células de Goblet e que formam um gel, caracterizando a viscosidade do muco de cerca de 1000 – 10000 vezes maior do que a da água (LAI; WANG; HANES, 2009; THORNTON; SHEEHAN, 2004). O grande desafio no *design* de partículas capazes de transpor essa barreira tem sido desenvolvê-las de modo que possam movimentar-se livremente, sem que sejam aprisionadas no emaranhado constituinte do muco.

Em um estudo de difusão no muco cervical feito por micrografias eletrônicas, porém, sugeriu-se a existência de poros de viscosidade próxima à água de aproximadamente 100 – 200 nm de diâmetro no emaranhado de fibras de mucinas. Essas fibras ligam-se frouxamente, permitindo a formação dos poros. Assim, entende-se que partículas menores que ~100 nm são capazes de difundir-se através dos poros de baixa viscosidade no emaranhado mucoso. Esse achado colabora para o desenvolvimento de partículas mucopenetrantes transportadoras de fármacos (SALTZMAN et al., 1994).

Entretanto, mesmo que partículas de tamanho compatível aos poros do muco tentem difundir-se através dele, ainda assim, só o farão se forem desenhadas de modo a driblar possíveis interações químicas com os constituintes do muco. Dois mecanismos principais podem

ocorrer entre constituintes químicos do muco e macromoléculas/partículas: interações adesivas polivalentes (NORRIS; SINKO, 1997) e interações eletrostáticas.

Interações adesivas ocorrem pela atração de forças hidrofóbicas entre regiões específicas dos monômeros de mucina e o material adsorvido. Essas forças são consideradas fracas, mas, ocorrendo em diferentes regiões do emaranhado mucoso, têm alto poder de aprisionamento de partículas. Grupos carboxila e sulfato das cadeias dos proteoglicanos de mucina contribuem nessa interação. Quanto à interação eletrostática, a carga total do muco é negativa, e assim, pressupõe-se que partículas carregadas de carga contrária associam-se eletrostaticamente ao muco, sendo também aprisionadas (LAI; WANG; HANES, 2009).

Seguindo seu trajeto em direção ao trato respiratório inferior, as moléculas/partículas entrarão em contato com o surfactante que reveste os alvéolos pulmonares. O surfactante alveolar é composto por aproximadamente 90% de fosfolipídios, fosfatidilcolinas e fosfatidilgliceróis, em sua maioria. Os outros 10% são proteínas específicas do surfactante (SP, *surfactant proteins*), das quais SP-A e SP-D são os grupos predominantes. Seus componentes agem de modo a diminuir a tensão superficial alveolar durante os ciclos de contração e expansão, a fim de evitar colapso do alvéolo (BECK-BROICHSITTER et al., 2011; GOERKE, 1998).

Por fim, uma vez no epitélio alveolar, as moléculas/partículas poderão ser fagocitadas por células residentes do tecido local. Como parte do mecanismo de defesa imunológica do organismo, o sistema mononuclear fagocitário, constituído por macrófagos, representa uma das primeiras linhas de defesa na região alveolar dos pulmões quando em contato com patógenos e/ou partículas inaladas do meio externo (ALEXIS et al., 2006; STONE et al., 1992). Dessa forma, partículas que se depositarem nessa região poderão sofrer internalização e serão neutralizadas.

Além disso, a adsorção de proteínas à superfície de nanopartículas (fenômeno conhecido pela formação de coroa proteica), após seu contato com o meio biológico do paciente, será fator determinante para que a partícula transportadora de fármaco exerça sua função. A formação da coroa proteica poderá influenciar no reconhecimento celular, tanto pelo

epitélio pulmonar e sua internalização pelas células do tecido, como para sua depuração através de células de limpeza, como os próprios macrófagos alveolares. O grau de interação entre macrófagos e partículas depende, então, da adsorção de proteínas do fluido surfactante alveolar. A partir dessa descoberta, chegou-se à conclusão de que a interação com macrófagos pode ser modulada de acordo com o material da superfície das partículas. Proteínas adsorvidas à coroa proteica de nanopartículas podem ocultar, estericamente, grupos químicos superficiais responsáveis pela interação com receptores celulares e internalização. Essa furtividade também pode ser obtida através de modificações no tamanho e carga superficial das partículas (RUGE et al., 2011).

O desenvolvimento de formulações para administração pulmonar tem como objetivo driblar as principais barreiras do sistema respiratório para viabilizar o tratamento local de tumores, infecções e doenças respiratórias crônicas. A nanomedicina abre portas para a aplicação de uma variedade de estruturas como nanopartículas poliméricas, lipossomas, entre outras, que, inclusive, já estão em constante desenvolvimento e investigação clínica no desenvolvimento de formulações para tratamentos alvo-direcionados, proporcionando reduzidos efeitos colaterais e melhor eficácia (RUDOKAS et al., 2016).

Estratégias para administração pulmonar de fármacos

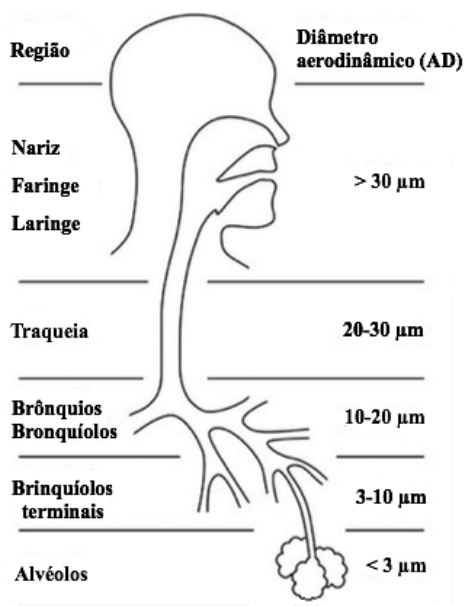
Aerossóis

Os aerossóis são utilizados na administração de formulações líquidas. Essas formulações devem, idealmente conter, além dos fármacos seguros e eficazes, uma quantidade mínima de excipientes inertes em sua composição. As partículas geradas devem ser homogêneas e apresentar tamanho correspondente à região alvo (trato respiratório superior ou inferior) (SHAIKH et al., 2010). A deposição das partículas é determinada por diversos parâmetros que devem ser bem estudados no delineamento de novas tecnologias de administração pulmonar: parâmetros físicos, que regem propriedades das partículas, como seu diâmetro aerodinâmico; químicos, como propriedade do fármaco ou ativo bioló-

gico a ser administrado e composição química do carreador e fisiológicos, como padrão de respiração do paciente, doenças do trato respiratório, que são de difícil controle (SCHEUCH et al., 2006) e fogem do escopo deste capítulo.

O tamanho das partículas constitui fator crítico à sua administração e eficiente deposição. O tamanho geométrico, formato e densidade são considerados na determinação do diâmetro aerodinâmico das partículas (AD, *aerodynamic diameter*). O AD das partículas afeta diretamente a magnitude das forças, atuando sobre elas. Enquanto os efeitos de inércia e força gravitacional aumentam com o aumento do tamanho da partícula, a difusão produz maior deslocamento, à medida que o tamanho da partícula diminui (Figura 2) (NASCIMENTO; HILL-AIREAU; FATTAL, 2012).

Figura 2 – Padrão de deposição de partículas no trato respiratório em função de seu diâmetro aerodinâmico



Fonte: Adaptado com autorização de Journal of Drug Delivery Science and Technology (Nascimento et al., 2012).

Partículas grandes ($AD > 5 \mu m$) geralmente se chocam com as paredes das vias aéreas em bifurcações. Por esse motivo, elas acabam depositadas nas vias aéreas superiores, como a parte de trás da garganta ou faringe (SUAREZ; HICKEY, 2000). Quando o AD das partículas é de 1 a $5 \mu m$, elas são sujeitas à sedimentação por força gravitacional, o que ocorre em vias aéreas inferiores e bronquíolos respiratórios. Considera-se $1-3 \mu m$ como tamanho ideal para uma eficiente deposição das partículas no trato respiratório inferior (SAKAGAMI, 2006; TSAPIS et al., 2002).

Nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas carreadoras de fármacos são preparadas a partir de polímeros biodegradáveis ou biocompatíveis e classificadas como nanocápsulas ou nanoesferas. Nanocápsulas são constituídas por um núcleo oleoso e uma membrana polimérica, já as nanoesferas não possuem essa fase oleosa, mas um núcleo denso, constituído pelo polímero. Dentre as vantagens do uso desses carreadores, estão a capacidade de proteção do princípio ativo contra degradação (SCHAFFAZICK et al., 2005) e possibilidade de liberação controlada do ativo (MANSOUR; RHEE; WU, 2009) em função do polímero utilizado.

A modificação na superfície das partículas é uma estratégia usada para direcioná-las a um alvo específico no organismo, torná-las invisíveis ao sistema imune, modificar suas propriedades físico-químicas, entre outros. Por exemplo, o revestimento de nanopartículas com quitosana é uma estratégia usada para aumentar sua capacidade de adesão ao muco das formulações administradas por via pulmonar (VARSHOSAZ; TAYMOURI; HAMISHEHKAR, 2014; YAMAMOTO et al., 2005). Dessa maneira, partículas mucoadesivas terão sua depuração mucociliar diminuída, devido às interações de grupos químicos com as mucinas e a absorção do ativo será favorecida em função do maior contato com o epitélio subjacente à camada mucosa.

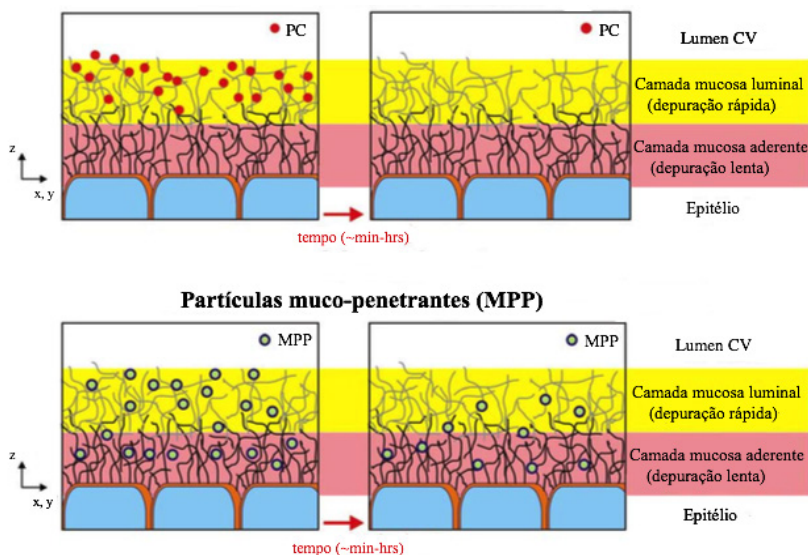
Outro exemplo é a inserção do antagonista ao receptor CXCR4, envolvido em processos de metástase, em nanopartículas de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) (CHITTASUPHO et al., 2014). A

vetorização de fármacos antitumorais através da sua encapsulação em nanopartículas pode diminuir a citotoxicidade provocada no tratamento do câncer de pulmão. A modificação aumenta a concentração de doxorrubicina nas células-alvo e, ainda, proporciona uma liberação controlada do quimioterápico em função da presença do polímero de PLGA. O PLGA é um dos polímeros mais seguros para desenvolvimento de nanopartículas. Sua degradação no organismo produz ácido láctico e glicólico, que são prontamente metabolizados no ciclo de Krebs (MIRAKABAD et al., 2014).

Apesar do caráter biodegradável dos polímeros, sua taxa de degradação deve ser estudada quanto à potencial capacidade de causar processos inflamatórios ao tecido pulmonar (PARANJPE; MULLER-GOYMANN, 2014). Nesses casos, estudos *in vivo* são importantes ferramentas para auxiliar na escolha do polímero a ser utilizado e para determinação da sua segurança (MENON et al., 2014).

Sistemas mucoadesivos são incapazes de atravessar a barreira mucosa e transpor o epitélio. Dessa forma, essas partículas não são adequadas para o transporte de fármacos que requerem liberação intracelular. Para transpor essa barreira, a estratégia de desenvolvimento de formulações capazes de atravessar o muco, com partículas mucopetrantes ou mucoinertes (MPPs, *mucus-penetrating particles*), tem sido explorada (Figura 3). Resultados promissores de transporte de moléculas de DNA ou RNA interferente (siRNA) já foram observados (LAI; WANG; HANES, 2009).

Figura 3 – Ilustração esquemática do comportamento de partículas mucopenetrantes (MPP) e partículas mucoadesivas convencionas (PC) administradas à uma superfície mucosa. Enquanto as MPPs prontamente penetram a camada mucosa aderente, as PCs não são capazes de vencer a camada mucosa, ficando imobilizadas. Assim, as células epiteliais serão expostas ao fármaco por mais tempo quando estes forem transportados por MPPs, ao contrário das PCs.



Fonte: Adaptado com autorização de Macmillan Publishers Ltd: Advanced Drug Delivery Reviews (Lai; Wang e Hanes, 2009)

Partículas MPPs apresentam uma carga superficial total neutra, devido à presença do polímero polietilenoglicol (PEG) (LAI; WANG; HANES, 2009). O PEG é um polímero neutro, tradicionalmente usado no desenvolvimento de partículas furtivas, conferindo a elas maior tempo de circulação e reduzida opsonização por proteínas do meio em que se encontram (POZZI et al., 2014). O baixo peso molecular do polímero não permite sua interação com o muco, além de ocultar efetivamente cargas e regiões hidrofóbicas das partículas, que poderiam permitir essa interação, causando sua imobilização (LAI; WANG; HANES, 2009).

Nanopartículas porosas – agregados de partículas

Agregados que combinam em sua estrutura características de micropartículas e nanopartículas ao mesmo tempo, as PNAPs (*porous nanoparticle-aggregate particles*), são uma estratégia para aumentar o sucesso da deposição alveolar (LIANG, ZHENGLIN et al., 2015). As PNAPs possuem uma “casca” deformável de nanopartículas, que confere baixa densidade ao agregado (aproximadamente $0,1 \text{ g/cm}^3$) e, consequentemente, favoráveis propriedades aerodinâmicas. Seu tamanho pode variar de 26 nm a 3 μm , aproximadamente, favorecendo a deposição nas regiões mais profundas dos pulmões. Quando em contato com os fluidos, as PNAPs desintegram-se em nanopartículas e liberam o fármaco localmente (TSAPIS et al., 2002). Dessa forma, essa estratégia permite o desenvolvimento de formulações aerossolizadas, modulando a faixa de tamanho e densidade das nanopartículas para maior deposição.

Lipossomas

Os lipossomas são constituídos basicamente por fosfolipídios, compostos anfifílicos, dispersos em meio aquoso, formando bicamadas que se organizam concêntricamente (DARAEI et al., 2014). Dentre as vantagens do uso dos lipossomas em relação às nanopartículas, está a boa compatibilidade entre os lipídios e o tecido pulmonar, devido à sua pré-existência no órgão (LIANG et al., 2015). Outras vantagens foram alcançadas pela evolução desse carreador, que lhe permitiu, através de modificações superficiais e uso de conjugados lipídicos inseridos na bicamada dos lipossomas, maior estabilidade, propriedades farmacocinéticas melhoradas e maior eficiência terapêutica (BOZZUTO; MOLINARI, 2015).

Em alguns casos, como no combate a patógenos intracelulares, os alvos terapêuticos podem ser os próprios macrófagos ou monócitos (WEISS; SCHAIKLE, 2015). Nesse caso, deseja-se a internalização das partículas pelos macrófagos residentes dos alvéolos para liberação intracelular do fármaco. Essa estratégia pode ser conquistada através de modificações na composição lipídica dos lipossomas para o controle de propriedades de tamanho, carga e a inclusão de ligantes como proteí-

nas, anticorpos, polissacarídeos, entre outros (KELLY; JEFFERIES; CRYAN, 2011). Essas estratégias fazem, portanto, uso das características dos receptores expressados por macrófagos e seu processo inato em fagocitar corpos estranhos ao organismo. Por exemplo, o uso de anticorpos não-específicos na superfície dos lipossomas, provocará sua opsonização por proteínas do meio, que serão reconhecidas pelos macrófagos, causando a internalização desses lipossomas, obtendo-se, assim, sucesso no direcionamento do fármaco (KELLY; JEFFERIES; CRYAN, 2011; YAN; SCHERPHOF; KAMPS, 2005).

Ainda sobre a liberação intracelular de fármacos por lipossomas pela via pulmonar, a administração de ácidos nucleicos tem chamado atenção como nova abordagem de tratamento. Os lipoplexos são assim denominados pela formação de complexos entre estruturas lipossomais e ácidos nucleicos: através de interações eletrostáticas, as cargas negativas dos ácidos nucleicos se associarão às cargas positivas de lipídios catiônicos da bicamada lipídica dos lipossomas (ELHISSI et al., 2014). Os lipoplexos têm sido usados por essa via no tratamento do câncer de pulmão e tumores sólidos, principalmente, através de terapia gênica de silenciamento (LI et al., 2011). Dessa forma, pequenas moléculas de RNA (siRNA, *small interfering RNA*) ao serem liberadas no interior celular, provocarão a degradação do RNAm do gene alvo, silenciando, assim, a expressão da condição tratada.

Lipoplexos desenhados para essa finalidade são vetorizados para que se acumulem de forma efetiva nas células-alvo. Por exemplo, lipoplexos de superfície modificada com ácido hialurônico (HA, *hyaluronic acid*), ao serem administrados pelo pulmão, serão direcionados ao receptor natural do polímero, o CD44. Esse receptor é altamente expresso em células de processos tumorais. Assim, as moléculas de siRNA serão entregues de forma efetiva e mais concentrada nessas células (ARPICCO; DE ROSA; FATTAL, 2013; NASCIMENTO et al., 2015; TAETZ et al., 2009).

Entretanto, uma desvantagem durante a administração dessas partículas é a força de cisalhamento, possivelmente provocado por nebulizadores com importante efeito na estabilidade de ácidos nucleicos

(LABIRIS; DOLOVICH, 2003). Logo, o aumento da razão lipídio-ácido nucleico tem efeito positivo sobre a transfecção, o que pode ser atribuído ao efeito protetor do lipídio para a molécula (GUILLAUME et al., 2001). Outra estratégia para contornar essa desvantagem é uso de lipídios chamados *helpers* (do inglês, “ajudantes”), que possivelmente facilitam entrega do material à célula. Assim, o lipídio dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE) tem sido usado na composição de lipossomas por ser capaz de melhorar resultados de transfecção para determinadas formulações (KEARNS; PATEL; SAVVA, 2010).

Conclusão

A administração pulmonar de fármacos tem provado ser uma via de grande eficiência para tratamentos sistêmicos e locais e que proporciona significativas vantagens em relação às demais vias, como oral e parenteral. O conhecimento aprofundado das principais barreiras a essa administração é necessário no entendimento e *design* de estruturas que sejam capazes de vencê-las. Assim, a nanotecnologia desempenha papel importante para a realização desse feito. Nanopartículas são reconhecidas como sistemas ideais de carregamento de fármacos, pois seu tamanho reduzido proporciona adequadas características aerodinâmicas e físico-químicas à formulação. Além disso, a possibilidade de direcionamento à alvos específicos, com diminuição de efeitos colaterais, e liberação controlada do fármaco colocam esses sistemas à primeira escolha. Entretanto, na seleção do carreador mais adequado, fatores como características físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas do fármaco administrado, bem como o alvo terapêutico devem ser analisados para que o sucesso terapêutico seja alcançado. Dessa forma, torna-se possível a liberação controlada de fármacos e outros ativos biológicos, como ácidos nucleicos e proteínas, junto ao epitélio mucoso e/ou ao interior de suas células constituintes. Portanto, o uso da nanotecnologia em formulações de medicamentos para administração pulmonar tem grande potencial, contribuindo para o desenvolvimento de tratamentos alvo-direcionados que certamente farão parte do futuro da medicina.

Referências

- ALEXIS, N. E.; LAY, J. C.; ZEMAN, K. L.; GEISER, M.; KAPP, N.; BENNETT, W. D. In vivo particle uptake by airway macrophages in healthy volunteers. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 34, n. 3, p. 305-13, 2006.
- ARPICCO, S.; DE ROSA, G.; FATTAL, E. Lipid-Based Nanovectors for Targeting of CD44-Overexpressing Tumor Cells. **Journal of Drug Delivery**, v. 2013, n. 4, p. 1-8, 2013.
- BACKMAN, P.; ADELMANN, H.; PETERSSON, G.; JONES, C. B. Advances in inhaled technologies: understanding the therapeutic challenge, predicting clinical performance, and designing the optimal inhaled product. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 95, n. 5, p. 509-20, 2014.
- BECK-BROICHSITTER, M.; RUPPERT, C.; SCHMEHL, T.; GUENTHER, A.; BETZ, T.; BAKOWSKY, U.; SEEGER, W.; KISSEL, T.; GESSLER, T. Biophysical investigation of pulmonary surfactant surface properties upon contact with polymeric nanoparticles in vitro. **Nanomedicine**, v. 7, n. 3, p. 341-50, 2011.
- BOZZUTO, G.; MOLINARI, A. Liposomes as nanomedical devices. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 975-99, 2015.
- CHITTASUPHO, C.; LIRDPRAPAMONGKOL, K.; KEWSUWAN, P.; SARISUTA, N. Targeted delivery of doxorubicin to A549 lung cancer cells by CXCR4 antagonist conjugated PLGA nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, n. 2, p. 529-38, 2014.
- DARAE, H.; ETEMADI, A.; KOUHI, M.; ALIMIRZALU, S.; AKBARZADEH, A. Application of liposomes in medicine and drug delivery. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 381-391, 2014.
- DE SOUZA CARVALHO, C.; DAUM, N.; LEHR, C. M. Carrier interactions with the biological barriers of the lung: Advanced in vitro models and challenges for pulmonary drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 75, n. Supplement 1, p. 129-140, 2014.
- ELHISSI, A.; UL HASSAN, I.; PAPAPANOU, A.; ZEB, N.; TAYLOR, K. M. G. Cationic Liposomes as Model Nonviral Vectors for Pulmonary Delivery of DNA. **BS:ADPLAN**, v. 19, p. 53-66, 2014.
- FEHRENBACH, H. Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. **Respiratory Research**, v. 2, n. 1, p. 33-46, 2001.
- GOERKE, J. Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. **BBADIS BBA – Molecular Basis of Disease**, v. 1408, n. 2, p. 79-89, 1998.

GRONEBERG, D. A.; WITT, C.; WAGNER, U.; CHUNG, K. F.; FISCHER, A. Fundamentals of pulmonary drug delivery. **YRMED Respiratory Medicine**, v. 97, n. 4, p. 382-387, 2003.

GUILLAUME, C.; DELÈPINE, P.; DROAL, C.; MONTIER, T.; TYMEN, G.; CLAUDE, F. Aerosolization of cationic lipid-DNA complexes: lipoplex characterization and optimization of aerosol delivery conditions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 286, n. 3, p. 464-71, 2001.

KEARNS, M. D.; PATEL, Y. N.; SAVVA, M. Physicochemical characteristics associated with transfection of cationic cholesterol-based gene delivery vectors in the presence of DOPE. **CPL Chemistry and Physics of Lipids**, v. 163, n. 8, p. 755-764, 2010.

KELLY, C.; JEFFERIES, C.; CRYAN, S.-A. Targeted Liposomal Drug Delivery to Monocytes and Macrophages. **Journal of Drug Delivery Journal of Drug Delivery**, v. 2011, n. 5, p. 1-11, 2011.

LABIRIS, N. R.; DOLOVICH, M. B. Pulmonary drug delivery. Part II: The role of inhalant delivery devices and drug formulations in therapeutic effectiveness of aerosolized medications. **BCP British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 56, n. 6, p. 600-612, 2003.

LAI, S. K.; WANG, Y. Y.; HANES, J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 2, p. 158-71, 2009.

LAMBRECHT, B. N.; NEYT, K.; GEURTSVANKESSEL, C. H. Chapter 2: Pulmonary defence mechanisms and inflammatory pathways in bronchiectasis. **European Respiratory Monograph**, v. 52, p. 11-21, 2011.

LI, P.; LIU, D.; SUN, X.; LIU, C.; LIU, Y.; ZHANG, N. A novel cationic liposome formulation for efficient gene delivery via a pulmonary route. **Nanotechnology**, v. 22, n. 24, p. 245104, 2011.

LIANG, Z.; NI, R.; ZHOU, J.; MAO, S. Recent advances in controlled pulmonary drug delivery. **DRUDIS Drug Discovery Today**, v. 20, n. 3, p. 380-389, 2015.

LIM, S. H.; PARK, H. W.; SHIN, C. H.; KWON, J. H.; KIM, C. W. Human insulin microcrystals with lactose carriers for pulmonary delivery. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 73, n. 12, p. 2576-82, 2009.

MANSOUR, H. M.; RHEE, Y. S.; WU, X. Nanomedicine in pulmonary delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 4, p. 299-319, 2009.

MENON, J. U.; RAVIKUMAR, P.; PISE, A.; GYAWALI, D.; HSIA, C. C.; NGUYEN, K. T. Polymeric nanoparticles for pulmonary protein and DNA delivery. **Acta Biomater**, v. 10, n. 6, p. 2643-52, 2014.

MIRAKABAD, F. S. T.; NEJATI-KOSHKI, K.; AKBARZADEH, A.; YAMCHI, M. R.; MILANI, M.; ZARGHAMI, N.; ZEIGHAMIAN, V.; RAHIMZADEH, A.; ALIMOHAMMADI, S.; HANIFEHPOUR, Y.; JOO, S. W. PLGA-Based Nanoparticles as Cancer Drug Delivery Systems: **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 2, p. 517-535, 2014.

NASCIMENTO, T. L.; HILLAIREAU, H.; FATTAL, E. Nanoscale particles for lung delivery of siRNA. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 22, n. 1, p. 99-108, 2012.

NASCIMENTO, T. L.; HILLAIREAU, H.; NOIRAY, M.; BOURGAUX, C.; ARPICCO, S.; PEHAU-ARNAUDET, G.; TAVERNA, M.; COSCO, D.; TSAPIS, N.; FATTAL, E. Supramolecular Organization and siRNA Binding of Hyaluronic Acid-Coated Lipoplexes for Targeted Delivery to the CD44 Receptor. **Langmuir**, v. 31, n. 41, p. 11186-94, 2015.

NORRIS, D. A.; SINKO, P. J. Effect of size, surface charge, and hydrophobicity on the translocation of polystyrene microspheres through gastrointestinal mucin. **APP Journal of Applied Polymer Science**, v. 63, n. 11, p. 1481-1492, 1997.

PARANJPE, M.; MULLER-GOYMANN, C. C. Nanoparticle-mediated pulmonary drug delivery: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 4, p. 5852-73, 2014.

PATTON, J. S. Mechanisms of macromolecule absorption by the lungs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 19, n. 1, p. 3-36, 1996.

PATTON, J. S.; BYRON, P. R. Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 6, n. 1, p. 67-74, 2007.

POZZI, D.; COLAPICCHIONI, V.; CARACCIOLO, G.; PIOVESANA, S.; CAPRIOTTI, A. L.; PALCHETTI, S.; DE GROSSI, S.; RICCIOLI, A.; AMENITSCH, H.; LAGANA, A. Effect of polyethyleneglycol (PEG) chain length on the bio-nano-interactions between PEGylated lipid nanoparticles and biological fluids: from nanostructure to uptake in cancer cells. **Nanoscale**, v. 6, n. 5, p. 2782-92, 2014.

RUDOKAS, M.; NAJLAH, M.; ALHNAN, M. A.; ELHISSI, A. Liposome Delivery Systems for Inhalation: A Critical Review Highlighting Formulation Issues and Anticancer Applications. **Medical Principles Practice**, v. 25, Suppl 2, p. 60-72, 2016.

RUGE, C. A.; KIRCH, J.; CANADAS, O.; SCHNEIDER, M.; PEREZ-GIL, J.; SCHAEFER, U. F.; CASALS, C.; LEHR, C. M. Uptake of nanoparticles by alveolar macrophages is triggered by surfactant protein A. **Nanomedicine**, v. 7, n. 6, p. 690-3, 2011.

SAKAGAMI, M. In vivo, in vitro and ex vivo models to assess pulmonary absorption and disposition of inhaled therapeutics for systemic delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 9-10, p. 1030-60, 2006.

SALTZMAN, W. M.; RADOMSKY M. L.; WHALEY, K. J.; CONE, R. A. Antibody diffusion in human cervical mucus. **Biophysics Journal**, v. 66, n. 2, p. 508-15, 1994.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; DE CORDOVA, C. A.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; GUTERRES, S. S. Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 289, n. 1-2, p. 1-2, 2005.

SCHEUCH, G.; KOHLHAEUFL, M. J.; BRAND, P.; SIEKMEIER, R. Clinical perspectives on pulmonary systemic and macromolecular delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 9-10, p. 996-1008, 2006.

SHAIKH, S.; NAZIM, S.; KHAN, T.; SHAIKH, A.; ZAMEERUDDIN, M.; QUAZI, A. Recent advances in pulmonary drug delivery system: a review. **International Journal of Applied Pharmaceutics**, v. 2, p. 27-31, n. 4, 2010.

SHAM, J. O. H.; ZHANG, Y.; FINLAY, W. H.; ROA, W. H.; L'BENBERG, R. Formulation and characterization of spray-dried powders containing nanoparticles for aerosol delivery to the lung. **IJP International Journal of Pharmaceutics**, v. 269, n. 2, p. 457-467, 2004.

STONE, K. C.; MERCER, R. R.; GEHR, P.; STOCKSTILL, B.; CRAPO, J. D. Allometric relationships of cell numbers and size in the mammalian lung. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 6, n. 2, p. 235-43, 1992.

SUAREZ, S.; HICKEY, A. J. Drug properties affecting aerosol behavior. **Respiratory Care**, v. 45, n. 6, p. 652-66, 2000.

TAETZ, S.; BOCHOT, A.; SURACE, C.; ARPICCO, S.; RENOIR, J-M.; SCHAEFER, U. F.; MARSAUD, V.; Kerdine-Roemer, S.; LEHR, C-M.; FATTAL, E. Hyaluronic acid-modified DOTAP/DOPE liposomes for the targeted delivery of anti-telomerase siRNA to CD44-expressing lung cancer cells. **Oligonucleotides**, v. 19, n. 2, p. 103-16, 2009.

THORNTON, D. J.; SHEEHAN, J. K. From mucins to mucus: toward a more coherent understanding of this essential barrier. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 1, n. 1, p. 54-61, 2004.

TSAPIS, N.; BENNETT, D.; JACKSON, B.; WEITZ, D. A.; EDWARDS, D. A. Trojan particles: large porous carriers of nanoparticles for drug delivery. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 99, n. 19, p. 12001-5, 2002.

VARSHOSAZ, J.; TAYMOURI, S.; HAMISHEHKAR, H. Fabrication of polymeric nanoparticles of poly (ethylene-co-vinyl acetate) coated with chitosan for pulmonary delivery of carvedilol. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 131, n. 1, 2014.

WEISS, G. N.; SCHAIBLE, U. E. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. **IMR Immunological Reviews**, v. 264, n. 1, p. 182-203, 2015.

YAMAMOTO, H.; KUNO, Y.; SUGIMOTO, S.; TAKEUCHI, H.; KAWASHIMA, Y. Surface-modified PLGA nanosphere with chitosan improved pulmonary delivery of calcitonin by mucoadhesion and opening of the intercellular tight junctions. **Journal of Controlled Release**, v. 102, n. 2, p. 373-381, 2005.

YANG, L.; LUO, J.; SHI, S.; ZHANG, Q.; SUN, X.; ZHANG, Z.; GONG, T. Development of a pulmonary peptide delivery system using porous nanoparticle-aggregate particles for systemic application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 451, n. 1-2, p. 104-111, 2013.

YAN, X.; SCHERPHOF, G. L.; KAMPS, J. A. A. M. Liposome Opsonization. **lpr Journal of Liposome Research**, v. 15, n. 1-2, p. 109-139, 2005.

ZHAO, Y. Z. An in vivo experiment to improve pulmonary absorption of insulin using microbubbles. **Diabetes Technology & Therapeutics**, v. 13, n. 10, p. 1013-21, 2011.

16.

USO DE TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE PÓSITRONS NO DIAGNÓSTICO POR IMAGEM

RENATA AWAD

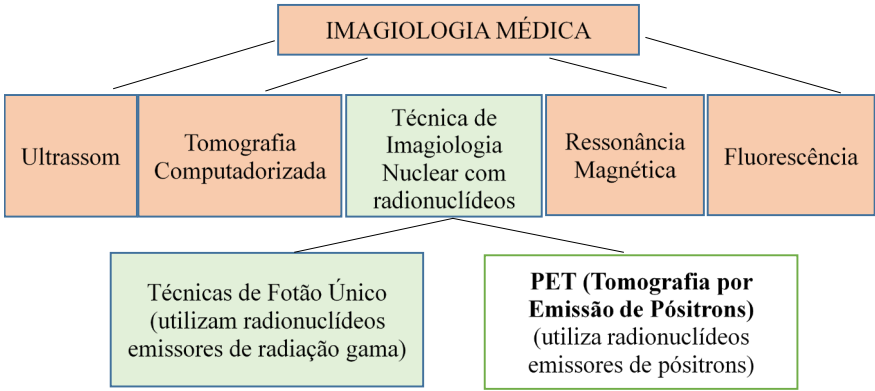
ERICK DE OLIVEIRA LEMES

GILBERTO LÚCIO BENEDITO DE AQUINO

As técnicas de diagnóstico por imagem são especialidades médicas surgidas no final do século XIX e início do século XX, que objetivam a obtenção de imagens de órgãos e tecidos para fins de diagnóstico ou até mesmo na terapêutica, monitorando os efeitos do tratamento (MORRIS; PERKINS, 2012).

A obtenção de imagens pode ser realizada através de diversas modalidades, seja por radiação, ultrassom ou ondas de radiofrequência (SHAH; BANSAL; LOGANI, 2014). A fluorescência, ressonância magnética (RM), ultrassonografia, tomografia computadorizada (TC) e as técnicas de imagiologia nuclear com radionuclídeos são os principais exames que adentram as técnicas de radiologia (Esquema 1).

Esquema 1 – Representação esquemática das principais técnicas e métodos de imagiologia médica



Fonte: Próprios autores (2017).

Com o avanço constante da medicina, surgiram novas técnicas de imagem, diagnóstico e terapêutica, como a Tomografia por Emissão de Pósitrons – (*Positron Emission Tomography* – PET). Diferentemente da RM convencional, definida como uma técnica de diagnóstico médico que fornece uma imagem da estrutura cerebral (tecidos), o PET é uma modalidade de imagiologia que permite informações metabólicas celulares desse órgão, evidenciando toda a sua fisiologia (HISTED et al., 2012). O objetivo do presente trabalho é ressaltar a importância, uso e benefícios que essa categoria médica, o PET, proporciona aos seus pacientes, relatando os principais isótopos e suas aplicabilidades.

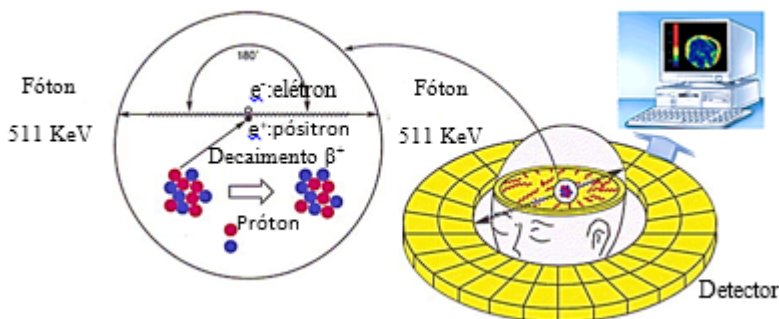
Tomografia por emissão de pósitrons

A técnica de imagiologia nuclear com radionuclídeos emissores de pósitrons (PET) oferece um diagnóstico eficaz, ágil e não-invasivo em nível molecular, utilizando isótopos de elementos com maior prevalência nas moléculas orgânicas. Essa estratégia utiliza radiofármacos, que são moléculas biológicas que incorporam um radionuclídeo, emitindo radiação passível de ser detectada e quantificada. Os agentes de imagem podem ser administrados por boca, injetados por veia, artéria ou cavidade corporal (BENADIBA et al., 2012; LEE et al., 2011).

Habitualmente, o composto marcado com radionuclídeo é introduzido no organismo por injeção intravenosa, acumulando em órgãos, podendo atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), e alcançando o cérebro, em caso de pacientes com doenças neurodegenerativas. Dessa forma, há a formação de contraste entre regiões que tiveram pouca ou nenhuma emissão de pósitrons, devido à baixa absorção do radiofármacos (BENADIBA et al., 2012).

Os radionuclídeos usados em diagnósticos de PET baseiam-se no decaimento de núcleos emissores de pósitrons (partículas β^+ , elétrons com carga positiva). O processo de decaimento do radionuclídeo a sua forma mais estável leva a emissão de um pósitron e este, ao percorrer uma pequena distância, aniquila-se com um elétron, emitindo fótons em direções opostas (Figura 1). Um tomógrafo constituído por anéis de detectores, colocado à volta do paciente, permite localizar a origem da aniquilação. O par de fótons gama emitidos na aniquilação são transmitidos em forma de imagem em locais onde houve a emissão de pósitrons (SALABERT et al., 2015; SUZUKI et al., 2004).

Figura 1 – Esquema ilustrativo da técnica PET



Fonte: Adaptado de Machado et al. (2006).

Um radiofármaco bastante utilizado para o diagnóstico é o fluor-desoxiglicose ($[^{18}\text{F}]\text{FDG}$), um análogo da glicose, que permite a sua utilização para o estudo do metabolismo oxidativo em órgãos e tecidos,

pois as células apresentam um consumo de glicose aumentado e, consequentemente, maior concentração de [^{18}F]FDG. Essa técnica de imagiologia nuclear é uma modalidade promissora, que permite a detecção precoce de muitas doenças, como as neurodegenerativas. Isso se deve ao fato dos radiofármacos possuírem diferentes caminhos funcionais e afinidades metabólicas específicas no organismo humano, precedendo as alterações anatômicas, muitas vezes, em estágio avançado (SALABERT et al., 2015).

Principais isótopos radioativos

Os agentes de contrastes radioativos, conhecidos como radiofármacos, são preparações farmacêuticas, usadas na imagiologia nuclear para a obtenção de imagens e, consequentemente, para gerar informações sobre o metabolismo dos tecidos ou alguma outra atividade molecular específica (JAMES; GAMBHIR, 2010).

Os radiofármacos são resultados da ligação química entre radionuclídeos, ou seja, nuclídeo ou isótopos radioativos que apresentam núcleos instáveis, que após sofrerem o processo de decaimento radioativo, emitem radiação, principalmente, na forma de partículas gama, e moléculas, como substâncias biologicamente ativas, que apresentam uma afinidade específica para determinado processo fisiológico, órgão ou tecido dos organismos. Os radionuclídeos emissores de partículas gama são utilizados tanto para diagnóstico quanto para o monitoramento de patologias, enquanto os isótopos radioativos emissores de partículas alfa e beta são aplicados na terapêutica de algumas doenças (MORRIS; PERKINS, 2012).

O uso de radionuclídeos em imagiologia molecular baseia-se em dois métodos: o SPECT (Tomografia Computarizada de Emissão de Fóton Único), que utiliza radionuclídeos emissores gama ($^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{123}I , ^{67}Ga , ^{201}Tl) e o PET (Tomografia por Emissão de Pósitrons), que usa radionuclídeos emissores de pósitrons (partículas β^+ , elétrons com carga positiva), sendo os mais utilizados: ^{11}C , ^{64}Cu , ^{18}F , além do ^{13}N , ^{15}O , menos aplicados (OLIVEIRA et al., 2006) (Quadro 1).

Quadro 1– Principais isótopos utilizados na medicina nuclear

Radionuclídeo	Tempo de meia-vida ($t_{1/2}$)	Modo de decaimento	Energia raios γ (KeV)
^{99m}Tc	6 h	TI	140
^{123}I	13 h	CE	159
^{67}Ga	78 h	CE	93,185,300,394
^{201}Tl	73 h	CE	135,167
^{11}C	20,4 min	β^+	511
^{13}N	10 min	β^+	511
^{15}O	2,07 min	β^+	511
^{18}F	110 min	β^+	511
^{64}Cu	13 h	β^+	511

Fonte: Adaptado de Oliveira et al. (2006). Abreviaturas: TI = transição isomérica; CE = captura eletrônica.

Os critérios de escolha de um elemento radioativo para o desenvolvimento de um radiofármaco envolve principalmente as suas propriedades físico-químicas, determinando afinidade por diferentes órgãos. São essas características, especificamente, o tipo de emissão nuclear, tempo de meia-vida e energia das partículas e/ou radiação eletromagnética emitida, que distinguem o uso de cada radionuclídeo. Ao contrário dos radiofármacos utilizados na terapia, que incluem, em sua composição, um radionuclídeo emissor de partículas ionizantes (α , β ou elétrons *Auger*), pois leva à destruição seletiva de tecidos, os radiofármacos aplicados para diagnóstico devem apresentar radionuclídeos emissores de radiação ou emissores de pósitrons (β^+), já que o decaimento desses radionuclídeos resulta na radiação eletromagnética penetrante, atravessando os tecidos, e é passível de ser detectada externamente (OLIVEIRA et al., 2006).

Os elementos radioativos, devido às suas características físico-químicas, apresentam afinidade e especificidade por diferentes órgãos, sistemas ou patologias. As características físicas determinam “o tipo de emissão nuclear, o tempo de meia-vida e a energia das partículas e/ou

radiação eletromagnética emitida”. A energia do fóton γ , emitida pelos radionuclídeos que formam os radiofármacos utilizados para diagnóstico, deve variar entre 80-300 keV, pois, quando inferiores a essa faixa, os raios são absorvidos pelos tecidos e não são detectados exteriormente. Em contrapartida, a eficácia dos detectores é comprometida quando a sua energia excede 300 keV, resultando em imagens de má qualidade (ARAÚJO, 2005).

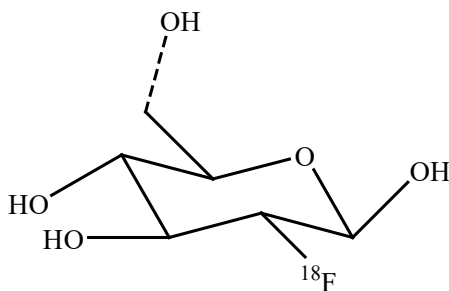
Em ambos os casos, tanto para fins de diagnóstico ou terapêutico, o $t_{1/2}$ deve ser satisfatório para que o radiofármaco seja preparado, administrado ao paciente e as imagens sejam representadas (YEONG; CHENG; NG, 2014).

Aplicação biológica dos principais isótopos radioativos

^{64}Cu : O ^{64}Cu é considerado um importante isótopo radioativo usado em ensaios clínicos e aplicações biológicas. O radiofármaco ^{64}Cu -ATSM: ^{64}Cu diacetil-bis(N^4 -methylthiosemicarbazona) (Figura 2) conhecido como ATSM ou cobre 64, é um quelato metálico de ditio-carbazona, considerado agente de imagem usado em PET devido a sua capacidade em elucidar tecidos hipóxicos (tecidos com baixo oxigênio). O cobre (II)-diacetil-bis (N^4 -metiltiossemicarbazonas = Cu-ATSM) pode ser marcado com os vários isótopos, sendo o ^{64}Cu de maior relevância. Após passar pela membrana celular, o ^{64}Cu é reduzido, resultando em um composto instável, que é reoxidado na presença do oxigênio e se distribui a partir da célula. Em tecidos com baixa quantidade de oxigênio, o cobre dissocia-se do quelato e torna-se irreversivelmente capturado (ANDERSON; FERDANI, 2009).

^{18}F : O radionuclídeo ^{18}F é o mais utilizado em exame PET. O complexo Fluordesoxiglicose- ^{18}F (FDG- ^{18}F) é um radioisótopo análogo a glicose (Figura 4), utilizado tanto em exames PET (tomografia por emissão de pósitrons), que possui resolução de imagens capaz de detectar tumores a partir de 2 mm, como também em exames do tipo SPECT (tomografia por emissão de fóton único). Em exames FDG-PET, o alto teor de consumo de açúcar por células tumorais, em comparação a tecidos normais, atribui a esse isótopo a capacidade de identificar células cancerosas, além de estudar a resposta tumoral ao tratamento. O flúor-18, ao contrário dos demais isótopos, apresenta um elevado tempo de meia-vida (110 minutos), possibilitando um prazo maior para os processos de síntese, purificação e imagem, sendo possível ser usado fora do centro de produção (DOLLÉ, 2008; LEE et al., 2011). A aplicação de maior relevância concentra-se na cardiologia, para pesquisa de viabilidade miocárdica. A FDG-18F sofre um processo de fosforilação em FDG-18F-6-fosfato, após atravessar a membrana do cardiomiócito. Ao contrário do que ocorre com a glicose, esse análogo não sofre a desfosforilação, ficando retido no miocárdio, pois apresenta a característica de ser impermeável à membrana celular. O miocárdio isquêmico consome glicose como forma de energia, fato que se atribui à utilização da FDG-18F nesse tipo de exame (ALAUDDIN, 2011).

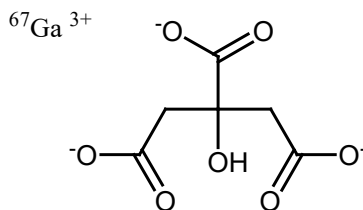
Figura 4 – Radiofármaco fluordesoxiglicose- ^{18}F (FDG- ^{18}F), análogo à glicose



Fonte: Próprios autores (2017).

^{67}Ga : O gálio-67, agente de imagiologia nuclear, é utilizado para a detecção de neoplasias e processos inflamatórios, como a miocardite, contribuindo em grande parte com a área cardiológica, pois é considerado um marcador ao detectar a rejeição após transplante cardíaco. Além disso, áreas de divisão celular rápida, como as células cancerosas, podem ser identificadas a partir desse radioisótopo. Com meia-vida de 78 horas, o ^{67}Ga emite radiação gama de múltiplas energias e pode levar alguns dias (2-3 dias) para acumular-se no tecido afetado (KIRCHER; LAPA, 2017). O citrato de gálio é um radiofármaco utilizado para obtenção de imagens e localização de tumores, diagnóstico e avaliação de resposta ao tratamento de linfomas, indicativo de lesão e inflamação, entre outros (Figura 5). O citrato de gálio (^{67}Ga) deve estar associado com outras técnicas de imagem (ALAUDDIN, 2011).

Figura 5 – Radiofármaco de diagnóstico ^{67}Ga – citrato



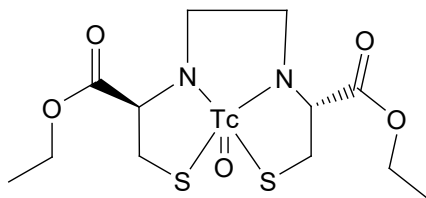
Fonte: Próprios autores (2017).

$^{99\text{m}}\text{Tc}$: O tecnécio-99m é isótopo utilizado para marcar muitos radiofármacos comuns. Seu uso concentra-se, em grande parte, em exames de ossos e tecidos cardíacos. Entre todos os isótopos em uso nos dias atuais, o tecnécio-99m é responsável por consagrar as principais características físicas que resultam em imagens nas câmaras Anger. O processo do seu decaimento libera energia de 140 keV (88%). Na sua forma eluída, pertecnetato- $^{99\text{m}}\text{Tc}$, após a passagem pelo gerador, pode ter aplicação direta, como estudos de primeira passagem, visto que, introduzido por via venosa, chega ao espaço intersticial. Confere ao pertecnetato- $^{99\text{m}}\text{Tc}$, a capacidade de marcar inúmeras moléculas para a identificação de diversas estruturas e órgãos, possuindo um papel

importante como agente de imagem na medicina nuclear. Assim como a maioria dos isótopos acima, possui uma atividade de grande interesse na cardiologia, principalmente em estudo da perfusão miocárdica.

Além disso, é considerado relevante em estudos da tireoide, atividades cerebrais, distúrbio hepatológicos, renais, hematológicos e pulmonares (RUTH, 2007). Alguns radiofármacos à base desse isótopo são de grande importância para estudos renais: o complexo DTPA-99mTc é aplicado para avaliar a função de filtração glomerular dos rins, além dos radiofármacos utilizados em avaliações anatômicas e estudos morfológicos localizados no córtex renal. O radiofármaco formado com a (ECD) (Figura 6) é aplicado para diagnóstico de morte cerebral, através de realização de perfusão sanguínea e no acompanhamento de neuropatologias, tais como o mal de Parkinson e a doença de Alzheimer (ARAÚJO, 2005).

Figura 6 – Radiofármaco etilenodisticistina dietil éster (ECD)

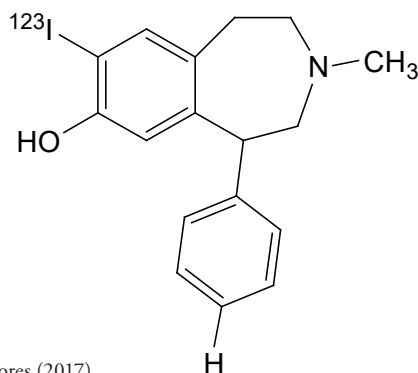


Fonte: Próprios autores (2017).

¹²³I: O iodo 123 é um dos principais agentes da tireoide, possuindo aplicações em estudo de carcinoma dessa glândula, metástase e hipotireoidismo. Como agentes clínicos, são considerados receptores adrenérgicos pré-sinápticos, em estudos de tumores neuroendócrinos, feocromocitoma e neuroblastoma (NGUYEN et al., 2015). Radioligantes para receptores do neurotransmissor dopamina são utilizados no acompanhamento de algumas doenças, principalmente aquelas relacionadas à motricidade, como o mal de Parkinson, paralisia supranuclear progressiva (mal de Steel Richardson). Além disso, são aplicados para diagnóstico diferencial do mal de Parkinson e usado na terapêutica de doenças.

Dentre os radiofármacos utilizados com isótopos de iodo 123, há o grupo de moléculas família das benzamidas, como o iodobenzamida, que se ligam seletivamente a receptores dopaminérgicos D2 (Figura 7) (GRALLERT; TAVARES; ARAÚJO, 2003).

Figura 7 – Estrutura do radioligante [^{123}I]iodobenzamida (IBZM)



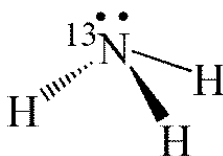
Fonte: Próprios autores (2017).

^{201}Tl : Cátion monovalente produzido em ciclotron e considerado um análogo do potássio, o tálio-201 possui um tempo de meia-vida de 73 horas e é utilizado tanto para alterações no miocárdio, como perfusão miocárdica, quanto para caracterização do miocárdio viável, devido a sua concentração em áreas de baixo fluxo sanguíneo. Por possuir propriedades biológicas semelhantes ao potássio, é aplicado para a diferenciação entre miocárdio isquêmico e fibrose. Quanto maior a quantidade de miocárdio viável, maior será a captação do radiotraçador em relação ao tecido normal. Injetado por via venosa, o tálio-201 espalha-se na maioria dos tecidos do corpo (à exceção do cérebro, pois não é impermeável a barreira hematoencefálica). Acumula-se principalmente no miocárdio, rins, fígado, intestinos e musculatura esquelética. O tálio-201 sofre um processo denominado fenômeno da redistribuição, ou seja, é a sua capacidade de se redistribuir, tornando possível as modificações de fluxo acometidas por estresse. Em decorrência de algum estresse, as áreas hipoperfundidas tendem à normalização em relação às áreas normoperfundidas, o que leva a um indicativo de isquemia, já

que, em caso de estresse, a alteração de fluxo tende a ser maior se comparada ao repouso. Apesar disso, há preferência pelo tecnécio-^{99m} em estudos de perfusão miocárdica, devido ao fato de o ²¹Ti apresentar um perfil energético menos favorecido e da meia-vida maior que limita a dose utilizada. Entretanto, é o agente de escolha em aplicação da cardiopatia isquêmica (NOTGHI, LOW, 2011).

¹³N: Em PET, o radiofármaco amônia-¹³N (Figura 8) é considerado relevante em estudos de perfusão do miocárdio. Quando o fluxo é normal, a taxa de amônia que é extraída chega 70 a 80% pela célula do miocárdio (HUNG et al., 2016).

Figura 8 – Radiofármaco amônia-¹³N



Fonte: Próprios autores (2017).

¹⁵O: O radiofármaco água-¹⁵O vem sendo utilizado em estudo de perfusão cerebral, devido à sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e o traçador difundir-se no organismo, com taxa de extração de aproximadamente 100% (GRÜNER et al., 2011).

Aplicações clínicas do exame PET

Abaixo, estão sumarizadas algumas dentre inúmeras aplicações em que a modalidade PET vêm sendo utilizada para fins clínicos (JAMES; GAMBHIR, 2012; TAKALKAR; EL-HADDAD; LILIEN, 2008):

- Indicativo de alterações neuronais, responsável pelo diagnóstico diferencial das demências, como a doença de Alzheimer, doença de Pick e indicar estados depressivos acometidos por idosos;

- Avaliação pré-cirúrgica do paciente diagnosticado com epilepsia focal;
- Mensurar a severidade da degenerescência dopaminérgica em doentes acometidos pela doença Parkinson;
- Avaliação e diagnóstico diferencial entre parkinsonismo, provocado por fármacos, doença de Parkinson e tremor benigno;
- Atestar morte cerebral, como casos de coma induzido por ansiolíticos;
- Indicação da veracidade dos insultos vasculares (na ausência de outros avaliadores clínicos, como ressonância Magnética);
- Após traumatismos encefálicos, analisar as consequências das sequelas neuropsiquiátricas;

Vantagens do exame PET em relação às outras modalidades competitivas

A medicina nuclear é uma inovação tecnológica, que veio com o intuito de auxiliar e beneficiar os seus usuários, através de um diagnóstico precoce e não invasivo. Em relação aos outros exames de imagiologia, o exame PET, especificamente, pode ser favorecido por apresentar algumas vantagens, tais como: oferecer informações acerca do metabolismo celular, visualizando alterações funcionais/metabólicas, e não necessariamente da morfologia do órgão, o que o caracteriza como um diagnóstico precoce e que permite imagens de modo não-invasivo. Além disso, utiliza doses pequenas de substâncias ao realizar o exame e seu efeito adverso é quase insignificante, principalmente na parte clínica (BENADIBA et al., 2012).

Ainda denotando acerca da tomografia por emissão de pósitrons em relação às demais modalidades, o PET é o exame de primeira escolha quando se busca caracterizar tecidos em exames oncológicos, como presença de tumores, cicatriz e inflamação, a busca por imagem funcional, tais como angiogênese, avaliação de rádio/quimioterapia, uso em aplicações cardiológicas, ao diferenciar tecido normal com

alguma anomalia, e quantificar a função orgânica de algum órgão, como função renal, respiratória, neuronal, entre outros (GUIMARAES et al., 2014).

Considerações finais

apesar da utilização e produção de radiofármacos no Brasil apresentar uma inferioridade em relação a outros países produtores, como países europeus e Estados Unidos, principalmente em relação à legislação/burocracia, percebe-se que houve grandes avanços no uso dessa tecnologia medicinal. Em menos de 100 anos, desde o primeiro registro da aplicação de um radionuclídeo em humanos, em 1927, os avanços da medicina nuclear têm se mostrado relevantes para fins de diagnóstico e terapia. Atualmente, o diagnóstico precoce é o grande desafio para pesquisadores e indústrias farmacêuticas, direcionando a pesquisa para síntese de radiofármacos específicos e também para uma terapia que não afetem outros tecidos, através de técnicas de Teragnóstico.

Referências

- ALAUDDIN, M. M. Positron emission tomography (PET) imaging with 18F-based radiotracers. **American Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 2, n. 1, p. 55-76, 2011.
- ANDERSON, C. J. FERDANI, R. Copper-64 radiopharmaceuticals for PET imaging of cancer: advances in preclinical and clinical research. **Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals**, v. 24, n. 4, p. 379– 393, 2009.
- ARAÚJO, E. B. A utilização do elemento tecnécio-99 m no diagnóstico de patologias e disfunções dos seres vivos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 6, p. 31– 35, 2005.
- BENADIBA, M.; LUURTSEMA, G.; ANA L.W.; BUCHPIGEL, C.A.; FILHO, G. B. Novos alvos moleculares para tomografia por emissão de pósitrons (PET) e tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) em doenças neurodegenerativas. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 34, n. 2, p. 125-148, 2012.

GRALLERT, S. R. M.; TAVARES, L. C.; ARAÚJO, E. B. de. Radioligantes para neurorreceptores benzodiazepínicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 9, n. 3, p. 244-257, 2003.

GRÜNER, J. M.; PAAMAND, R.; HOJGAARD, L.; LAW, I. Brain perfusion CT compared with ^{15}O - H_2O - PET in healthy subjects. **E JNM Research**, v. 1, n. 28, p. 1-10, 2011.

GUIMARAES, M. D. Ressonância magnética funcional na oncologia: estado da arte. **Radiologia Brasileira**, v. 47, n. 2, p. 101-111, 2014.

HISTED, S. N.; LINDENBERG, M. L.; MENA, E.; TURKBAY, B.; CHOYKE, P. L.; KURDZIEL, K. A. Review of functional/ anatomic imaging in oncology. **Nuclear Medicine Communications**, v. 33, n. 4, p. 349-361, 2012.

HUNG, G.; WANG, Y.; SU, H.; HSIEH, T.; KO, C.; YEN, R. New trends in radionuclide myocardial perfusion imaging. **Acta Cardiologica Sinica**, v. 32, n. 2, p. 156-166, 2016.

JAMES, M. L.; GAMBHIR, S. S. A Molecular imagens primer: modalities, imaging agents, and applications. **Physiological Reviews**, v. 92, n. 2, p. 897-965, 2010.

KIRCHER, M.; LAPA, C. Novel noninvasive nuclear medicine imaging techniques for cardiac inflammation. **Current Cardiovascular Imaging Reports**, v. 10, n. 6, p. 1-13, 2017.

LEE, E.; KAMLET, A. S.; POWERS, D. C.; NEUMANN, C. N.; BOURSALIAN, G. B.; FURUYA, T.; CHOI, D. C.; HOOKER, J. M.; RITTER, T. A fluoride-derived electrophilic late-stage fluorination reagent for pet imaging. **Science**, v. 334, p. 639-642, 2011.

MORRIS, P.; PERKINS, A. Diagnostic imaging. **The Lancet**, v. 379, n. 9825, p. 1525-1533, 2012.

NGUYEN, Q. T.; LEE, E. J.; HUANG, M. G.; PARK, I. Y.; KHULLAR, A.; PLODKOWSKI, R. A. Diagnosis and treatment of patients with thyroid cancer. **American Health Drug Benefits**, v. 8, n. 1, p. 30-40, 2015.

NOTGHI, A.; LOW, C. S. Myocardial perfusion scintigraphy: past, presente and future. **An International Journal of Radiology, Radiation Oncology an all Related Sciences**, v. 84, n. 3, p. 229-236, 2011.

OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; FERREIRA, D.; COELHO, P.; VEIGA, F. Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 151-165, 2006.

RUTH, T. J. The uses of radiotracers in the life sciences. **IOP Science**, v. 72, p. 1-24, 2009.

SALABERT, A. S.; FONTA, C.; FONTAN, C.; ADEL, D.; ALONSO, M.; PESTOURIE, C.; BELHADJ-TAHAR, H.; TAFANI, M.; PAYOUX, P. Radiolabeling of [18F]-fluoroethylnormemantine and initial *in vivo* evaluation of this innovative PET tracer for imaging the PCP sites of NMDA receptors. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 42, p. 643–653, 2015.

SHAH, N.; BANSAL, N.; LOGANI, A. Recent advances in imaging technologies in dentistry. **World Journal of Radiology**, v. 6, n. 10, p. 794-807, 2014.

SUZUKI M.; DOI, H., HOSOYA T., LÅNGSTRÖM B., WATANABE Y. Rapid methylation on carbon frameworks leading to the synthesis of a pet tracer capable of imaging a novel cns-type prostacyclin receptor in living human brain. **TRAC – Trend in Analytical Chemistry**, v. 23, p. 595, 2004.

TAKALKAR, A. M.; EL-HADDAD, G.; LILIEN, D. PDG-PET and PET/CT–part II. **Indian Journal of Radiology and Imaging**, v. 18, n. 1, p. 17-36, 2008.

TU, Z.; MACH, R. H. C-11 radiochemistry in cancer imaging applications. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 11, p. 1060-1095, 2010.

YEONG, C.; CHENG, M.; NG, K. Therapeutic radionuclides in nuclear medicine: current and future prospects. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 15, n. 10, p. 845-863, 2014.

17.

NANOBIOPOLÍMEROS APLICADOS EM PRODUTOS PARA A SAÚDE

LUCIANA REBELO GUILHERME
JAMES TEIXEIRA RODRIGUES
MURILLO FERNANDES FERREIRA
PATRÍCIA JOSÉ MARQUES TANNÚS

Biopolímeros

Uma larga faixa de polímeros naturais de fontes renováveis diversas são usados em aplicações materiais. Entre estes, a celulose e amido destacam-se nas aplicações, enquanto outros permanecem subutilizados. Com o rápido avanço dos conhecimentos de biogenética e biossínteses, novas oportunidades para uso de polímeros de fontes naturais estão sendo consideradas. Esses materiais, denominados BIOPOLÍMEROS, são polímeros produzidos por um organismo vivo e são derivados de polissacarídeos, proteínas, lipídios, polifenóis e, especialmente, polímeros produzidos por bactérias, fungos, plantas e animais (KAPLAN, 1998).

Os biopolímeros diferem dos biomateriais bioativos, que têm a capacidade de interagir com tecidos naturais ou sintéticos. A matéria-prima principal usada na manufatura geralmente usa uma fonte de carbono renovável, um carboidrato derivado de plantas, como a cana-de-açúcar, milho, batata, trigo e beterraba, ou óleo de origem vegetal extraído de soja, girassol ou palma. Como exemplo, temos o polilactato (PLA), o polihidroxialcanoato (PHA), os polímeros de amido (PA) e a goma xantana (micro-organismos) (BORSCHIVER, 2008). Os biopo-

límeros de origem animal são, de longe, os mais utilizados na indústria farmacêutica. Dentre eles, destacam-se a gelatina (bovina, suína e pescados) (Figura 1) e a quitosana (crustáceos) (Figura 2) (SARANYA; RADHA, 2014).

O estudo e a utilização de polímeros naturais são uma ciência antiga, tais como comprovam os papéis, sedas, peles e artes ósseas nos museus ao redor do mundo. Como a maioria dos petrolatos, os polímeros oriundos de recursos renováveis raramente são usados como eles mesmos e sim como compósitos com outros materiais. A história mostra que os compósitos de materiais renováveis são muito mais antigos que o uso de polímeros. Na Bíblia, livro de Êxodo, Joquebede, a mãe de Moisés, construiu o cesto com junco, argamassa e limo, um tipo de composto reforçado com fibras. Durante a guerra do ópio, há mais de 1000 anos, os chineses construíram seus castelos para se proteger dos invasores, usando um tipo de composto mineral reforçado com glúten de arroz, açúcar, carbonato de cálcio e areia (YU; DEAN; LI, 2006).

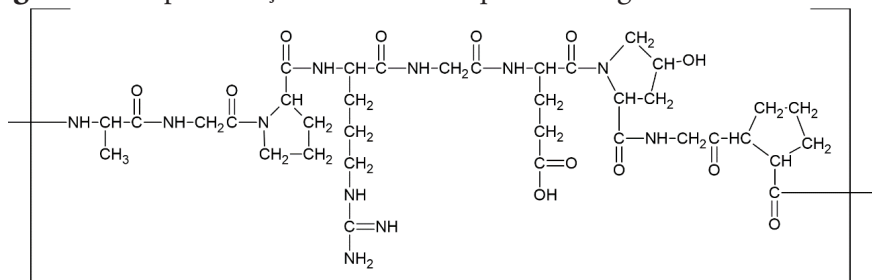
Modernas tecnologias fornecem ferramentas poderosas na elucidação de microestruturas em diferentes níveis e no entendimento das relações entre estruturas e propriedades. Esses novos níveis de entendimento trazem oportunidades no desenvolvimento de novos materiais e suas aplicações. A inerente biodegradabilidade de polímeros naturais também se mostra importante para controlar o ambiente em que os polímeros são usados, prevenindo a degradação prematura. Como exemplo, a solubilidade em água de muitos polímeros aumenta sua degradabilidade e sua velocidade de degradação. Contudo, essa sensibilidade à umidade limita suas aplicações, bem como sua baixa temperatura de fusão (YU; DEAN; LI, 2006).

São muitos os benefícios de usar biopolímeros em aplicações correntes. Por exemplo, compatibilidades ambientais podem ser obtidas pelos encargos do ambiente introduzidas durante o uso do biopolímero. A biodegradabilidade é outra vantagem adicional do uso dos biopolímeros. Algum polímero sintetizado por um sistema biológico pode ser biodegradável internamente. A biocompatibilidade é um benefício potencial em alguns casos. Outro benefício que merece destaque é o

controle genético da produção de polímeros que oferece vantagens como a manipulação e construção da estrutura dos biopolímeros e outras funções, como peso molecular, estereoquímica, sequência primária e reatividade química (KAPLAN, 1998).

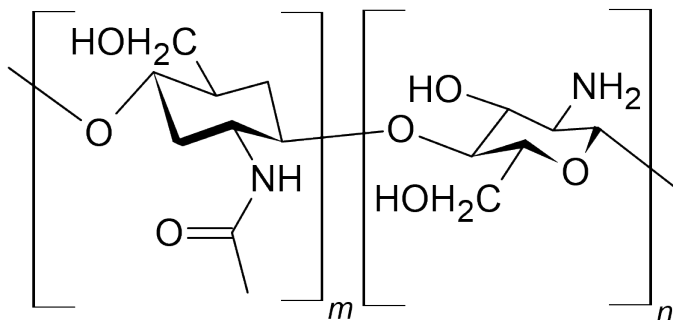
Até mesmo os biopolímeros oriundos de xenobióticos, compostos químicos sintéticos encontrados em um organismo, mas que necessariamente não foram produzidos por ele, apresentam muitos exemplos de compostos biodegradáveis ou com uma taxa de biodegradação elevada. Como exemplo, tem-se a lignina, polímero abundante na natureza e degradado por alguns microrganismos (STEINBÜCHEL, 2005).

Figura 1 – Representação da estrutura química da gelatina



Fonte: Adaptado de Li et al. (2014).

Figura 2 – Representação da estrutura química da quitosana parcialmente desacetilada



Fonte: Adaptado de Rinaudo (2006).

Blendas de polímeros naturais

Grande parte dos polímeros ocorre naturalmente de fontes renováveis e são avaliados em aplicações diversas. Amido, celulose e borracha são amplamente usados na atualidade, enquanto outros permanecem subutilizados. Os polímeros naturais são classificados de acordo com suas características físicas. Por exemplo, amido e celulose são classificados em diferentes grupos físicos, contudo, ambos são polissacarídeos de acordo com a classificação química (YU; DEAN; LI, 2006). Os conjuntos supramoleculares da celulose e do amido são influenciados por sua arquitetura macromolecular específica e as morfologias naturais são fibras para celulose e grânulos para amido (GANDINI, 2008).

Uma das muitas desvantagens de polímeros biodegradáveis obtidos de fontes naturais renováveis é sua característica hidrofílica dominante, além da taxa de degradação rápida e propriedades mecânicas insatisfatórias sob condições ambientais úmidas. Para melhorar essas condições, a mistura de polímeros em blendas é uma técnica muito utilizada, uma vez que usa tecnologia de baixo custo, objetivando não alterar totalmente suas propriedades, mas aumentar o desempenho funcional dos componentes (YU; DEAN; LI, 2006).

Blendas de poliésteres alifáticos

Os poliésteres alifáticos são reconhecidos por sua biodegradabilidade e alta taxa de degradação. Como exemplo desse grupo, tem-se os PLA's (polilactídeos) que também têm como vantagem a cristalinidade e hidrofiliidade. Uma outra família de poliésteres são os PHA's (polihidroxialcanoato), substâncias produzidas por uma grande variedade de microrganismos e que possuem como característica o armazenamento interno de carbono e energia como mecanismo de sobrevivência. São verdadeiramente biodegradáveis e altamente biocompatíveis (YU; DEAN; LI, 2006).

Blendas de polímeros hidrofóbicos e hidrofílicos

A maioria dos polímeros naturais são hidrofílicos, já que contêm grupos hidroxilo ou polares. Todavia, a maioria dos polímeros biodegradáveis sintéticos são hidrofóbicos ou sensíveis à umidade. A mistura desses dois compostos é significativa, uma vez que pode conduzir a um novo grupo de materiais biodegradáveis. Como exemplo podem ser listados as blendas de amido/PLA e amido/PHB, blendas de derivados de celulose/PHB, blendas Quitosana/PHB e blendas de quitosana/PHB com quitina/PHB (YU; DEAN; LI, 2006).

Compósitos multicamadas

Polímeros naturais como amido e proteína também são alternativas potenciais aos polímeros petrolatos em uma série de aplicações. Entretanto, um problema inerente ao uso de polímeros naturais são suas características de biodegradabilidade e a sensibilidade à umidade do ambiente. Para resolver o problema, a solução apresentada é laminar amido termoplástico com polímeros resistentes à água e biodegradáveis. A técnica de laminação mais usada é a coextrusão ou multicamadas, cuja vantagem principal é completar o processo inteiro em um único passo livre de solvente (THAKUR; THAKUR; KESSLER, 2017; YU; DEAN; LI, 2006;).

Compostos fibra-reforçadas

Compostos plásticos reforçados com fibra têm sido aplicados em várias situações devido às suas excelentes propriedades específicas, tais como alta resistência, rigidez e baixo peso molecular. As fibras naturais são de maior interesse por possuírem capacidade funcional e peso adequado em substituição às fibras de vidro amplamente utilizadas. Como potencial na gestão de resíduos sólidos no meio ambiente, apresentam biodegradabilidade alta e produzem menor quantidade de cinzas na incineração. Estudos têm relatado o uso de fibras de linho, juta, rami, palma e celulose cujos biocompósitos naturais foram obtidos embebendo fibras naturais nas matrizes poliméricas de celulose, amido, ácido láctico, etc.. Uma das vantagens mais importantes em usar fibras

naturais para reforçar polímeros é sua elevada compatibilidade (YU; DEAN; LI, 2006).

Nanocompósitos

Nanocompósitos poliméricos têm atraído uma crescente atenção, em especial os nanocompósitos de polímero/silicato, que apresentam melhores propriedades em comparação com polímeros ou compósitos convencionais. A inclusão de nanosilicatos bem dispersos em polímeros levou à alteração de algumas propriedades, tais como aumento do módulo de armazenamento, aumento das propriedades de tensão e flexão e diminuição da permeabilidade e inflamabilidade (THAKUR; THAKUR; KESSLER, 2017; YU; DEAN; LI, 2006).

De maneira geral, os nanocompósitos de silicato são dispostos em camadas em três diferentes tipos (YU; DEAN; LI, 2006):

- Nanocompósito intercalado com a inserção da cadeia de silicato. Ocorre em camadas cristalográficas regulares com distância de repetição de alguns nanômetros, independentemente do polímero base;
- Nanocompósito que intercala e empilha camadas de silicato floculado devido à interação borda-borda hidroxilada das camadas de silicato;
- Nanocompósito esfoliado, em que as camadas de silicato são separadas da matriz polimérica por distâncias médias dependentes da argila de carreamento.

Biopolímeros naturais, quando utilizados na formação de nanopartículas (partículas menores que 100 nm), possuem propriedades que permitem mantê-los estáveis no meio em que são produzidos e também possuem a vantagem de formar agregados em diferentes estruturas e arranjos químicos. As proteínas e polissacarídeos, por exemplo, têm sido utilizados para nanoencapsulação de compostos nutricionais (EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2016). Nanobiopolímeros também têm despertado interesse em sistemas de liberação de fármacos em face a seu potencial de aplicação em sistemas de liberação

controlada de moléculas com atividade biológica, direcionando a ação em tecidos/órgãos específicos, carreando DNA em terapia gênica e liberando proteínas, peptídeos, genes administrados por via de oral (SARANYA; RADHA, 2014).

Aplicações já consolidadas

Encapsulação de compostos naturais

Compostos naturais são produtos extraídos de plantas ou produzidos por microrganismos. Alguns desses produtos possuem atividade biológica em outros sistemas vivos e, por esse motivo, são estudados com o objetivo de desenvolver tratamento para doenças como o câncer, doenças infecciosas e outras doenças como agente alternativo ou complementar na medicina (WATKINS et al., 2015).

A curcumina, extrato do açafrão da Índia, é indicada para tratamento de diversas doenças, incluindo o tratamento da malária. Nanocápsulas de curcumina, obtidas em hidrogel de hidroxipropilmetilcelulose e polivinilpirrolidona, foram obtidas através de metodologia reprodutível e mostraram-se um produto com elevado potencial de uso como adjuvante no combate à infecção (NIDHI et al., 2010).

Diferentes cadeias poliméricas de caseína, proteína presente no leite, são capazes de interagir entre si através de interações hidrofóbicas, sendo utilizadas para formar nanocápsulas para nutracêuticos de características lipíticas, como, por exemplo, a Vitamina D (SEMO et al., 2007).

Nanobiopolímeros em sistemas de liberação de fármacos

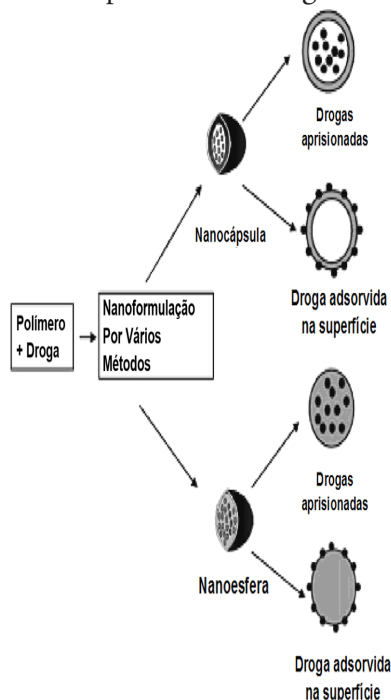
O uso de nanobiopolímeros associados aos fármacos permitem que essas moléculas permaneçam no organismo por períodos prolongados de tempo, uma vez que protegem o fármaco da metabolização ou que possibilitam a ação somente no local desejado, diminuindo a possibilidade de reações adversas. A aplicação da nanotecnologia nas ciências da saúde é útil não somente para o desenvolvimento de novas terapias, mas também para dar “nova vida” a terapias antigas, aumentando a segu-

rança e eficácia dos medicamentos administrados (MORACHIS et al., 2012; SITHOLE et al., 2016).

Biopolímeros associados a fármacos formam sistemas nanométricos nos quais a droga é confinada dentro da cavidade de uma vesícula formada por uma única membrana polimérica, denominada nanocápsula, ou por uma matriz na qual a droga é distribuída uniformemente, denominada nanoesfera (SARANYA et al., 2014).

Nanocápsulas ou nanoesferas podem carrear fármacos aprisionados em seu interior ou adsorvê-los em sua superfície, conforme ilustrado na Figura 3. Esse tipo de sistema pode ampliar a eficácia de fármacos com baixa biodisponibilidade ou instáveis à fotodegradação, com o nifedipino (TAGLIARI et al., 2015).

Figura 3 – Tipos de nanopartículas biodegradáveis



Fonte: Adaptado de Saranya et al. (2014).

Pesquisas para formação de nanocápsulas ou nanoesferas em associação com nanobiopolímeros têm sido diversificadas e aplicadas a diversas drogas, de diferentes classes terapêuticas. A seguir, estão relacionados exemplos de aplicação dessas técnicas em drogas de uso na dermatologia, tratamento de infecções e tratamento de neoplasias.

Tratamento das doenças infecciosas

Desde sua descoberta, os antibióticos têm sido muito utilizados na prática clínica, o que tem gerado um dos maiores problemas para a medicina atualmente: a resistência de microrganismos aos antibióticos. Para contornar o problema, existem diversas pesquisas direcionadas à descoberta de novos agentes antimicrobianos. Outras pesquisas, porém, estão relacionadas ao desenvolvimento de novas formulações para moléculas existentes na terapêutica contra infecções (GAO et al., 2011).

A osteomielite é uma infecção microbiana nos ossos que pode ocorrer principalmente após fraturas. Seu tratamento, geralmente, envolve desbridamento cirúrgico e uso de antibióticos (NANDI et al., 2009). Com a finalidade de reparar defeitos nos ossos pós-cirúrgicos e evitar a proliferação microbiana, foi desenvolvido um tecido de enxerto com uso de Vancomicina associada a um nanocarreador formado por colágeno, hidroxiapatita e ácido lático. A vancomicina, associada ao colágeno mineralizado, apresentou eficácia no reparo do tecido ósseo e no tratamento antimicrobiano da infecção (LIAN et al., 2013).

Dermatologia

No campo da dermatologia e da cosmética, as nanopartículas têm sido estudadas há décadas, sendo que algumas formulações já estão disponíveis no mercado (RANCAN et al., 2009). Sabe-se que, em preparações de uso tópico, as nanopartículas tendem a se distribuir de acordo com seu tamanho. Partículas menores, por exemplo, acumulam-se nos folículos (ALVAREZ-ROMÁN et al., 2004). Alguns experimentos realizados através da preparação de nanoemulsões de Vitamina A em fase lipídica utilizando glicerol e goma xantana corroboram para o fato de que a penetração do fármaco na pele depende do tamanho da

partícula (JENNING et al., 2000). O uso de nanotecnologia na produção de filtros e/ou bloqueadores solares também tem mostrado elevado desempenho desses produtos ao elevar o nível de proteção de células epidérmicas à radiação UV (DENG et al., 2015).

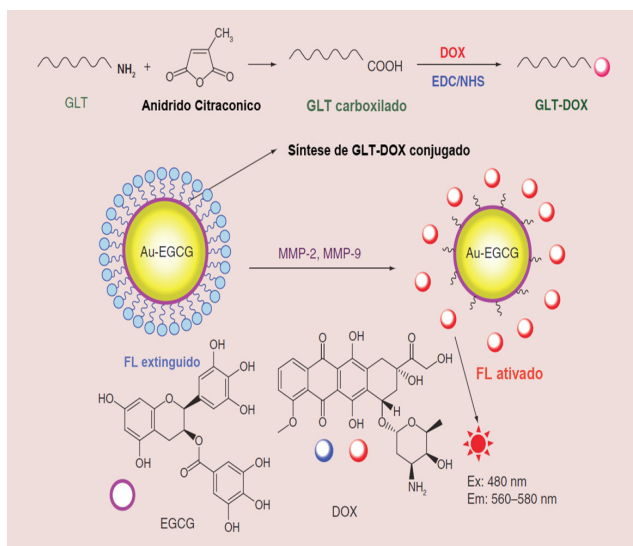
Tratamento de neoplasias

O desenvolvimento racional de nanopartículas a partir do conhecimento da biologia do câncer e do microambiente gerado próximo ao tumor aumenta a segurança e eficácia de agentes antineoplásicos e beneficia os pacientes acometidos por esta enfermidade (TIWARI, 2012).

A prescrição da doxorubicina (DOX) na oncologia é clássica, porém, seu uso é limitado por danos progressivos no miocárdio relacionados ao efeito cumulativo causado por seu uso prolongado, que pode levar à insuficiência cardíaca (SWAIN et al., 2003; VON HOFF et al., 1979).

Em 2016, sistemas nanobiopoliméricos conjugadores de doxorubicina (Figura 4) foram desenvolvidos por Tsai e colaboradores para o tratamento de tumores do câncer. O sistema consiste na conjugação da DOX em moléculas de gelatina, uma proteína derivada do colágeno. As células tumorais, produtoras de metaloproteinases que clivam o colágeno, foram capazes de quebrar também as moléculas de gelatina, liberando a DOX especificamente no local de ação. O sistema ainda era composto por moléculas de ouro e da epigallocatequina, que potencializam a ação do medicamento ao permitirem a concentração da molécula na próstata (TSAI et al., 2016).

Figura 4 – Diagrama esquemático mostrando a síntese e as propriedades óticas de GLT-DOX/EGCG-AuNPs montadas camada por camada. AuNP: nanopartícula de ouro; DOX: doxorubicina; EGCG: galato de epigallocatequina; FL: fluorescência; GLT: gelatina



Fonte: Adaptado de Tsai et al. (2016).

Nanobiopolímeros em terapia gênica

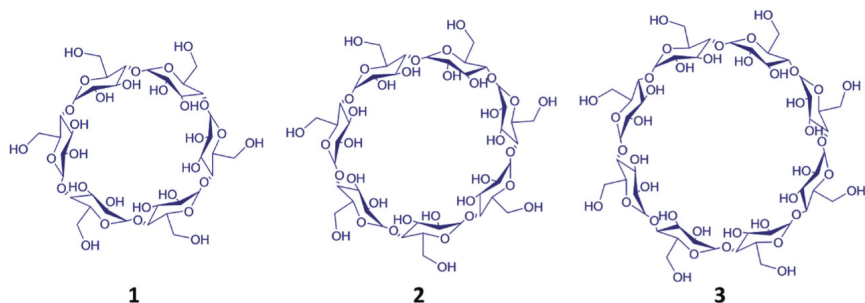
Essa terapia objetiva a transferência de material genético para células específicas do paciente de forma a corrigir ou suplementar falhas em genes responsáveis por doenças como câncer, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e problemas do coração (MANSOURI et al., 2004).

A ciclodextrina, biopolímero produzido por bactérias, tem sido amplamente utilizada como carreadora de moléculas ligantes à transferina, que possui reguladores em células cancerígenas, e moléculas de siRNA em tratamentos contra as neoplasias (DAVIS et al., 2010; SZEJTLI, 1998).

Moléculas de ciclodextrina, como as representadas na Figura 5, têm estrutura tridimensional semelhante à de um cone ou de um “copo

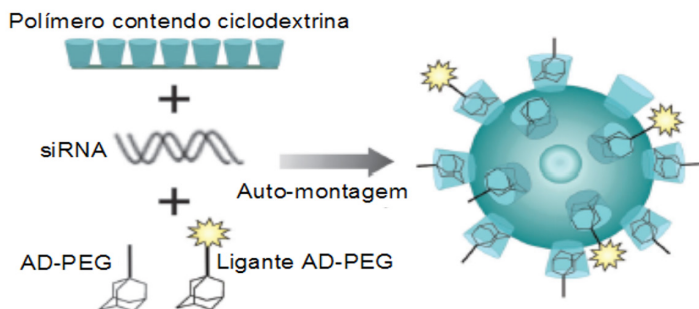
sem fundo” e são usualmente representadas como tal nas publicações em geral (Figura 6).

Figura 5 – Representações das estruturas químicas das ciclodextrinas α , β e γ , consistindo em seis (1), sete (2) e oito (3) unidades de α -d-glucopiranosídeo, respectivamente



Fonte: Adaptado de Myrick et al. (2014).

Figura 6 – Nanopartículas baseadas em ciclodextrina para entrega sistemática de siRNA. Ilustração esquemática do sistema de entrega. As moléculas de polietileno glicol (PEG) são terminadas com adamantano (AD), que forma complexos de inclusão com ciclodextrina na superfície para decorar a superfície da nanopartícula com PEG para estabilização estérica e PEG-TF para encontrar o alvo

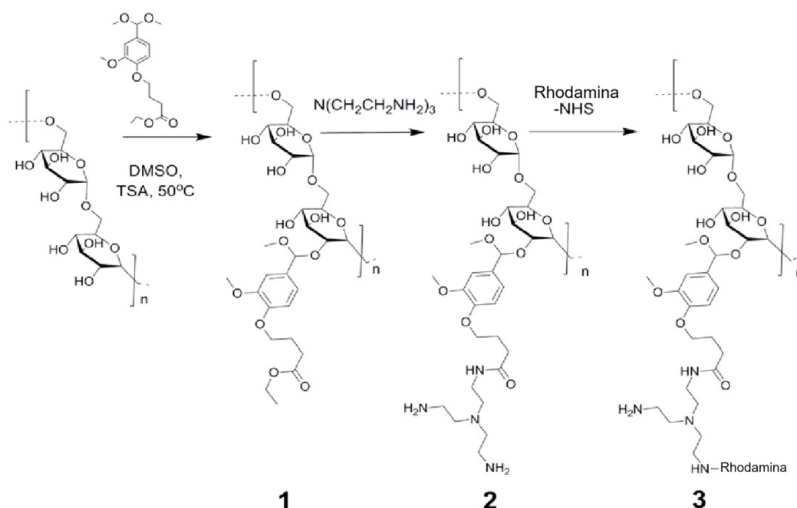


Fonte: Adaptado de Mizrahy e Peer (2012).

A quitosana, polissacarídeo biodegradável, extraída de crustáceos, tem sido utilizada para formar carreadores de DNA interações eletro-
táticas. A formação de plasmídeos carreadores de moléculas de DNA e
transferrina também foi possível, gerando alta especificidade e distri-
buição das nanopartículas (BORCHARD, 2001; MAO et al., 2001).

Uma nova técnica para tratamento de câncer proposta recente-
mente foi um carreador de RNA interferente pequeno (do inglês,
siRNA) colina quinase, feito com polímero dextrano (Figura 7). Os
pesquisadores observaram que, em tumores malignos, há uma maior
atividade de colina quinase, por isso, sua associação ao siRNA como
forma de entrar na célula doente (CHEN et al., 2016).

Figura 7 – Procedimento sintético de geração de um amino-dextrano
degradável carreador de siRNA. 1. Dextrano com grupo acetal. 2.
Amino-dextrano. 3. Amino-dextrano marcado com Rhodamina



Fonte: Adaptado de Chen et al. (2016).

Agradecimentos

Aos órgãos financiadores FAPEG e CNPq. À empresa GENIX.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ-ROMÁN, R.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H.; FESSI, H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 99, n. 1, p. 53–62, 2004.
- BORCHARD, G. Chitosans for gene delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 52, n. 2, p. 145–150, 2001.
- CHEN, Z.; KRISHNAMACHARY, B.; BHUJWALLA, Z. Degradable Dextran Nanopolymer as a Carrier for Choline Kinase (ChoK) siRNA Cancer Therapy. **Nanomaterials**, v. 6, n. 2, p. 34, 2016.
- DAVIS, M. E.; ZUCKERMAN, J. E.; CHOI, C. H. J.; SELIGSON, D.; TOLCHER, A.; ALABI, C. A.; YEN, Y.; HEIDEL, J. D.; RIBAS, A. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. **Nature**, v. 464, n. 7291, p. 1067–1070, 2010.
- DENG, Y.; EDIRIWICKREMA, A.; YANG, F.; LEWIS, J.; GIRARDI, M.; SALTZMAN, W. M. A sunblock based on bioadhesive nanoparticles. **Nature Materials**, v. 14, n. 12, p. 1278–85, 2015.
- EL-SALAM, M. H. A.; EL-SHIBINY, S. Natural biopolymers as nanocarriers for bioactive ingredients used in food industries. In: GRUMEZESCU, A. M. (Ed.). **Encapsulations**. 1. ed. London: Elsevier, 2016. p. 793–829.
- GANDINI, A. Polymers from renewable resources: A challenge for the future of macromolecular materials. **Macromolecules**, v. 41, n. 24, p. 9491–9504, 2008.
- GAO, P.; NIE, X.; ZOU, M.; SHI, Y.; CHENG, G. Recent advances in materials for extended-release antibiotic delivery system. **The Journal of Antibiotics**, v. 64, n. 9, p. 625–34, 2011.
- JENNING, V.; GYSLER, A.; SCHÄFER-KORTING, M.; GOHLA, S. H. Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: Occlusive properties and drug targeting to the upper skin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 49, n. 3, p. 211–218, 2000.
- KAPLAN, D. L. Introduction to Biopolymers from Renewable Resources. In: KAPLAN, D. L. (Ed.). **Biopolymers from Renewable Resources**. 1. ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1998. p. 1–29.

LI, M.; WANG, Y.; CHEN, Y.; ZHANG, S. A luminescent ionogel based on an europium(III)-coordinated carboxyl-functionalized ionic liquid and gelatin. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 13, n. 7, p. 1025–1030, 2014. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=c4pp00076e>>.

LIAN, X.; LIU, H.; WANG, X.; XU, S.; CUI, F.; BAI, X. Antibacterial and biocompatible properties of vancomycin-loaded nano-hydroxyapatite/collagen/poly (lactic acid) bone substitute. **Progress in Natural Science: Materials International**, v. 23, n. 6, p. 549–556, 2013.

MANSOURI, S.; LAVIGNE, P.; CORSI, K.; BENDERDOUR, M.; BEAUMONT, E.; FERNANDES, J. C. Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: Strategies to improve transfection efficacy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 1, p. 1–8, 2004.

MAO, H. Q.; ROY, K.; TROUNG-LE, V. L.; JANES, K. A.; LIN, K. Y.; WANG, Y.; AUGUST, J. T.; LEONG, K. W. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: Synthesis, characterization and transfection efficiency. **Journal of Controlled Release**, v. 70, n. 3, p. 399–421, 2001.

MIZRAHY, S.; PEER, D. Polysaccharides as building blocks for nanotherapeutics. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 7, p. 2623–2640, 2012. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C1CS15239D>>.

MORACHIS, J. M.; MAHMOUD, E. A.; ALMUTAIRI, A. Physical and Chemical Strategies for Therapeutic Delivery by Using Polymeric Nanoparticles. **Pharmacological Reviews**, v. 64, n. 3, p. 505–519, 2012.

MYRICK, J. M.; VENDRA, V. K.; KRISHNAN, S. Self-assembled polysaccharide nanostructures for controlled-release applications. **Nanotechnology Reviews**, v. 3, n. 4, p. 319–346, 2014.

NANDI, S. K.; MUKHERJEE, P.; ROY, S.; KUNDU, B.; DE, D. K.; BASU, D. Local antibiotic delivery systems for the treatment of osteomyelitis – A review. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 8, p. 2478–2485, 2009.

NIDHI, K.; INDRAJEET, S.; KHUSHBOO, M.; GAURI, K.; SEN, D. J. Curcumin-loaded hydrogel nanoparticles: Application in Anti-malarial therapy and toxicological evaluation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 2, p. 4992–5010, 2010.

RANCAN, F.; PAPAKOSTAS, D.; HADAM, S.; HACKBARTH, S.; DELAIR, T.; PRIMARD, C.; VERRIER, B.; STERRY, W.; BLUME-PEYTAVI, U.; VOGT, A. Investigation of polylactic acid (PLA) nanoparticles as drug delivery systems for local dermatotherapy. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 8, p. 2027–2036, 2009.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan : Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 603–632, 2006.

SARANYA, S.; RADHA, K. V. Review of Nanobiopolymers for Controlled Drug Delivery. **Polymer-Plastics Technology and Engineering**, v. 53, n. 15, p. 1636–1646, 30 out. 2014. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/103602559.2014.915035>>.

SEMO, E.; KESSELMAN, E.; DANINO, D.; LIVNEY, Y. D. Casein micelle as a natural nano-capsular vehicle for nutraceuticals. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 5–6, p. 936–942, 2007.

SITHOLE, M. N.; CHOONARA, Y. E.; DU TOIT, L. C.; KUMAR, P.; PILLAY, V. A review of semi-synthetic biopolymer complexes: modified polysaccharide nano-carriers for enhancement of oral drug bioavailability. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 7450, p. 1–13, 2016.

SWAIN, S. M.; WHALEY, F. S.; EWER, M. S. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: A retrospective analysis of three trials. **Cancer**, v. 97, n. 11, p. 2869–2879, 2003.

SZEJTLI, J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, p. 1743–1754, jul. 1998. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr970022c>>.

TAGLIARI, M. P.; GRANADA, A.; SEGATTO SILVA, M. A.; STULZER, H. K.; ZANETTI-RAMOS, B. G.; FERNANDES, D.; SILVA, I. T.; SIMÕES, C. M. O.; SORDI, R.; ASSREUY, J.; SOLDI, V. Development of oral nifedipine-loaded polymeric nanocapsules: Physicochemical characterisation, photostability studies, in vitro and in vivo evaluation. **Química Nova**, v. 38, n. 6, p. 781–786, 2015.

THAKUR, V. K.; THAKUR, M. K.; KESSLER, M. R. **Handbook of composites from renewable materials**. 1. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2017. v. 7

TIWARI, M. Nano cancer therapy strategies. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 8, n. 1, p. 19–22, 2012.

TSAI, L.-C.; HSIEH, H.-Y.; LU, K.-Y.; WANG, S.-Y.; MI, F.-L. EGCG/gelatin-doxorubicin gold nanoparticles enhance therapeutic efficacy of doxorubicin for prostate cancer treatment. **Nanomedicine**, v. 11, n. 1, p. 9–30, jan. 2016.

VON HOFF, D. D.; LAYARD, M. W.; BASA, P.; DAVIS JR., H. L.; HOFF, VON, A. L.; ROZENCWEIG, M.; MUGGIA, F. M. Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. **Annals of Internal Medicine**, v. 91, n. 5, p. 710–717, 1979.

WATKINS, R.; WU, L.; ZHANG, C.; DAVIS, R. M.; XU, B. Natural product-based nanomedicine: Recent advances and issues. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 6055–6074, 2015.

YU, L.; DEAN, K.; LI, L. Polymer blends and composites from renewable resources. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 6, p. 576–602, jun. 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670006000414>>.

18.

TESTES DE TOXICIDADE EM ANIMAIS EXPERIMENTAIS VOLTADOS PARA A PESQUISA E O DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS PARA A SAÚDE

BRUCE SOARES CARDOSO

CÁTIA LIRA DO AMARAL

VANESSA CRISTIANE SANTANA AMARAL

O fim da Segunda Guerra Mundial revelou as atrocidades cometidas nos campos de concentração nazista, onde experimentos médicos foram realizados em seres humanos. No Código de Nuremberg, criado a partir do horror nazista, constam as primeiras diretrizes éticas internacionais para a pesquisa científica em seres humanos. Essa normatização ganhou novo impulso no início da década de 1970, com a divulgação do estudo de sífilis não tratada realizado no Estado do Alabama (EUA). No estudo de Tuskegee, como ficou conhecido, 399 pacientes negros com sífilis tiveram o avanço da doença investigado ao longo de quatro décadas sem tratamento e sem o devido diagnóstico, enquanto acreditavam receber acompanhamento médico gratuito oferecido pelo Serviço de Saúde Pública (CDC, 2015). Essas atrocidades contribuíram para a criação de leis internacionais mais rigorosas para nortear a pesquisa científica envolvendo seres humanos. Desde então, animais de laboratório têm sido utilizados como uma alternativa no processo de investigação de doenças que afligem a humanidade e em testes que avaliam novas moléculas farmacologicamente ativas (WHO, 2004).

A realização de testes de toxicidade em animais experimentais visa prever os efeitos tóxicos decorrentes da exposição de compostos

químicos aos seres humanos. As espécies a serem utilizadas nos estudos devem ser selecionadas com base em sua relevância para a extrapolação de dados aos humanos (ANVISA, 2013). A escolha pelos mamíferos como os ratos e os macacos justifica-se pela necessidade do uso de animais filogeneticamente mais próximos dos seres humanos do que outras cobaias não mamíferas. Eles são metabolicamente mais complexos que culturas de células e geram dados toxicológicos mais confiáveis e passíveis de extrapolação para os seres humanos (WHO, 2004). Sendo assim, os estudos não clínicos realizados em animais fornecem os conhecimentos básicos necessários para iniciar a fase clínica da prospecção de novos medicamentos, ou seja, a fase em que os testes são realizados em humanos.

Todavia, estudos de toxicidade em animais experimentais também demandam estrita atenção aos postulados éticos. A comunidade científica internacional enfatiza a necessidade de que ensaios toxicológicos sejam conduzidos de acordo com os princípios dos 3 Rs (Substituição, Redução e Aprimoramento, do inglês: “*Replacement, Reduction and Refinement*”) elaborados por Willian Russell e Rex Burch em 1959, como resultado dos trabalhos do comitê criado pela Federação das Universidades para o Bem-estar Animal (*Universities Federation for Animal Welfare – UFAW*) (CAZARIN; CORRÊA; ZAMBRONE, 2004).

O princípio da **Redução (*Reduction*)** implica adotar ou desenvolver protocolos que utilizem o menor número possível de animais por experimento, evitando a replicação e a adoção de modelos animais cujos resultados já tenham, previamente, mostrado que não podem ser eficientemente extrapolados para a espécie humana. O princípio do **Aprimoramento (*Refinement*)** consiste no aperfeiçoamento das metodologias de investigação com o objetivo de minimizar o desconforto e o sofrimento do animal experimental antes, durante e depois da realização dos testes. Por fim, o princípio da **Substituição (*Replacement*)** evoca a necessidade do desenvolvimento de modelos alternativos que possam, em última instância, abolir o uso de animais experimentais. Amparado no desenvolvimento tecnológico, o princípio da Substituição aposta no aprimoramento dos ensaios *in vitro*, especial-

mente aqueles que fazem uso de células ou tecidos humanos (ensaio *ex vivo*) e, mais recentemente, na criação de modelos computacionais capazes de prever os efeitos toxicológicos de determinado xenobiótico em um organismo virtual (CAZARIN; CORRÊA; ZAMBRONE, 2004). Assim, o pesquisador/instituição precisa elaborar protocolos experimentais eticamente respaldados nos princípios dos 3 Rs e condizentes com as exigências regulatórias.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) publicou, em 2013, o Guia para Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos, no qual discute e orienta sobre a realização de estudos de toxicidade de dose única, dose repetida, genotoxicidade, tolerância local, segurança farmacológica e toxicocinética, carcinogenicidade e, por fim, estudos de toxicidade reprodutiva (ANVISA, 2013). Embora a Anvisa não proponha métodos alternativos à experimentação animal no guia citado, a agência reguladora afirma que:

Caso o pesquisador/instituição consiga comprovar a segurança desses fármacos por outros estudos científica e tecnicamente mais viáveis, os dados apresentados poderão ser avaliados pela Anvisa. O uso de métodos alternativos *in vitro* em substituição a estudos *in vivo*, desde que validados e aceitos internacionalmente, são recomendados (ANVISA, 2013).

Diante da importante contribuição do conhecimento advindo de estudos que utilizam animais de experimentação, abordaremos, neste capítulo, os principais protocolos utilizados em testes de dose única e repetida, reprodutiva e genotoxicidade utilizados na pesquisa e desenvolvimento de produtos para saúde no Brasil. Esses testes são regulamentados pela Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 (BRASIL, 2008), que dispõe sobre a criação e a utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa em todo o território nacional. As diretrizes dessa lei aplicam-se apenas aos animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata, ou seja, animais com presença de notocorda durante o desenvolvimento embrionário. Ademais, a referida lei criou o Conselho Nacional de

Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e estipulou a obrigatoriedade da constituição de Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAs) em todas as instituições que realizam atividades de pesquisa e ensino envolvendo animais. O CONCEA estabelece resoluções normativas para que os princípios dos 3Rs sejam aplicados. Inclusive, reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil.

Testes de toxicidade de dose única

Os testes de toxicidade de dose única em animais, também conhecidos como testes de toxicidade aguda, são uma exigência regulatória no processo de desenvolvimento de medicamentos destinados ao consumo humano. Eles auxiliam na seleção das doses adotadas na fase 1 dos estudos clínicos, fornecem dados importantes sobre overdose do composto testado, a classificação de risco ambiental e para saúde humana. Além disso, informativos de segurança que deverão constar na embalagem de um provável medicamento também podem ser definidos a partir da análise de dados gerados pelos testes de toxicidade aguda (FDA, 1996).

Nesses testes, são avaliados os efeitos tóxicos gerados pela administração de uma ou mais doses de um composto ou mistura de compostos (substância(s)-teste) por um período de até 24 horas, em, no mínimo, duas diferentes espécies de mamíferos (roedores ou não roedores), que devem ser mantidos sob observação por 14 dias após a administração (duas vezes no dia da administração e, no mínimo, uma vez por dia nos 14 dias subsequentes) (ANVISA, 2013).

Os animais experimentais devem ter entre 8 e 12 semanas de idade e ser do mesmo sexo (geralmente fêmeas). Todos os sinais clínicos de toxicidade devem ser registrados, incluindo informações sobre o surgimento, duração e reversibilidade dos efeitos adversos. Ao final do experimento, deve ser realizada a necropsia de todos os animais e, se possível, a análise histopatológica. Esses procedimentos também têm que ser realizados em animais moribundos e naqueles que vierem a morrer ao longo do experimento, e devem ser computados na interpretação dos resultados (OECD, 2008a).

Em estudos de toxicidade aguda, a dose testada não deve ultrapassar 1000 mg/kg/dia. Quando essa dose representar menos de 10 vezes a dose de exposição clínica, pode-se adotar a máxima dose disponível, que corresponde à dose 10 vezes maior que a dose clínica ou 2000 mg/kg/dia (ANVISA, 2013). Todavia, protocolos internacionais adotam intervalos de dose que variam de 5 a 2000 mg/kg/dia. Em alguns países, não incluso o Brasil, chega a ser admitida a dose de 5000 mg/kg/dia. Substâncias pouco tóxicas podem ser testadas na maior dose viável, respeitada a dose limite no Brasil, que é de 1000 mg/kg/dia. Já as substâncias tóxicas, sabidamente irritantes ou corrosivas, não devem ser testadas em doses que causem sofrimento excessivo ao animal (OECD, 2001c).

A via de administração pretendida para o uso em humanos deve ser a mesma adotada no estudo, que também deve incluir a via parenteral para dirimir quaisquer diferenças entre a biodisponibilidade da substância teste no animal experimental e nos seres humanos. Caso a via parenteral seja a pretendida para uso humano, o teste de dose única só precisa ser realizado por essa via (ANVISA, 2013).

Os testes de dose letal para 50% dos animais testados (DL50), que durante anos foram usados como um importante indicativo de toxicidade aguda, foram banidos dos protocolos da *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) em 2002 e já não eram exigidos pela *Food and Drug Administration* (FDA) desde 1983 (CAZARIN; CORRÊA; ZAMBRONE, 2004). Ao invés do protocolo de nº 401 da OECD, que previa a determinação da DL50, métodos alternativos preconizados pela OECD, como os de doses fixas (OECD 420), classe tóxica aguda (OECD 423) e *up and down* (OECD 425), são os recomendados pela *Environmental Protection Agency* (EPA) dos Estados Unidos da América (EPA, 1996), pelo CONCEA e pela Anvisa no Brasil (OECD 2001a,b; 2008a). Embora a letalidade ainda seja o ponto final desses protocolos alternativos, todos os três observam os princípios de Redução e Aprimoramento.

Os dados obtidos nos testes de toxicidade aguda norteiam a escolha das doses nos testes de toxicidade de doses repetidas e, ainda, podem

indicar os órgãos mais atingidos pelos efeitos tóxicos da substância teste (ANVISA, 2013).

Testes de toxicidade de doses repetidas

Os estudos de toxicidade de doses repetidas ajudam a compreender o impacto toxicológico da substância teste sobre a saúde do animal, permitem identificar a acumulação da substância teste ou de seus metabólitos no organismo, seus órgãos-alvo e auxiliam na definição da dose máxima na qual não são observados quaisquer efeitos (NOEL do inglês *no observed effect level*) e da dose máxima na qual não são observados efeitos adversos (NOAEL do inglês *no observable adverse effect level*).

Complementar ao teste de toxicidade aguda, no qual os efeitos de uma ou múltiplas doses da substância teste são avaliados por curto período (24 h), a toxicidade crônica de uma substância é avaliada por meio da administração de doses repetidas, buscando avaliar o perfil toxicológico da substância teste em ao menos duas espécies de mamíferos (roedor e não roedor) por um período que pode variar, no mínimo, de 2 semanas a 9 meses (Tabela 1). A OECD preconiza a realização de testes de toxicidade de doses repetidas nos quais a substância teste é administrada por 28 dias consecutivos em roedores (OECD 407) (OECD, 2008b). Caso os dados obtidos no estudo de 28 dias indiquem a necessidade de uma avaliação mais prolongada, é recomendado o teste por 90 dias, também em roedores (OECD 408) (OECD, 1998a). Ademais, a análise dos efeitos adversos e dos dados toxicocinéticos observados nos estudos de toxicidade de doses repetidas com roedores pode indicar a necessidade de uma avaliação em uma espécie não roedora pelo período de 90 dias (OECD 409) (OECD, 1998b). Como citado anteriormente, para o registro de medicamentos no Brasil, a Anvisa requer que o teste seja realizado em duas espécies de mamíferos, incluindo uma não roedora.

Tabela 1 – Critérios adotados para realização dos testes de toxicidade de dose única e doses repetidas segundo guia para a condução de estudos não clínicos de segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos

Critérios		Testes de toxicidade	
		Dose única	Doses repetidas
Objetivo		Fornecer dados de toxicidade aguda	Fornecer dados de toxicidade crônica
Administração	Vias	Pretendida para uso humano e parenteral	Pretendida pra uso humano e parenteral
	Período	24h	Mínimo de 2 semanas a 9 meses Diária,
Observação		14 dias	enquanto durar o teste
	Espécie	2 espécies de mamíferos	2 espécies de mamíferos, sendo uma não roedora 10 a 20 (roedores)
Animal	Número	5 a 9 (roedores)	8 (não roedores)
	Sexo	Machos ou fêmeas	Machos e fêmeas
	Idade	Adultos	Jovens
Dosagem*		(8-12 semanas)	(Após desmame)
		1000 mg/kg/dia	1000 mg/kg/dia
		Massa corporal	Massa corporal
		Sinais clínicos	Sinais clínicos
Parâmetros		Mortalidade	Mortalidade
			Consumo de água e ração
		Anatomo-histopatológicos	Anatomo -histopatológicos
			Bioquímicos
			Hematológicos
			Oftalmológicos (não roedores)

* Quando a dose representar menos de 10 vezes a dose de exposição clínica, pode-se adotar a máxima dose disponível, a dose 10 vezes maior que a dose clínica ou 2.000 mg/kg/dia.

Fonte: Adaptado de ANVISA (2013)

Nos estudos com roedores, são usados preferencialmente ratos, de ambos os sexos, sendo 5 animais por grupo no estudo de 28 dias e 10 animais por grupo no estudo de 90 dias. O teste de toxicidade de doses repetidas com animais não roedores utiliza, preferencialmente, cães Beagle, sendo 4 machos e 4 fêmeas por grupo. Os roedores incluídos nos testes devem ter, em seu início, no máximo 9 semanas de idade e os Beagles devem ter, preferencialmente, entre 4-6 meses de idade, nunca ultrapassando 9 meses. Um grupo controle, com o mesmo número de animais, deve ser adicionado ao estudo e ser submetido às mesmas condições de manuseio a que são submetidos os grupos tratados com a substância teste. Além disso, a massa corporal dos animais deve ser avaliada e o consumo de ração mensurado, pelo menos, semanalmente (OECD, 1998a,b; 2008b).

São testadas ao menos três doses graduadas pela mesma via de administração pretendida para o uso em humanos. A substância teste pode ser administrada por via oral (gavagem), dissolvida na água ou misturada à ração do animal. A via parenteral deve ser testada sempre que a substância teste for mal absorvida pela espécie animal usada no experimento. As doses devem ser definidas com base em dados obtidos dos estudos de toxicidade aguda, sendo que a maior dose deve provocar toxicidade, mas não deve ser letal e tampouco causar sofrimento severo ao animal (ANVISA, 2013).

Ao final do estudo, todos os animais devem ser eutanaseados e submetidos à necropsia para análise histopatológica. Em testes de toxicidade de doses repetidas, são também avaliados sinais físicos e comportamentais de toxicidade, as taxas de mortalidade, as variações de massa corporal, os consumos de ração e água, bem como as alterações hematológicas e bioquímicas. Uma particularidade desses testes é que eles permitem avaliar os impactos toxicológicos da substância testada sobre os sistemas nervoso, endócrino e imunológico. O agravamento ou a reversibilidade dos efeitos tóxicos ao longo do tempo são outros dois importantes critérios avaliados nos estudos de toxicidade de doses repetidas. Quando são utilizadas espécies não roedoras, também é possível avaliar a toxicidade oftalmológica da substância teste (ANVISA, 2013). Os dados de segurança obtidos em estudos de

toxicidade de doses repetidas suportam as fases 1, 2 e 3 da pesquisa clínica (ANVISA, 2013).

Toxicidade reprodutiva

A teratologia é a ciência que busca compreender as causas das malformações congênitas, que são responsáveis pelo óbito de um quinto das crianças de até um ano de idade e um terço das crianças de até um mês de vida. Menos da metade dessas causas são conhecidas. Nesse contexto, os testes de toxicidade reprodutiva são uma das principais ferramentas para investigar os impactos de um composto ou mistura de compostos sobre a reprodução de mamíferos (KALTER, 2003).

Os estudos não clínicos de segurança que abordam a toxicidade de xenobióticos durante a reprodução de mamíferos podem ser realizados durante cada uma das fases do desenvolvimento da prole (fertilidade e desenvolvimento embrionário inicial, desenvolvimento pré e pós-natal, incluindo função materna e desenvolvimento embriofetal) ou em abordagem de estudo único que contemple todo o período reprodutivo, da fertilidade ao desenvolvimento pós-natal, incluindo a função materna (ANVISA, 2013).

Os estudos de fertilidade e desenvolvimento embrionário inicial são realizados para avaliar o impacto do composto testado sobre a maturação de gametas, comportamento no acasalamento, fertilidade para os machos, avançando até os estágios de pré-implantação e implantação para as fêmeas. São ensaios que devem ser realizados em ao menos uma espécie roedora, preferencialmente ratos, usando machos e fêmeas na proporção de 1:1 (ANVISA, 2013).

A maior dose testada deve ser selecionada com base em dados disponíveis em estudos previamente publicados e deve ser administrada pela mesma via pretendida para uso humano. Doses menores são escalonadas de acordo com estudos de toxicidade de doses repetidas de, no mínimo, um mês de duração e deverão embasar a escolha do período de administração da substância testada (ANVISA, 2013; OECD, 2015).

Durante o teste, são observados os sinais clínicos e a mortalidade dos animais, bem como alterações da massa corporal e do consumo de ração. Esfregaços vaginais devem ser analisados diariamente durante o período de acasalamento. Caso não sejam observados efeitos tóxicos no sistema reprodutor, um intervalo de tratamento pré-acasalamento de 2 semanas para fêmeas e 4 semanas para machos pode ser utilizado. Além disso, as fêmeas devem ser eutanaseadas para a contagem de corpos lúteos, números de implantações e de fetos vivos e mortos. Nos machos, deve ser avaliada a viabilidade dos espermatozoides contidos no epidídimo ou nos testículos. Órgãos reprodutores e outros órgãos com alterações macroscópicas devem ser preservados para análise histológica (ANVISA, 2013).

Os testes de toxicidade pré e pós-natal, incluindo função materna, devem ser realizados em fêmeas adultas de, ao menos, uma espécie roedora, preferencialmente ratos, e estender-se da implantação até a lactação. A definição da dose e da via de administração segue o mesmo critério adotado para os estudos de fertilidade e desenvolvimento embrionário inicial (ANVISA, 2013). São avaliados sinais clínicos de toxicidade e mortalidade, alteração da massa corporal materna, mortalidade pré e pós-natal dos filhotes, crescimento e desenvolvimento alterados, alterações funcionais dos filhotes, incluindo comportamento, maturidade (puberdade) e reprodução. Ao término do estudo, a análise macroscópica de todos os adultos deve ser realizada. Quanto aos filhotes, é necessária a contagem de fetos vivos e mortos, a avaliação da massa corporal ao nascimento, durante a pré e pós-lactação, maturação e fertilidade, desenvolvimento físico, funções sensoriais, reflexas e registro do comportamento da ninhada (ANVISA, 2013; OECD, 1995). Adicionalmente, um macho e uma fêmea por ninhada devem ser selecionados para acasalamento na idade adulta para que, dessa forma, a competência reprodutiva da prole possa ser avaliada após o tratamento da progenitora com a substância teste (ANVISA, 2013).

Os estudos de desenvolvimento embriofetal são os únicos testes de toxicidade reprodutiva nos quais existe a obrigatoriedade regulatória de testar os efeitos da substância de interesse em duas espécies de mamíferos, sendo uma roedora, preferencialmente ratos e, uma não roedora,

preferencialmente coelhos, com idade e massa corporal compatíveis. Os mesmos critérios adotados nos demais estudos de toxicidade são utilizados para a definição da dose e da via de administração da substância (ANVISA, 2013). As fêmeas testadas devem ter seus sinais clínicos e a mortalidade, bem como alterações na massa corporal e no consumo de ração, observados durante todo o período gestacional. Por fim, as progenitoras são eutanasiadas um dia antes do parto e analisadas quanto à presença de alterações macroscópicas em órgãos e quanto à sua capacidade reprodutiva (contagem de corpos lúteos, número de implantações, avaliação da placenta, entre outros dados analisados em outros estudos de toxicidade disponíveis). Cada feto da prole deve ser analisado quanto à sua vitalidade, massa corporal e presença de anormalidades externas e/ou histopatológicas (ANVISA, 2013; OECD, 2015).

Embora os estudos de toxicidade reprodutiva não possam oferecer informação completa e definitiva sobre a toxicidade de quaisquer substâncias na reprodução humana, ainda assim, são um valioso recurso inicial na busca por manifestações pós-natais decorrentes da exposição pré-natal a determinado xenobiótico (OECD, 2015).

Genotoxicidade

Os ensaios de genotoxicidade são utilizados para prever o potencial de a substância teste produzir alterações genéticas em células somáticas e/ou células germinativas. Quando ocorrem em células somáticas, as alterações genéticas podem resultar em câncer ou outras doenças degenerativas. Caso ocorram em células germinativas, podem gerar doenças genéticas que são transmitidas para as gerações seguintes (OECD, 2016a). Os ensaios são realizados *in vitro* ou *in vivo*. Bactérias ou células de mamíferos são utilizadas *in vitro*, enquanto roedores (camundongos ou ratos) são utilizados *in vivo*. É importante observar que os testes de genotoxicidade também são realizados com objetivos distintos da investigação de toxicidade da substância teste para fins regulatórios. É possível avaliar se populações humanas ou de outros organismos são afetados por exposições ambientais. Essas exposições podem ser, por exemplo, água de rios, lodo de estações de tratamento de efluentes ou atmosfera

poluída de cidades e locais de trabalho. Em relação às amostras analisadas, pode-se coletar células da mucosa bucal ou de sangue humanas, amostras de peixes, partes de plantas entre outras.

A OECD publica e atualiza diretrizes para a condução de ensaios de genotoxicidade. A Anvisa solicita o teste mutação gênica em bactérias (teste de Ames) e dano cromossômico *in vitro* e/ou *in vivo* (ANVISA, 2013). Dependendo da substância teste, outros ensaios podem ser conduzidos e incluídos no dossiê de solicitação de autorização para estudos em humanos junto à Anvisa. Neste capítulo será abordado a avaliação de dano cromossômico *in vivo*. Nesses ensaios, fatores como biotransformação, farmacocinética e processos de reparo contribuem para avaliar a resposta tóxica.

Para entender dano cromossômico, é necessário abordar o conceito de mutagenicidade e genotoxicidade. Uma substância mutagênica induz alterações na estrutura do DNA ou dos cromossomos. Essas alterações são passadas para as gerações seguintes. Os testes de micronúcleo e de aberração cromossômica detectam se a substância é mutagênica. Por outro lado, o termo genotoxicidade é mais abrangente e afeta a integridade e estabilidade do genoma. Inclui qualquer dano ao DNA, seja ele irreversível ou reversível. Pode ou não resultar em mutação direta. Portanto, o termo genotoxicidade inclui a mutagenicidade. Por exemplo, o ensaio do cometa, também conhecido como eletroforese alcalina de uma única célula, é utilizado para detectar se a substância é genotóxica, uma vez que algumas quebras da fita de DNA detectadas podem ser reparadas. Para efeitos regulatórios, é melhor priorizar os eventos irreversíveis como a mutagênese (OECD, 2016a).

Os testes para danos cromossômicos *in vivo* incluídos nas diretrizes da OECD são: teste de micronúcleo em eritrócito de mamíferos, teste de aberração cromossômica em medula óssea de mamíferos e ensaio de translocação hereditária em camundongos. Este último requer grande número de animais e é raramente utilizado. Agências regulatórias como a Anvisa geralmente solicitam o teste de micronúcleo ou o de aberração cromossômica. Para seguir os princípios dos 3Rs, a OECD sugere que diferentes tipos de ensaios genotóxicos sejam realizados no

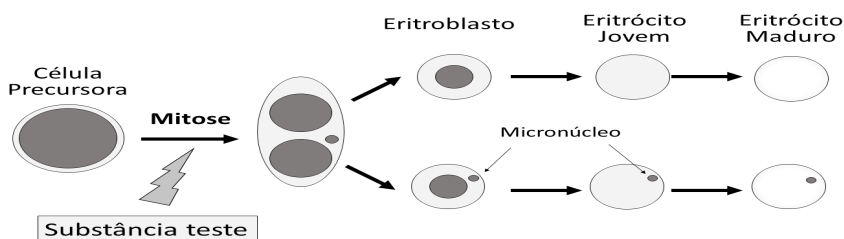
mesmo animal, como o teste de micronúcleo em medula óssea e o ensaio do cometa em fígado. Outra estratégia é aproveitar os animais utilizados nos protocolos de doses repetidas e conduzir o teste do micronúcleo ao final do período de tratamento. A partir de 2014, o CONCEA recomenda a utilização do procedimento de teste de micronúcleo *in vitro* (OECD 487) (OECD 2016b) como método alternativo ao uso de animais para avaliar a genotoxicidade.

O **teste do micronúcleo** (OECD 474) (OECD, 2016c) em eritrócitos de mamíferos é muito utilizado para identificar substâncias que causam quebras no cromossomo. Quando a célula precursora dos eritrócitos é exposta à substância teste, esta pode induzir lesões no DNA que resultam ou não em quebras nos cromossomos. Durante a mitose, o fragmento de cromossomo não se liga às fibras do fuso mitótico. Após a divisão celular, o fragmento permanece no citoplasma, fora do núcleo da célula, e dá origem ao micronúcleo. Durante a diferenciação do eritrócito, o núcleo do eritroblasto é excluído para formar o eritrócito jovem. Se houver presença de micronúcleo, ele permanece no eritrócito (Figura 1). A causa da formação do micronúcleo pode ser decorrente de eventos clastogênicos (quebras com formação de fragmentos de cromatina) ou aneugênicos (perda de cromossomo inteiro que resulta em anormalidades numéricas). A quantificação da frequência de micronúcleos é realizada por técnicas de microscopia de fluorescência com corante laranja de acridina, microscopia óptica com corante Giemsa ou citometria de fluxo. O uso da técnica de FISH (do inglês *fluorescence in situ hybridization*), assim como corantes específicos de centrômeros, permite identificar o mecanismo de indução de micronúcleo como aneugênico se apresentar centrômero ou clastogênico se o centrômero estiver ausente. Nas técnicas de microscopia, o eritrócito jovem apresenta coloração diferente do eritrócito maduro. Assim, é possível mensurar a frequência de micronúcleos apenas nos eritrócitos jovens. Essa diferenciação permite ter certeza de que o eritrócito com micronúcleo é decorrente da exposição à substância teste e não a exposições prévias. Esse teste pode ser realizado em eritrócitos da medula óssea ou eritrócitos do sangue periférico. Deve-se considerar que os ratos, semelhantes aos humanos, têm a capacidade de retirar os eritrócitos micronucleados da

circulação. Esse fato justifica o período de coleta após a exposição à substância teste. A amostragem é realizada entre 18 e 24 h para medula óssea, enquanto que para sangue periférico é de 36 a 72 h. Períodos superiores não são recomendados. Em camundongos, que não têm a exclusão de eritrócitos micronucleados na circulação sanguínea, é possível quantificar a frequência de eritrócitos micronucleados em eritrócitos maduros. Entretanto, a exposição deve ser superior a 28 dias, que é o tempo necessário para renovação das hemácias da circulação do camundongo. Recomenda-se o uso de 5 animais por grupo. É realizado com três doses escolhidas a partir dos ensaios de toxicidade aguda ou de doses repetidas. Não exceder 2000 mg/kg/dia na exposição até 14 dias e 1000 mg/kg/dia em tempos maiores de exposição. Devem-se incluir controles negativos e positivos. Para as análises microscópicas, estima-se a frequência de micronúcleos em 4000 eritrócitos jovens. Caso a incidência de micronúcleos no controle seja menor que 0,1%, deve-se aumentar o número de eritrócitos jovens analisados. Na análise, deve-se estimar a citotoxicidade do tratamento por meio da proporção de eritrócitos imaturos para o total de eritrócitos (eritrócitos jovens/[eritrócitos jovens + eritrócitos maduros]).

Nessa fase, os cromossomos estão condensados, mas não há separação das cromátides. Observar que a colchicina deve ser administrada antes da coleta (3 a 5 h para ratos e 2 a 5 h para camundongos). Geralmente, utilizam-se 5 animais por grupo. O tratamento é realizado em três doses e a maior dose deve indicar alguma toxicidade na medula óssea. Não exceder 2000 mg/kg/dia na exposição até 14 dias e 1000 mg/kg/dia em tempos maiores de exposição. Incluir controles negativos e positivos. A análise é feita por microscopia óptica com corante Giemsa. Determina-se o índice mitótico em pelo menos 1000 células por animal. A quantificação de aberrações cromossômicas é realizada em pelo menos 200 metáfases por animal.

Figura 1 – Representação simplificada da formação de eritrócitos micronucleados na medula óssea. Quando a célula precursora é exposta à substância teste, podem ocorrer danos cromossômicos. Fragmentos ou cromossomos inteiros são mantidos fora do núcleo durante a mitose. Após a exclusão do núcleo do eritroblasto, os micronúcleos são visualizados nos eritrócitos jovens da medula óssea ou na circulação sanguínea



Fonte: Próprios autores (2017).

O **teste de aberração cromossômica** (OECD 475) (OECD, 2016d) geralmente é realizado em medula óssea de roedores. As aberrações cromossômicas estruturais ocorrem nos cromossomos ou nas cromátides. Identificam-se deleções, rearranjos de cromossomos e translocações, que são visualizadas mais facilmente se utilizada a técnica de FISH. É possível observar alterações numéricas nos cromossomos, mas o teste não é planejado para detectar aneuploidia. Quando presentes, os resultados indicam perturbação no ciclo celular ou citotoxicidade. Realiza-se a coleta da medula óssea em dois tempos, sendo o primeiro entre 12 a 18 h após o tratamento. A segunda coleta é realizada após 24 h da primeira coleta e somente no grupo de maior dose. Para visualizar os cromossomos, administra-se uma substância que cause a parada do ciclo celular na metáfase, como a colchicina *in vivo*.

Os resultados para cada animal devem incluir o número de aberrações por célula e a porcentagem de células com aberrações cromossômicas estruturais. Células com *gaps*, poliploides e cromossomos endoreduplicados são registrados separadamente. Para evitar interfe-

rência de artefatos durante a preparação, o número de centrômeros não deve ser menor que 2 vezes o número haploide de cromossomos para a espécie ($n \pm 2$).

Conclusões

O presente capítulo revisou alguns ensaios em animais para avaliar a toxicidade. Além dos estudos citados, outros são utilizados para caracterizar a toxicidade antes da realização de ensaios clínicos em humanos, por exemplo, estudos de carcinogenicidade, toxicocinética, farmacocinética, fotosssegurança, farmacológicos, imunotoxicológicos, entre outros. A escolha do teste depende de como a substância será utilizada. É importante observar que os testes de toxicidade em animais são executados para caracterizar os efeitos tóxicos que a substância possa causar e não para mostrar que a substância teste é plenamente segura. Os resultados são utilizados para estabelecer os limites de exposição, assim como, as doses a serem utilizadas nos ensaios clínicos em humanos. A experimentação em animais continua sendo uma prática disseminada em todo mundo. Todavia, a emergência de métodos baseados nos princípios dos 3 Rs contribui grandemente para minimizar o uso e o sofrimento das espécies animais experimentais.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Anvisa). **Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasília, DF, 2013. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e0f1d9004e6248049d5fddd762e8a5ec/Guia+de+Estudos+N%C3%A3o+Cl%C3%93nicos++vers%C3%A3o+2.pdf?MOD=AJPE RES>>. Acesso em 30 jan. 2017.

BRASIL, Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. DOU 9 de outubro de 2008.

CAZARIN K. C. C., CORRÊA C. L., ZAMBRONE F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n.3 p. 289-299, 2004.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **U. S. Public Health Service Syphilis Study at Tuskegee**. EUA, 2015. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/tuskegee/timeline.htm>>. Acesso em 30 jan. 2017.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Guideline for reproductive toxicity risk assessment EPA/630/R96/009**. Washington, EUA: U. S. EPA, 1996. Disponível em: <http://www2.epa.gov/sites/production/files/2014-1/documents/guidelines_repro_toxicity.pdf>. Acesso em 30 jan. 2017.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. **Guidance for Industry -Single Dose Acute Toxicity for Pharmaceuticals**. Maryland: 1996. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM079270.pdf>>. Acesso em 30 jan. 2017.

KALTER, H. Teratology in the 20th century: environmental causes of congenital malformations in humans and how they were established. **Neutotoxicology and Teratology**, v. 25, p. 131-282, 2003.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. **Reproduction /Developmental Toxicity Screening Test, nº 421**. Paris, FR: OECD, 2015.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. **Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents nº 408**. Paris, FR: OECD, 1998a.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. **Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Non-Rodents nº 409**. Paris, FR: OECD, 1998b.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. **Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure, nº 420**. Paris, FR: OECD, 2001a.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. **Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method, nº 423**. Paris, FR: OECD, 2001b.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). OECD Series on Testing and Assessment nº 24. **Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing**. Paris, FR: OECD, 2001c.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. **Acute Oral Toxicity –Up-and-Down Procedure (UDP) nº 425**. Paris, FR: OECD, 2008a.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. **Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents nº 407**. Paris, FR: OECD, 2008b.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. In: **Series on Testing and Assessment, nº 234**. ENV Publications. Paris, FR: OECD, 2016a.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. **In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, nº 487**. Paris, FR: OECD, 2016b.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. **Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, nº 474**. Paris, FR: OECD, 2016c.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. **Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test, nº 475**. Paris, FR: OECD, 2016d.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Handbook – Non Clinical Safety Testing**. Geneva: TDR/WHO, 2004. 117p. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/publications/training-guideline-publications/handbook-non-clinical-safety-testing/en/>. Acesso em 30 jan. 2017.

Parte IV

Saúde animal e saúde pública

19.

USO DE PRODUTOS ALTERNATIVOS AOS ANTIMICROBIANOS NA AVICULTURA

ELIETE SOUZA SANTANA
MARIA AUXILIADORA ANDRADE
ROBSON RODRIGUES SANTANA

Avicultura destaca-se entre as atividades do setor agropecuário mundial, com índices de produção em constante crescimento. O aumento na produção de carne de frangos foi consequência de avanços em genética, nutrição, sanidade e manejo, que elevaram os níveis de produtividade e desempenho (VASCONCELOS, 2015).

O setor avícola tem se destacado, devido a grandes investimentos tecnológicos, passando a atividade a ser de grande importância econômica e representa, atualmente, 2% do Produto Interno Bruto (PIB) do país e movimenta mais de 7 bilhões de dólares ao ano. Nos últimos 20 anos, a produção de frangos por ano saltou de 2.469,7 milhões de toneladas para 4.304,1 milhões de toneladas em 2015 (UBABEF, 2016).

O Brasil é, na atualidade, o segundo maior produtor mundial de *commodities* avícolas e também o primeiro exportador de carne de frango. Dentre as muitas ações adotadas para manter-se nesse patamar de grande exportador, o Brasil tem buscado adaptar-se às exigências internacionais, atendendo às legislações vigentes sobre restrição do uso de antimicrobianos como promotores de crescimento na alimentação dos animais.

Em virtude do rápido ciclo de produção e da grande demanda por produtos de origem avícola, a produção de frangos tem direcionado

esforços nos últimos anos na máxima produção de proteína animal em menor tempo possível. Ressalta-se que a utilização dos antimicrobianos em várias fases do ciclo de produção das aves tem contribuído para maximizar a produtividade nessa espécie. Portanto, além do seu uso na terapia, os antimicrobianos têm aplicação em medidas de profilaxia e como promotores de crescimento. De acordo com UBABEF (2016), isso tem reduzido o valor terapêutico desses compostos, tanto para o tratamento das doenças animais, quanto para a sua aplicação em humanos devido ao decréscimo da suscetibilidade desses microrganismos.

Devido ao surgimento de problemas relacionados ao uso de antimicrobianos na ração de animais, principalmente em relação à saúde pública, seu uso tem sido restringido, levando ao estudo por parte de cientistas e empresas de potenciais produtos alternativos. Considerando tais aspectos, buscou-se fazer uma revisão de literatura a respeito do conhecimento da microbiota intestinal e dos principais produtos alternativos aos antimicrobianos utilizados na avicultura.

A polêmica da utilização de antimicrobianos na produção de aves

Os antimicrobianos têm sido utilizados como promotores de crescimento na produção de frangos de corte há mais de cinco décadas, sustentando a cadeia avícola, melhorando o desempenho animal, a conversão alimentar e diminuindo a mortalidade causada por infecções clínicas. Os antimicrobianos promovem, assim, o barateamento do custo do alimento para o consumidor, pois causam o encurtamento dos dias de abate para o mercado, fazem que haja mais ciclos produtivos por unidade de tempo, menor desperdício e potencial redução no impacto ambiental e redução da incidência de doenças (TORRES et al., 2015).

Após anos de uso de antibióticos, como promotores de crescimento na alimentação de aves, alguns questionamentos foram levantados. Entre eles, se esses produtos continham os mesmos princípios ativos de antibióticos utilizados na terapêutica humana ou se apresentavam moléculas cuja estrutura induzia resistência cruzada a antibióticos administrados em humanos. Resíduos desses antibióticos poderiam permanecer na carne e, assim, ser transmitidos ao consumidor

final, propiciando o aparecimento de resistência de bactérias intestinais aos promotores de crescimento (FUKAYAMA et al., 2005), evidenciando que a saúde dos animais produtores de alimento está diretamente relacionada à saúde humana.

Esse fato não seria apenas teórico, como pode ser exemplificado com o ocorrido com as fluorquinolonas na criação avícola. Um estudo desenvolvido nos Estados Unidos da América (EUA), de 1992 a 1998, mostrou haver um aumento de infecções ligadas à concessão de licença para uso de fluorquinolonas na produção de frangos. Assim, verificou-se um aumento na incidência de *Campylobacter jejuni* resistente, infectando pessoas, que foi relacionado ao consumo de frangos contaminados por *Campylobacter*. Essa resistência ocorreu primariamente após 1995, o que coincide com a data que as quinolonas foram aprovadas para uso nas aves como aditivo na água de beber (GÓRNIAK; SPINOSA, 2007).

Estudos realizados indicam que a simples retirada dos antibióticos promotores de crescimento da dieta de frangos de corte leva a uma diminuição média no desempenho das aves de 3% a 7%, além do impacto negativo sobre a saúde animal e aumento da mortalidade. Provavelmente, a proibição total dos antibióticos promotores de crescimento resultará em menor lucratividade para o setor (LANGHOUT, 2005).

Segundo Ito et al. (2005) e Souza et al. (2015), os antibióticos promotores de crescimento são prescritos para controlar ou equilibrar a proliferação de bactérias Gram-positivas que liberam metabólitos tóxicos que comprometem o ganho de peso.

Mas, para Górniak e Spinosa (2007) os antibióticos promotores de crescimento podem acarretar problemas potenciais à saúde do homem, como toxicidade, alergia e desenvolvimento de resistência, razão pela qual vêm sendo criticados severamente. Além disso, causam efeitos teratogênicos, carcinogênicos e mutagênicos, o que tem trazido preocupações à saúde pública.

Entretanto, em consequência do banimento dos antimicrobianos na ração dos animais, na Europa, tornaram-se necessários o conheci-

mento e a criação de meios de manipulação da microbiota intestinal através de produtos alternativos, para compensar as perdas de produtividade com a retirada dos antimicrobianos promotores de crescimento da dieta.

Principais produtos alternativos aos antimicrobianos na avicultura

Desde a segunda metade da década de 90, vários países importadores de carne de frango têm aumentado as exigências quanto à utilização de promotores de crescimento. Em 1999, a União Européia banuiu o uso de cinco antibióticos promotores de crescimento (avoparcina, bacitracina de zinco, espiramicina, virginiamicina e tilosina) e em 2006 também foram proibidas a utilização de mais quatro substâncias: monensina, salinomycin, avilamicina e flavofosfolipol. Dessa forma, há necessidade em substituir os antibióticos por substâncias naturais, que garantam a eficácia nutricional das empresas produtoras de frangos de corte sem deixar resíduos (AGROBRASIL, 2008; LEMOS et al., 2016).

Em escala mundial, estima-se em 27 mil toneladas a quantidade de antibióticos usados em saúde animal. Desses, 25% foram usados dentro da União Europeia, sendo 50% destinados a fins terapêuticos, 25% incorporados na alimentação, com o objetivo de promover o crescimento, e 25% usados na prevenção da coccidiose em frangos e perus de carne, como aditivos alimentares ionóforos (COSTA, 2007).

Há consenso em vários países que o uso indiscriminado de antibióticos na produção animal é uma das causas do aumento da resistência antimicrobiana devido à seleção de bactérias resistentes (DIARRA et al., 2014). Na análise do perfil de resistência de 195 amostras de *S. Enteritidis* de origem humana e não-humana, isoladas entre 1996 e 1999, frente a 19 agentes antimicrobianos, verificou-se resistência em 63,5% das cepas, com a maioria delas resistente a apenas um ou dois antimicrobianos. Entretanto, observaram-se, também, algumas cepas multirresistentes a até sete antibióticos, principalmente nas amostras de origem humana (TAVECHIO et al., 1999).

Buscando atender às exigências mercadológicas, as empresas avícolas passaram a investir em produtos alternativos aos antimicrobianos para produção de aves com rações isentas de promotores de crescimento. Entre os chamados “alternativos aos antimicrobianos”, estão os probióticos (microrganismos vivos), prebióticos (carboidratos especificamente utilizados por um grupo de bactérias desejáveis), ácidos orgânicos, enzimas e extratos de ervas/óleos essenciais (fitoterápicos ou nutracêuticos) (DIARRA et al., 2014).

Probióticos

Probióticos são microrganismos vivos, capazes de afetar benéficamente o hospedeiro, melhorando o equilíbrio de sua microbiota intestinal, competindo com a biota patogênica por nutrientes, locais de adesão no epitélio intestinal e sintetizando metabólitos (ácidos orgânicos), podendo realizar a “exclusão competitiva” de bactérias indesejáveis, criando resistência ao crescimento de organismos patogênicos (JUNQUEIRA; DUARTE, 2005; KURITZA et al., 2014).

Ao longo dos anos, a palavra “probiótico” vem sendo usada de diversas maneiras, (FULLER, 1989) tendo como características ideais: ser do hospedeiro de origem; não patogênico; resistir ao ácido gástrico e bile; aderir no epitélio e muco; persistir no trato intestinal; produzir componentes inibitórios; modular a resposta imune e alterar a atividade microbiana local (LEMOES et al., 2016; PATTERSON; BURKOLDER, 2003).

Os probióticos trazem benefícios à saúde do hospedeiro, não deixam resíduos nos produtos de origem animal e não favorecem o aparecimento de resistência bacteriana a drogas (NEPOMUCENO; ANDREATTI, 2000).

Os probióticos podem conter bactérias totalmente conhecidas e quantificadas ou culturas bacterianas não conhecidas. Os principais microrganismos bacterianos considerados como probióticos são aqueles dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, além de *Escherichia*, *Enterococcus* e *Bacillus* (KURITZA et al., 2014; MORAIS; JACOB, 2006). Na composição da maioria dos probióticos, dois gêneros bacterianos se destacam: os *Lactobacillus* e os *Bifidobacterium*. Entretanto, de acordo

com Ferreira (2000), quanto maior for a heterogeneidade de microrganismos que compõem a cultura, maior a eficácia do probiótico, ou seja, a atuação está estritamente dependente da quantidade e características das cepas dos microrganismos utilizados na elaboração.

Os mecanismos de ação dos probióticos não estão totalmente elucidados e compreendidos, porém, sabe-se que a atuação está relacionada à competição por sítios de ligação (exclusão competitiva), ou seja, as bactérias probióticas ocupam sítios de ligação na mucosa intestinal, formando uma barreira física às bactérias patogênicas. Além desse mecanismo, as bactérias probióticas competem por aminoácidos e açúcares, auxiliando a inibição de bactérias enteropatogênicas. Podem, ainda, produzir ácidos orgânicos e bacteriocinas que reduzem o pH intestinal e não permitem o desenvolvimento bacteriano. Além disso, podem estimular o sistema imune a produzir anticorpos, pela ativação de macrófagos, proliferação de linfócitos (LUQUETTI et al., 2005).

Os probióticos podem melhorar o aproveitamento dos alimentos e reduzir a excreção de nutrientes. O uso de probióticos com alta atividade enzimática fornece benefícios adicionais nos termos de reduzir – se custo do suplemento enzimático (KURITZA et al., 2014).

Pedroso et al. (2005) realizaram um estudo coletando amostras de animais de cinco lotes provenientes de diferentes incubatórios da região de São Paulo. Observou-se uma considerável população bacteriana proveniente do tubo digestivo dos pintos já no primeiro dia de vida, sugerindo que a colonização do TGI pela microbiota em aves pode se iniciar antes mesmo da eclosão. Sendo assim, uma possível alternativa seria a utilização de probiótico, inoculado via ovo, para fornecer bactérias benéficas aos pintos antes da eclosão e permitir a colonização de bactérias desejáveis, antecipando a maturidade do TGI das aves (DIARRA et al. 2014; OLIVEIRA, 2004).

Leandro et al. (2004), inoculando “in ovo” probióticos (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* e *Enterococcus faecium*) aos 17 dias de incubação e tendo como desafio *Salmonella* Enteritidis inoculada via papo logo após a eclosão, encontraram que pintos desafiados apresentaram melhores resultados quando receberam probiótico. Os mesmos

autores observaram que, aos sete e 21 dias de idade, a *Salmonella* Enteritidis foi identificada somente nas aves desafiadas que não receberam o tratamento do probiótico, sugerindo que as bactérias probióticas evitaram a colonização do TGI das aves pela bactéria patogênica.

Tem sido relatado que alguns probióticos afetam a translocação (passagem de microrganismos através de mucosas) bacteriana a partir do intestino, o que seria de grande importância para evitar as infecções de origem entérica, entre as quais as salmoneloses têm destacada importância (SANTOS; TURNES, 2005). Line et al. (1998) não observaram a colonização por *Salmonella* após a utilização de probiótico, porém, não houve o mesmo efeito com relação ao *Campylobacter*. Já Hakkinen e Schneitz (1999) obtiveram como resultado a redução da colonização de *Campylobacter jejuni* no ceco.

Prebióticos

O termo prebiótico é utilizado para designar um ou grupo de ingredientes alimentares que não são digeridos pelas enzimas digestivas normais, mas que atuam estimulando seletivamente o crescimento e/ou atividade de bactérias benéficas no intestino que têm, por ação final, melhorar a saúde do hospedeiro. Alguns açúcares absorvíveis ou não, fibras, álcoois de açúcares e oligossacarídeos estão dentro desse conceito (BRITO et al., 2013; JUNQUEIRA; DUARTE, 2005).

Para que um componente alimentar seja classificado de prebiótico, não deve ser hidrolisado nem absorvido na parte superior do trato gastrointestinal, deve ser um substrato seletivo para uma ou um número limitado de bactérias comensais benéficas no lúmen intestinal, as quais são estimuladas a crescer e/ou ativadas metabolicamente (ITURRINO, 2004; PÊSSOA et al., 2012).

Os prebióticos compreendem ingredientes nutricionais não digeríveis que atuam como inibidores de adesão de bactérias patogênicas na superfície epitelial e que potencializam o crescimento das populações de bifidobactérias e lactobacillus. Esses produtos afetam benéficamente o hospedeiro, ativando o metabolismo de uma ou mais bactérias benéfi-

cas, induzindo a efeitos desejáveis sistêmicos ou na luz intestinal (ANDREATTI FILHO, 2008; BRITO et al., 2013).

As substâncias que mais têm sido estudadas como aditivos alimentares prebióticos são os oligossacarídeos, especialmente os frutooligossacarídeos (FOS), glucoligossacarídeos (GOS) e mananoligossacarídeos (MOS). FOS são polímeros ricos em frutose, podendo ser naturais derivados de plantas (inulina) ou sintéticos resultantes da polimerização da frutose (GIBSON; ROBERFROIDE, 1995). GOS e MOS são obtidos da parede celular de leveduras, tendo em sua constituição, principalmente proteína e carboidrato. O MOS consiste de fragmentos de *Saccharomyces cerevisiae* com uma estrutura complexa de manose fosforilada, glicose e proteína (MACARI; FURLAN, 2005; SANTANA et al., 2011).

Xu et al. (2003) relataram que o número de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* aumentou pela administração de prebióticos na dieta de pintos. No intuito de verificar se o fornecimento de prebióticos poderia promover o aumento de população bacteriana comensal do TGI, impedindo que outros microrganismos indesejáveis se estabeleçam, Janssens et al. (2004), fornecendo frutoligossacarídeos na água de bebida para pombos, verificaram que o prebiótico não favoreceu a eliminação de *Salmonella* Thyphimurium testada como desafio.

Lan et al. (2005), realizando uma pesquisa com microrganismos e prebióticos, descreveram que prebióticos na dieta de aves aumentam sua imunocompetência por elevação dos níveis de anticorpos plasmáticos. Também Loddi et al. (2006) relataram que monooligossacarídeos possuem características específicas que permitem reduzir a colonização de patógenos no organismo, causando benefícios à saúde do animal.

Embora os prebióticos sejam descritos na literatura como benéficos à digestibilidade dos nutrientes e, conseqüentemente, à melhora do desempenho, Oliveira et al. (2005) utilizando o mananoligossacarídeo (MOS) em dois níveis, 0% e 0,1 % na ração, observaram que não houve efeito sobre os parâmetros de desempenho comparando com aves que receberam ração controle (com antibiótico).

A principal forma de ação dos prebióticos é sobre a modulação benéfica da microbiota nativa presente no hospedeiro e os efeitos resultantes do uso de prebióticos são evidenciados pelo crescimento das populações microbianas benéficas, pela melhora nas condições luminiais, aumentando seu valor osmótico (IMMERSEEL et al., 2004), nas características anatômicas do trato gastrointestinal, promovendo o aumento da superfície de absorção da mucosa intestinal e no sistema imune e, em alguns casos, pela melhora no desempenho animal (PÊSSOA et al., 2012; SILVA; NÖRNBERG, 2003).

Em função da capacidade dos oligossacarídeos MOS de bloquear a aderência de patógenos e evitar a colonização intestinal, uma grande quantidade de pesquisas foi direcionada, no sentido de conhecer, detalhadamente, os benefícios da adição desse prebiótico nas dietas de frango de corte. Foi observado por Collett (2000) melhor conversão alimentar, ao fornecer de 0,5 a 3% de mono-oligossacarídeo para frangos de corte (1 a 10%), em comparação ao tratamento sem o mono-oligossacarídeo.

Segundo Macari e Furlan (2005), a utilização de parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* na dieta de frangos de corte causa aumento significativo dos vilos intestinais nos três segmentos na primeira semana de vida dos pintos. Line et al. (1998), utilizando leveduras do gênero *Saccharomyces boulardi*, constataram a redução da colonização de salmonelas.

Simbióticos

Os suplementos simbióticos são uma mistura de espécies probióticas, atuantes no intestino delgado, além dos prebióticos, que estimulam as bactérias já existentes no cólon (PATTERSON; BURKHOLDER, 2003). Atuam benéficamente o hospedeiro, aumentando a sobrevivência e a implantação da flora bacteriana no TGI, estimulando seletivamente o crescimento e/ou ativação do metabolismo de uma bactéria ou um número limitado de microrganismos que promovem a saúde, e, portanto, o bem-estar do hospedeiro. Dessa forma, podem-se fornecer componentes da microbiota intestinal e também substâncias prebióticas específicas que, em conjunto, podem estimular o desenvolvimento e a

atividade dessa mesma microbiota, podendo potencializar o efeito de ambos os componentes (BRITO et al., 2013).

A interação entre o probiótico e o prebiótico *in vivo* pode ser favorecida por uma adaptação do probiótico ao substrato prebiótico anterior ao consumo. Isso pode, em alguns casos, resultar em uma vantagem competitiva para o probiótico, se ele for consumido juntamente com o prebiótico. Alternativamente, esse efeito simbiótico pode ser direcionado às diferentes regiões-alvo do trato gastrointestinal, os intestinos delgado e grosso (PÊSSOA et al., 2012; SAAD, 2006).

A combinação entre probiótico e prebiótico poderia melhorar a sobrevivência do primeiro, pela disponibilidade do seu substrato. Isso resultaria em vantagens para o hospedeiro, tanto pela presença da microbiota benéfica quanto pela fermentação (IMMERSEEL et al., 2004; SANTANA et al., 2011), que atuam também no desenvolvimento fisiológico e imunológico do trato digestório, melhorando a digestibilidade, absorção de alimentos e resistência às infecções e toxinas (ANDREATTI FILHO; SILVA, 2005).

A inoculação constante de simbióticos reduz a incidência de enterites, controla patógenos intestinais como as *Salmonellae*, *Clostridium* spp., *Campylobacter* spp., melhorando a absorção de nutrientes, a eficiência alimentar, a taxa de crescimento e uniformidade dos lotes (JUNQUEIRA; DUARTE, 2005).

Ácidos orgânicos

Ácidos orgânicos são classificados na categoria de aditivos químicos (GONZALES, 2002; PICKLER et al., 2012) e alguns empregados na alimentação animal. Contêm uma ou mais carboxilas (R-COOH) e são ácidos fracos de cadeia curta, possuindo entre um e sete carbonos. Por essas características, são apontados como agentes de atividade antimicrobiana, em que o pH do meio desempenha papel relevante na preservação de rações (DIBNER; BUTTIN, 2002). A acidificação dos alimentos tem potencial para controlar bactérias, podendo melhorar o crescimento e a eficiência alimentar, eliminando microrganismos que competem por nutrientes (ROCHA et al., 2004).

Esses efeitos positivos dos ácidos orgânicos podem ser explicados por diversos mecanismos, incluindo um efeito de redução do pH, propriedades bacteriostáticas e diversas propriedades metabólicas da porção aniônica dos ácidos orgânicos após a dissociação (LANGHOUT, 2005; PICKLER et al., 2012).

A ação antimicrobiana desses aditivos de rações animais ainda gera muita discussão (BLACK et al., 2006). Possuem poder bacteriostático e bactericida, desde que haja moléculas dissociadas em quantidade suficiente e tempo de contato adequado com o alvo. Segundo Le Ny (2005), os ácidos têm primordialmente dois modos de ação: diminuição de pH intracelular, desfavorecendo a permanência dos patógenos, e interferência na síntese de DNA pela interrupção da síntese proteica.

Os ácidos orgânicos têm potencial para controlar todas as bactérias entéricas, tanto patogênicas quanto não-patogênicas. Adicionalmente, podem melhorar o desempenho e a eficiência alimentar por meio da eliminação dos organismos que competem com a ave por nutrientes, benefício que também é atribuído aos antimicrobianos (LANGHOUT, 2005; PICKLER et al., 2012).

Os ácidos orgânicos são facilmente absorvidos através da parede celular das bactérias, quando não dissociados. Uma vez na célula, a porção aniônica do ácido danifica a estrutura do DNA e, consequentemente, as bactérias não conseguem mais dividir, ou acabam morrendo. Já a porção catiônica reduz o nível do pH na célula, obrigando a bactéria a utilizar sua energia para liberar os prótons, levando a uma exaustão bacteriana (GAUTHIER, 2002).

O efeito do ácido fumárico sobre o desempenho de frangos de corte foi verificado por Sakomura et al. (1994), que observaram redução no consumo de ração e melhora na conversão alimentar, indicando o nível de 0,5% nas rações. Outros ácidos também foram testados em rações de frangos de corte, como o ácido fórmico e propiônico. Vale et al. (1999) observaram que a adição de 2% da mistura dos ácidos orgânicos reduziu o desempenho na fase inicial, ao passo que, no período total (42 dias de idade), somente o consumo de ração foi afetado.

Além do efeito bactericida, os ácidos orgânicos agregam também propriedades antifúngicas. Krabbe et al. (1997) verificaram que a utilização dos ácidos propiônico e acético é eficiente para controlar o crescimento fúngico do milho com alto teor de umidade, desde que o armazenamento não seja superior a 40 dias para o propiônico e 20 dias para o acético.

Rocha (2008), ao fornecer 0,4% de misturas de ácidos orgânicos na ração de frangos de corte frente ao desafio com *Salmonella Typhimurium* durante o período de um a 28 dias de idade, verificou que o ácido melhorou os parâmetros de desempenho e a saúde intestinal das aves. Resultados semelhantes foram encontrados por Li et al. (2008), que relataram que o produto na concentração de 0,5% melhorou o ganho de peso e a conversão alimentar quando comparado ao grupo controle.

Enzimas

As enzimas exógenas de maneira simplificada são definidas como catalisadores biológicos que aceleram as reações químicas. Não são organismos vivos, mas sim produtos de organismos vivos como bactérias e fungos (HANNAS; PUPA, 2007).

As enzimas exógenas vêm sendo utilizadas principalmente com o objetivo de melhorar a digestibilidade de fontes alternativas de energia, como centeio, trigo, cevada e aveia, tendo, como consequência, uma melhora no ambiente dos animais ao apresentarem fezes mais secas e sem resíduo de alimento (MURAKAMI et al., 2007; SANTANA et al., 2011).

As aves não sintetizam ou produzem em quantidades suficientes certas enzimas endógenas, utilizadas para a digestão dos vários componentes químicos encontrados nos alimentos de origem vegetal ou para atuarem em alguns processos anti-nutricionais, como o fósforo fítico (COSTA et al., 2007). As enzimas com maior potencial de utilização na dieta das aves são a fitase, a glucanase e endoxilase, amilase, proteases e pectinases (LIMA, 1999).

A adição de enzimas, em rações contendo ingredientes com alta porcentagem de polissacarídeos não amiláceos e/ou fatores antinutricio-

nais, melhora a digestibilidade dos nutrientes e, consequentemente, exerce um efeito positivo sobre o desempenho de suínos e aves (HANNAS; PUPA, 2007).

As enzimas são responsáveis pela clivagem dos componentes dos alimentos, tornando os nutrientes mais disponíveis para a absorção. As enzimas apresentam maior eficiência quando utilizadas com grãos de baixa qualidade, aumentando a disponibilidade energética e reduzindo a variação entre lotes do mesmo grão, resultando em melhor desempenho das aves. Adicionar enzimas a dietas sem a presença de antibióticos parece ser vantajoso. Tal fato decorre de que, além de bactérias patogênicas, certos antibióticos também eliminam bactérias benéficas que atuam sobre a digestão de amido e fibra (COSTA, 2007; LIMA, 1999).

Murakami et al. (2007), estudando o efeito da suplementação enzimática no desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais, concluíram que a inclusão de complexos enzimáticos nas rações das aves pode maximizar o uso dos ingredientes energéticos e proteicos das rações. É fundamental, entretanto, uma correta avaliação nutricional dos ingredientes, conjuntamente com a viabilidade econômica do uso dessa tecnologia.

Extratos de ervas e óleos essenciais

A utilização de extratos vegetais e plantas medicinais para humanos data de milhares de anos, sendo difundida no Egito Antigo, China, Índia e Grécia (FREITAS et al., 2012; MARTINS et al., 2000). Extratos de ervas e óleos essenciais têm sido usados como alimento humano durante anos e muitos têm sido reconhecidos pelo seu benefício à saúde humana e animal. É difícil distinguir entre eles, porque os óleos são uma mistura de fragrância e compostos voláteis (FREITAS et al., 2012).

Os extratos herbais, utilizados como substâncias antimicrobianas, podem controlar e limitar o crescimento e a colonização de numerosas espécies bacterianas patogênicas e não patogênicas nos intestinos (HERNANDEZ, 2004). Há evidências para sugerir que ervas e especiarias e vários outros extratos possuem propriedades antimicrobianas, contudo, os mecanismos são pouco entendidos. Efeitos de extratos

herbais podem ser devido à maior eficiência na utilização dos alimentos, resultando em melhor desempenho (DORMAN; DEANS, 2000; FREITAS et al., 2012).

Estudos têm indicado atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (LEE et al., 2004) e ganharam muita atenção devido ao seu potencial como alternativa a antibióticos. Lee e Ahn (1998) registraram que o cinamaldeído, derivado do óleo de canela, inibe *Clostridium perfringens* e *Bacteroides fragilis in vitro* e inibe moderadamente *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus* isolados de humanos.

Além disso, várias outras pesquisas *in vitro* têm sido publicadas com apresentação de uma ampla atividade antimicrobiana dos óleos essenciais derivados da canela e do orégano (LEE et al., 2004). Entretanto, o exato mecanismo antimicrobiano dos óleos essenciais é pouco conhecido e acredita-se que esteja associado com suas propriedades lipolíticas e sua estrutura química.

Helander et al. (1998) investigaram como dois fenóis isoméricos, carvacrol e timol, e o fenilpropanoide, cinamaldeído, exercem seus efeitos sobre *E. coli* O: 157 e *Salmonella* Typhimurium. Tanto o carvacrol como o timol desintegraram a membrana da bactéria, levando à liberação de materiais associados à membrana. Alcançaram o interior das células e danificaram o sistema enzimático da bactéria. Portanto, essas substâncias obtidas de plantas apresentam efeito antimicrobiano, semelhante ao dos antibióticos.

Estudos da atividade mínima inibitória, que corresponde à medida padrão de poder bacteriostático de extratos vegetais em alguns microrganismos, demonstraram que alguns extratos são tão eficientes quantos alguns antimicrobianos (KAMEL, 2000). O óleo essencial de uma única planta pode ter amplo espectro de ação bactericida *in vitro*. Por exemplo, o óleo essencial de canela, que contém cinamaldeído, eugenol e carvacrol, apresenta atividade inibitória contra *Escherichia coli*, *P. aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* Typhimurium, *Campylobacter* e *Clostridium perfringens* (CHANG et al., 2001).

Considerações finais

A produção avícola brasileira, visando ao estabelecimento como um dos maiores exportadores, depende do bom desempenho zootécnico e sanitário animal. O país passa por um período de intensas modificações em sua estrutura de produção, principalmente frente ao mercado consumidor externo. Exigências quanto ao banimento de determinados aditivos promotores de crescimento da ração das aves implicam na necessidade de pesquisas em busca de novos produtos e de resultados promissores que possam substituir os antibióticos.

A proibição imposta sobre os antibióticos promotores de crescimento na União Europeia vem promovendo intensas mudanças no cenário produtivo avícola brasileiro. O uso dessas substâncias de forma subterapêutica, aliado ao melhoramento genético, conhecimento das exigências nutricionais e novas técnicas de manejo, permitiu a maximização dos lucros na cadeia produtiva e o destaque da avicultura brasileira no cenário mundial.

A retirada dos antimicrobianos, que antes eram utilizados como profiláticos e promotores de crescimento em aves, tem causado a ocorrência de várias doenças nos plantéis avícolas, havendo, então, a necessidade de utilização de antimicrobianos com efeitos curativos. Surge, assim, uma maior utilização de antimicrobianos na avicultura do que seria normalmente utilizada antes dessas novas legislações em vigência, o que causa sérios problemas à saúde pública e à medicina humana, surgindo a necessidade do uso de produtos alternativos aos antibióticos convencionais.

Pesquisas realizadas apontam os aditivos como uma boa opção para substituição dos antibióticos, pois atuam não somente no trato gastrointestinal, mas também modificam a microbiota intestinal, promovendo um melhor aproveitamento dos nutrientes, refletindo na expressão de todo o potencial genético. Apesar do montante de pesquisas e de resultados, relativamente satisfatórios, ainda são necessários maiores investimentos na área, para melhor entendimento e manipulação da microbiota intestinal e, conseqüentemente, obtenção de resultados eficazes que possam se equiparar aos resultados dos antibióticos.

Referências

- AGROBRASIL. Valorização dos Agronegócios. 2008. Disponível em: <http://www.agrobrasil.agr.br/home/busca.asp>, acesso em: 22 de agosto de 2008.
- ANDREATTI FILHO, R. L. Alimentos funcionais na Produção Avícola. In: ANDREATTI FILHO, R. L. **Saúde Aviária e Doenças**. São Paulo: Ed. ROCA, 2008. cap. 4, p. 41-52.
- ANDREATTI FILHO, R. L.; SILVA, E. N.; BALEN, L. Probióticos e correlatos na produção avícola. In: PALERMO NETO, J.; SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L. **Farmacologia aplicada à avicultura**. São Paulo: ROCA, 2005. cap. 15, p. 225-237.
- BLACK, A.; BELTRÃO, N.; LEÃO, J. A. Monitoria e controle de *Salmonella*: aspectos práticos. In: VII SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA. **Anais...** Chapecó: Embrapa Suínos e Aves, 2006. p. 95-103.
- BRITO, J. M.; FERREIRA, A. H. C.; JUNIOR, H. A. S.; ARARIPE, M. N. B. A.; LOPES, J. B.; DUARTE, A. R. Probióticos, prebióticos e simbióticos na alimentação de não-ruminantes. **Nutritime**, v. 10, n. 4, p. 2525-2545, 2013.
- CHANG, S. T.; CHEN, P. F.; CHANG, S. C. Antibacterial activity of leat essential oil on their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 123-127, 2001.
- COLLETT, S. Nutrição, imunidade e produtividade. In: Ronda Latino-Americana – O Futuro da Alimentação. **Palestras...** Brasil: Alltech, p. 20-30, 2000.
- COSTA, F. G. P.; BRANDÃO, P. A.; BRANDÃO, J. S.; SILVA, J. H. V. Efeito da enzima fitase nas rações de frangos de corte, durante as fases pré-inicial e inicial. **Ciência Agrotécnica**, v. 31, p. 865-870, 2007.
- DIARRA, M. S.; DELAQUIS, P.; BACH, S.; HARLTON, C.; ASLAM, M.; PRITCHARD, J.; TOPP, E. Antibiotic resistance and diversity of *Salmonella* enterica serovars associated with broiler chickens. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 1, p. 40-49, 2014.
- DIBNER, J. J.; BUTTIN, P. Use of organic acids as a model to study the impact of the microbiota on nutrition and metabolism. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 11, p. 453-463, 2002.
- DORMAN, H. J.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal Applied Microbiology**, v. 88, p. 308-316, 2000.
- FERREIRA, A. J. P. Exclusão competitiva na avicultura. In: SIMPÓSIO SOBRE ADITIVOS ALTERNATIVOS NA NUTRIÇÃO ANIMAL, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 2000. p. 6873. 2000.

FREITAS, E. R.; BORGES, A. S.; TREVISAN, A. T. S.; WATANABE, P. H.; CUNHA, A. L.; NASCIMENTO, G. A. J. Extratos etanólicos da manga como antioxidantes para frangos de corte. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 8, p. 1025-1030, 2012.

FUKAYAMA, E. H.; BERTECHINI, A. G.; GERALDO, A.; KANJI KATO, R. SOLIS MURGAS, L. D. Extrato de Orégano como Aditivo em Rações para Frangos de Corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 6, p. 2316-2326, 2005.

GAUTHIER, R. La Salud Intestinal: Clave de la productividad (El caso de los Ácidos Orgánicos). In: Precongreso Científico Avícola IASA, XXVII Convencion ANECA-WPDC. Puerto Vallarta, Jal. México, 2002. **Anais eletrônicos...** [online] Disponível em: <http://www.etsia.upm.es/fedna/capitulos/00CAP8.pdf>. Acesso em: 16/08/2008.

GIBSON G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota, introducing the connect of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, p. 140-1412, 1995.

GONZALES, E. **Aditivos para rações de aves e suínos**. Botucatu: FMVZ-UNESP (Apostila), 2002. 71p.

GÓRNIK, S. L.; SPINOSA, H. S. Antimicrobianos na Avicultura – Usos e Restrições. In: ANDREATTI FILHO, R. L. **Saúde Aviária e Doenças**. São Paulo: Ed. ROCA, 2007. cap. 3, p. 35-40.

HAKKINEN, M.; SCHNEITZ, C. Efficacy of a commercial competitive exclusion product against *Campylobacter jejuni*. **British Poultry Science**, v. 40, n. 5, p. 619-621, 1999.

HANNAS, M. I.; PUPA, J. M. R. Enzimas: uma alternativa viável para enfrentar a crise na suinocultura. Disponível em: www.engormix.com/enzimas_uma_alternativa_viavel.html. Acesso em: 20 de agosto de 2008.

HELANDER, I. M.; ALAKOMI, H. L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 3590-3595, 1998.

HERNANDEZ, F.; MADRID, J.; GARCÍA, V.; ORENGO, J.; MEGÍAS, M. D. Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. **Poultry Science**, v. 83, p. 169-174, 2004.

ITURRINO, R. P. S. Microbiota do Trato Intestinal de Aves. In: Curso de Fisiologia da Digestão e Metabolismo dos Nutrientes em Aves, 2004. Jaboticabal. [CD-ROM], Jaboticabal, UNESP, 2004.

JANSSENS, G. P. J.; MILLET, S.; VAN IMMERSEEL, F.; BUCK, J.; HESTA, M. The Impact of prebiotics and Salmonellosis on apparent nutrient digestibility and *Salmonella* Typhimurium var. *Copenhagen* excretion in adult pigeons (*Columba Livia Domestica*), **Poultry Science**, v. 83, p. 1884-1890, 2004.

JUNQUEIRA, O. M.; DUARTE, K. F. Resultados de Pesquisa com aditivos alimentares no Brasil. In: 42ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia, p. 169-182, 2005.

KAMEL, C.A. A novel look at a classic approach of plants extracts. **Feed Mix**, v. 9, n. 6, p. 16-19, 2000.

KRABBE, E. L.; FREITAS, T. E.; PENZ JR, A. M. Efeitos do uso de ácido propiônico e sulfato de cobre na forma de pó e líquido como anti-fúngico em rações de frangos de corte. XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. **Anais...** Juiz de Fora, MG., p. 57-59, 1997.

KURITZA, L. N.; WESTPHAL, P.; SANTIN, E. Probióticos na avicultura. **Ciência Rural**, v. 44, n. 8, p. 1457-1465, 2014.

LAN, Y.; VERSTEGEN, M. W. A.; TAMMINGA, S.; WILLIAMS, B. A. The role of the commensal gut microbial community in broiler chickens. **World's Poultry Science Journal**, v. 61, n. 1, p. 95-104, 2005.

LANGHOUT, P. A visão da indústria e recentes avanços. In: Conferência APINCO 2005, Santos, SP. **Anais...** Conferência APINCO 2005 de Ciência e Tecnologia Avícola, Santos, p. 21-33, 2005.

LE NY, P. Use of organic acids in poultry production. Mode of action and applications. In: I FÓRUM INTERNACIONAL DE AVICULTURA. Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: Ed. Animal World, p. 158-165, 2005.

LEANDRO, N. S. M.; OLIVEIRA, A. S.; ANDRADE, M. A.; STRINGHINI, J. H.; ANDRADE, L.; CHAVES, L. S.; SILVA, T. R. Efeito de probiótico inoculado via ovo sobre o desempenho e colonização do TGI por "*Salmonella enteritidis*" de pintos desafiados. In: 41ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2004. Campo Grande. **Resumos...** Campo Grande: SBZ, 2004.

LEE, H. S.; AHN, Y. J. Growth-inhibiting effects of cinnamomum cassia bark-derived materials on human intestinal bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 8-12, 1998.

LEE, K. W.; EVERTS, H.; KAPPERT, H. J.; WOUTERSE, H.; FREHNER, M. ; BEYNEM, A.C. Essential oils in broiler nutrition. Int. **Journal Poultry Science**, v. 3, n. 12, p. 738-752, 2004.

LEMOES, M. J.; CALIXTO, L. F. L.; TORRES-CORDIDO, K. A. A.; REIS, T. L. Uso de aditivo alimentar em aves de corte e de postura. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, p. 1-7, 2016.

LI, Z.; YI, G.; YIN, J.; SUN, P.; LI, D.; KNIGHT, C. Effects of organic acids on growth performance, gastrointestinal pH, intestinal microbial populations and immune responses of weaned pigs. Asian-Aust. **Journal Animal Science**, v. 21, n. 2, p. 252-261, 2008.

LIMA, G. J. M. M. Uso de aditivos na produção de aves e suínos. In: Simpósio sobre as implicações sócio-econômicas do uso de aditivo na produção animal, 1999, Piracicaba-SP. **Anais...** Piracicaba, p. 51-61, 1999.

LINE, J. E.; BAILEY, J. S.; COX, N. A.; STERN, N. J. TOMPKINS, T. Effect of yeast supplemented feed on *Salmonella* and *Campylobacter* populations in broiler. **Poultry Science**, v. 77, n. 5, p. 405-410, 1998.

LODDI, M. M.; MORAES, V. B. M.; NAKAGHI, L. S. O.; TUCCI, F. M.; BRUNO, L. D. G.; MACARI, M. Efeito de mananoligossacarídeo fosforilado e ácidos orgânicos sobre o desempenho e morfologia intestinal de frangos de corte. **A Revista do Avicultor Moderno**, v. 12, n. 3, p. 10-12, 2006.

LU, J.; IDRIS, U.; HARMON, B.; HOFACRE, C.; MAURER, J. J.; LEE, M. D. Diversity and succession of the intestinal bacteria community of the maturing broiler chicken. **Applied Environment Microbiology**, v. 69, p. 6816-6824, 2003.

LUQUETTI, B. C.; FARIA FILHO, D. E.; FIGUEIREDO, D. F.; CRUZ, C.; AMARAL, C. M. C.; MACARI, M. Uso de prebiótico reduz o escore de lesão no intestino delgado de frangos vacinados contra coccidiose. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, suplemento 7, p. 203, 2005.

MACARI, M.; FURLAN R. L. Alternativas ao uso de quimioterápicos na dieta de aves. In: Conferência APINCO 2005, Santos, SP. **Anais...** Conferência APINCO 2005 de Ciência e Tecnologia Avícola, Santos, p. 21-33, 2005.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas Medicinais**. Viçosa, MG: UFV, 2000. 220p.

MORAIS, B. M.; JACOB, C. M. A. O papel dos probióticos e prebióticos na prática pediátrica. **Jornal de Pediatria**, v. 82, p. 89-197, 2006.

MURAKAMI, A. E.; FERNANDES, J. I. M.; SAKAMOTO, I. M.; SOUZA, L.M.G.; FURLAN, A.C. Efeito da suplementação enzimática no desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais. **Acta Science Animal**, v. 29, p. 165-172, 2007.

NEPOMUCENO, E. S.; ANDREATTI, R. L. F. Probióticos e prebióticos na avicultura. In: II Simpósio de sanidade avícola, Santa Maria, RS. **Anais...** Concórdia, SC: EMBRAPA suínos e aves, v.1, p. 45-55, 2000.

OLIVEIRA, A. S. C. **Inoculação in ovos de acidificante orgânico, prebiótico e probiótico**. 2004. 65 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Sanidade Animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2004.

OLIVEIRA, M. C.; CANCHERINI, L. C.; GRAVENA, R. A.; MARQUES, R. H.; RODRIGUES, E. A.; MORAES, V. M. B. Desempenho de frangos de corte de 1 a 21 dias de idade alimentados com dietas contendo prebióticos e/ou enzimas. In: 42ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2005, Goiânia. **Anais...** Santa Maria: SBZ, 2005.

PATTERSON, J. A.; BURKHOLDER, K. M. Application of prebiotics in poultry production. **Poultry Science**, v. 82, p. 627-631, 2003.

PEDROSO, A. A.; MENTEN, J. F. M.; LAMBAIS, M. R. The structure of bacteria community in the intestines of newly hatched chicks. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 14, n. 2, p. 232-237, 2005.

PEZZOTTI, G.; SERAFIN, A.; LUZZI, I.; MIONI, R.; MILAN, M.; PERIN, R. Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, n. 3, p. 281-287, 2003.

PICKLER, L.; HAYASHI, R. M.; LOURENÇO, M. C.; MIGLINO, L. B.; CARON, L. F.; BEIRÃO, C. B.; SILVA, A. V. F.; SANTIN, E. Avaliação microbiológica, histológica e imunológica de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis e Minnesota e tratados com ácidos orgânicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 1, p. 27-36, 2012.

ROCHA, P. T.; BERSCH, F. X. R.; SUGETA, S. M. Produção de frangos de corte com redução de antibióticos promotores de crescimento na ração. In: Simpósio goiano de avicultura, VI, 2004. Goiânia, **Anais...**, p. 99-109. 2004.

ROCHA, T. M. **Controle de *Salmonella Typhimurium* em frangos de corte utilizando ácidos orgânicos**. 2008. 80f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Sanidade Animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás. Goiânia. 2008.

SAKOMURA, N. K.; KUANA, S.; PINOTTI, S. A.; RUNHO, R. C.; LAURENTZ, A. C.; BANZATTO, D. A.; JUNQUEIRA, O. M. Uso do ácido orgânico (ácido fumárico) nas rações de frango de corte. In: Conferência APINCO. Santos, SP. **Anais...** Santos, p. 55-56, 1994.

SANTANA, E. S.; MENDES, F. R.; BARNABÉ, A. C. S.; OLIVIERA, F. H.; ANDRADE, M. A. Uso de produtos alternativos aos antimicrobianos na avicultura. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n. 13, p. 985-1009, 2011.

SANTOS, J. R. G.; TURNES, C. G. Probióticos na avicultura. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 741-747, 2005.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciência e Farmacologia**, v. 42, p. 1-16, 2006.

SILVA L. P.; NÖRNBERG, J. L. Prebióticos na nutrição de não- ruminantes. **Ciência Rural**, v. 33, p. 983-990, 2003.

SOUZA, A.V.C.; LIMA, C. A. R.; SILVA, A. A.; GREGORUT, F. P. Alternativas ao uso de antibióticos como aditivos promotores de crescimento em Frangos de corte. 2015. Disponível: <http://pecnordestefaec.org.br/2015/wp-content/uploads/2015/06/Alternativas-ao-uso-de-antibi%C3%B3ticos-como-aditivos-promotores-de-crescimento-em-Frangos-de-corte.pdf>. Acesso em 28/03/2017.

TAVECHIO, A. T.; YONAMINE, E. K.; GHILARDI, A. C. R.; DO VALLE, G. R. F.; ARRUDA, A. C.; IRINO, K.; FERNANDES, S. A.; Resistência antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* isolados no estado de São Paulo no período de 1996 a 1999. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 1999. Salvador, Bahia. **Anais...** Salvador: CBM, 1999. p.86, 1999.

TORRES, R. N. S.; DREHER, A.; SIMIONI, T. A. Uso de antibióticos como promotor de crescimento e seus possíveis substitutos ao seu uso em frangos de corte. **Nutritime**, v. 12, n. 6, p. 4348-4358, 2015.

UBABEF. **Relatório Anual 2015/2016**. Brasília, p.10-43, 2016. Disponível em: abpa-br.com.br/files/RelatorioAnual_UBABEF_2015_DIGITAL.pdf. Acesso em 10 de Março de 2016.

VALE, M. M.; MENTEN, J. F. M.; MORAIS, S. C. D.; BRAINER, M. M. A. Desempenho de frangos de cortes alimentados com níveis crescentes dos ácidos orgânicos fórmico e propiônico (70%:30%). In: Conferência APINCO de ciência e tecnologia avícola, 1999. Campinas, SP. **Anais...** Ed. FACTA, 1999. p. 40.

VASCONCELOS, M. C.; SILVA, C. L.; MEZA, M. L. F. G.; BASSI, N. S. S. Trajetória tecnológica da cadeia produtiva do frango de corte no Brasil. **Iniciação Científica CESUMAR**, v. 17, n. 1, p. 15-27, 2015.

XU, Z. R.; HU, C. H.; XIA, M. S.; ZHAN, X. A.; WANG, M. Q. Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microbiota and morphology of male broilers. **Poultry Science**, v. 82, p. 1030-1036, 2003.

20.

EFEITO DO MEDICAMENTO LACTULOSE NA SAÚDE SISTÊMICA DE AVES INOCULADAS EXPERIMENTALMENTE COM *Salmonella* Typhimurium

ELIETE SOUZA SANTANA
MARIA AUXILIADORA ANDRADE
ANA CAROLINE DE SOUZA BARNABÉ

A questão da segurança alimentar constitui um problema atual e relevante, que preocupa as autoridades sanitárias e os consumidores (ANVISA, 2014). Assim, programas de monitoria e estratégias de controle de patógenos que podem ser veiculados pela carne de frango devem ser estabelecidos nos períodos de pré e pós abate de frangos para se obter um produto de qualidade.

Dentre esses patógenos que podem ser veiculados pela carne, estão sorovares do gênero *Salmonella*, as quais compõem o grupo mais complexo das *Enterobacteriaceae*, com 2.610 sorovares descritos (CDC, 2011; GUIBOURDENCHE et al., 2010), considerados importantes em saúde pública por serem uma das principais causas de doenças gastrointestinais em seres humanos em todo o mundo, como resultado principalmente do consumo de carne de aves e ovos contaminados (DESIN et al., 2011), e podem constituir-se, ainda, em barreira sanitária para o comércio de aves e dos seus produtos (SANTOS et al., 2012).

Entre as principais sorovares, destaca-se o Typhimurium, que causa gastroenterites, usualmente benignas e autolimitadas, mas que podem causar surtos e óbitos, principalmente naqueles indivíduos que desenvolvem a forma sistêmica (DAWOUD et al., 2011).

Os antibióticos promotores de crescimento foram utilizados na produção animal desde décadas e conseguiam melhorar os índices produtivos ao controlar a microbiota entérica (SAKITA, 2014). Porém, seu uso foi proibido a partir de janeiro de 2006 na Europa, devido à possibilidade de geração de resistência a patógenos e consequências negativas à saúde, ao bem-estar animal e à segurança alimentar (GAGGIA et al., 2010; YAN et al., 2011).

Porém, a simples retirada dos antibióticos promotores de crescimento da dieta das aves leva à diminuição média no desempenho de 3% a 7%, além do impacto negativo na saúde animal e no aumento da mortalidade. Desse modo, há necessidade de se introduzirem estratégias novas a fim de contornar tais efeitos. A abordagem nutricional amplamente utilizada é o uso de novos aditivos alimentares que são eficazes na melhoria do desempenho das aves, provavelmente pela modulação da microbiota no trato intestinal (LANGHOUT, 2005; LORENZONI, 2010).

Com o banimento dos antimicrobianos promotores de crescimento da dieta das aves, produtos alternativos capazes de manter o equilíbrio da microbiota benéfica sem causar prejuízos à saúde do trato gastrointestinal e sem alterar os parâmetros zootécnicos revelam-se de importância e devem ser pesquisados.

Atualmente, compostos vêm sendo utilizados como alternativa aos promotores de crescimento para manter o equilíbrio da microbiota intestinal, especialmente em animais jovens ou em iminente condição de estresse. Entre eles, está a descoberta da década de 50 de que o leite humano possui compostos que atuam como inibidores de adesão de bactérias patogênicas na superfície epitelial (posteriormente identificado como lactulose) e potencializam o crescimento das populações de *Bifidobacterias* e *Lactobacillus*, aliviando os sintomas de encefalopatia hepática em bebês (NICOLI; VIEIRA, 2000; WAITZBERG, 2009).

A lactulose, dissacarídeo não digestível, tem sido utilizada na medicina humana há mais de 40 anos, principalmente no tratamento de encefalopatia portosistêmica e constipação. A farmacodinâmica da lactulose faz dela uma droga segura e eficaz nessas indicações (SCHUMANN, 2002). Promove ações antitumores (principalmente no cólon

intestinal), antimicrobianas, hipolipidêmica e hipoglicêmica, podendo melhorar também a absorção e o balanço de minerais, além de possuir atividade antiosteoporótica. Outras experiências sugerem que a lactulose pode ser útil em doenças idiopáticas, bem como em doenças inflamatórias infecciosas do intestino. A lactulose é usada no Japão e nos Estados Unidos, em alimentos funcionais e como suplemento nutricional (HOLZ; MIDDLETON, 2005; SANTANA et al., 2012).

A lactulose atua bloqueando os sítios de adesão de bactérias, o que resulta em melhoria na imunidade e permite que os patógenos sejam apresentados às células imunes como antígenos atenuados, podendo assim, substituir o uso de antibióticos não recomendados pelos principais países importadores (AARESTRUP et al., 2010; YAN et al., 2011). Segundo Holz e Middleton (2005), a lactulose constitui-se, ainda, em uma droga segura e eficaz contra tumores (principalmente no cólon intestinal), com ações antimicrobianas, hipolipidêmica e hipoglicêmica.

Em estudos realizados com a lactulose em animais domésticos, o efeito laxativo e a eliminação de *Salmonella* foram demonstrados como os resultados observados em suínos por Kamphues et al. (2003). Quando à lactose, isômero da lactulose, foi adicionada à dieta de perus juntamente com probiótico, estimulou o ganho de peso (TORRES-RODRIGUEZ et al., 2007) e, em perus desafiados com *Salmonella* sp., conseguiu reduzir os níveis de infecção (VICENTE et al., 2007).

Tendo em vista a exigência de mercado consumidor e com o intuito de que essa substância seja recomendada como aditivo na alimentação animal, a presente pesquisa foi realizada, com o objetivo de avaliar os efeitos sistêmicos da lactulose em frangos de corte, inoculados experimentalmente, via ingluvío com *Salmonella* Typhimurium.

Material e métodos

Local e manejo experimental

As aves foram alojadas no Núcleo Experimental de Doenças de Aves da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, que possui isolamentos apropriados para inoculações experimentais com patógenos

O protocolo experimental utilizado nesse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFG, sob o nº 103/09, e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

Pintos da linhagem Cobb, machos, de um dia de idade, foram divididos em seis tratamentos, com sete repetições cada, alojados em grupos de 15 aves por unidade experimental, num total de 42 unidades experimentais, conforme o delineamento a seguir:

Tratamento 1: constituiu o grupo controle que não recebeu o inóculo microbiano nem a lactulose (Placebo);

Tratamento 2: constituiu o grupo de aves inoculadas diretamente no ingluvío no primeiro dia de vida, com 0,5 mL de solução salina tamponada a 0,85%, contendo aproximadamente $5,0 \times 10^2$ UFC/0,5 mL de *Salmonella* Typhimurium (ST);

Tratamento 3: constituiu o grupo que recebeu água adicionada com lactulose, na dosagem de 0,023 mL/g de peso vivo do primeiro aos 14 dias de vida de alojamento (L);

Tratamento 4: constituiu o grupo inoculado diretamente no ingluvío no primeiro dia de vida, com 0,5 mL de solução salina tamponada a 0,85%, contendo aproximadamente $5,0 \times 10^2$ UFC/0,5 mL de *Salmonella* Typhimurium e, 48 horas depois, a lactulose foi fornecida na água de bebida até 14 dias de vida da ave, na mesma quantidade do controle [(ST(1^o) +L(48 h))];

Tratamento 5: constituiu o grupo de aves que recebeu a água com lactulose desde o primeiro dia de vida na mesma dose do controle e, com 48 horas foram inoculadas diretamente no ingluvío com 0,5 mL de solução salina tamponada a 0,85%, contendo aproximadamente $5,0 \times 10^2$ UFC/0,5 mL de *Salmonella* Typhimurium [(L(1^o) +ST(48 h))];

Tratamento 6: constituiu o grupo inoculado no ingluvío com 0,5 mL de solução salina tamponada a 0,85%, contendo aproximadamente $5,0 \times 10^2$ UFC/0,5 mL de *Salmonella* Typhimurium e que recebeu a lactulose na água, em dose de 0,023 mL/g de peso vivo do primeiro até aos 14 dias [(ST(1^o) +L(1^o)).

As aves desafiadas e não desafiadas foram alojadas separadamente, mantendo-se a mesma ambiência, em baterias com cinco andares de aço galvanizado, equipadas com comedouros e bebedouros tipos lineares e bandejas para retirada de excretas. As baterias foram aquecidas com uma lâmpada incandescente de 60 W por andar até os 21 dias de idade.

Preparação do inóculo

O inóculo foi preparado com *S. Typhimurium* isolada de amostras oriundas de frangos de corte cedida por Rezende (2002). A concentração do inóculo foi de $5,0 \times 10^2$ UFC/0,5 mL, conforme descrito por Rezende (2002).

Para obtenção do inóculo, a cepa foi repicada em ágar verde brilhante e incubada a 37 °C, por 18-20 h. Em seguida, as células foram suspensas em solução salina tamponada a 0,85%, mantidas a 4 °C e concentração de $5,0 \times 10^2$ UFC/mL ajustada com auxílio da escala de Mac Farland (FERNÁNDEZ et al., 2001). A concentração foi confirmada pelo plaqueamento das diluições decimais seriadas em ágar verde brilhante, com posterior incubação a 37 °C e quantificação das UFC de *Salmonella*.

Recuperação de *Salmonella* Typhimurium

Nos dias sete, 14, 21 e 28 de idade, uma ave por parcela foi sacrificada e necropsiada. De cada animal, foi colhido aproximadamente 1g de cada órgão, sendo coletados o baço, fígado, coração, suabe de ingluvío e conteúdo cecal de aves. Para os tratamentos 1, 2 e 3, foram necropsiados cinco animais por idade avaliada, enquanto, para os demais tratamentos, 4, 5 e 6, foram necropsiados sete animais. As amostras foram homogeneizadas e transferidas para tubos contendo caldos de enriquecimento e processados de acordo com Brasil (2003) e com o Georgia Poultry Laboratory (1997).

Exames biométricos do fígado

Para determinação do índice biométrico do fígado, uma ave por parcela, após jejum de seis horas, foi pesada e sacrificada aos 7, 14, 21 e

28 dias de idade. O peso do fígado foi anotado para cálculo da relação peso de órgão/peso da ave.

Exames histopatológicos

Fragmentos de fígados foram coletados e processados de acordo com a metodologia convencional de Luna (1968), uma vez fixadas por 24h em solução de formalina neutra tamponada a 10%, os fragmentos foram recortados, acondicionados em cassetes e identificados. Em seguida, foram lavados em água corrente para retirada de excessos de pigmentos de formol e posteriormente desidratados em álcool etílico em série crescente, desde 70% até álcool absoluto.

Posteriormente, procedeu-se à clarificação com xilol e impregnação em parafina histológica, com ponto de fusão a 56 °C. Os fragmentos de 5,0 mm foram incluídos em blocos de parafinas histológicas, seccionados a 5,0 µm em micrótomo rotativo, marca American-Optical, modelo Spencer-820, utilizando navalhas descartáveis, laminados, e coradas pelo método de Hematoxilina – Eosina (HE), sendo as lâminas lidas em microscópio óptico de campo claro, marca Carl Zeiss, modelo JENAVAL.

Análise estatística

Os dados quantitativos de biometria de fígado e bioquímica sérica foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas, quando necessário, pelo teste de Tukey a 5%, sendo utilizado o procedimento *general linear model* (GLM) do pacote estatístico SAS (2009).

Resultados e discussão

Os resultados das análises bacteriológicas dos conteúdos de ingluvívulo, ceco, baço, *pool* de fígado mais coração estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Frequência de isolamento de *Salmonella Typhimurium* (ST) de conteúdo de inglúvio, ceco, baço, fígado e coração de frangos de corte que receberam lactulose (L) na água aos 7, 14, 21 e 28 dias de idade

Tratamentos	Inglúvio	Ceco	Fíg+Cor	Baço	Total
7 dias de idade					
Placebo	0/5(0%)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/20(0%)
Controle Lactulose (L)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/20(0%)
Controle positivo (ST)	4/5(80%)	5/5(100%)	4/5(80%)	4/5(80%)	17/20(85%)
ST (1º d) + L (1º d)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/28(0%)
ST (1º d) + L (48 h)	0/7(0%)	2/7(28,5%)	0/7(0%)	0/7(0%)	2/28(7,1%)
L (1º d) + ST (48 h)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/28(0%)
Total	4/26(15,4%)	7/26(26,9%)	4/26(15,4%)	4/26(15,4%)	19/144(0,13%)
14 dias de idade					
Placebo	0/5(0%)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/20(0%)
Controle Lactulose (L)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/20(0%)
Controle positivo (ST)	0/5(0%)	5/5(100%)	4/5(80%)	5/5(100%)	14/20(70%)
ST (1º d) + L (1º d)	0/7(0%)	0/7(0%)	2/7(28,5%)	2/7(28,5%)	4/28(14,2%)
ST (1º d) + L (48 h)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/28(0%)
L (1º d) + ST (48 h)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/28(0%)

Tratamentos	Inglúvio	Ceco	Fíg+Cor	Baço	Total
Total	0/26(0%)	5/26(19,2%)	6/26(23,0%)	7/26(26,9%)	18/144(0,12%)
21 dias de idade					
Placebo	0/5(0%)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/20(0%)
Controle Lactulose (L)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/20(0%)
Controle positivo (ST)	1/5(20%)	3/5(60%)	2/5(40%)	4/5(80%)	10/20(50%)
ST (1º d) + L (1º d)	0/7(0%)	2/7(28,5%)	1/7(14,2%)	2/7(28,5%)	5/28(17,8%)
ST (1º d) + L (48 h)	2/7(28,5%)	0/7(0%)	0/7(0%)	1/7(14,2%)	3/28(10,7%)
L (1º d) + ST (48 h)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/28(0%)
Total	3/26(11,5%)	6/26(23,0%)	3/26(11,5%)	7/26(26,9%)	19/144(0,13%)
28 dias de idade					
Placebo	0/5(0%)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/20(0%)
Controle Lactulose (L)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/20(0%)
Controle positivo (ST)	1/5(20%)	2/5(40%)	3/5(60%)	2/5(40%)	8/20(40%)
ST (1º d) + L (1º d)	1/7(14,2%)	2/7(28,5%)	0/7(0%)	0/7(0%)	3/28(10,7%)
ST (1º d) + L (48 h)	0/7(0%)	0/7(0%)	1/7(14,2%)	1/7(14,2%)	2/28(7,1%)
L (1º d) + ST (48 h)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/28(0%)
Total	2/26(7,6%)	4/26(15,4%)	4/26(15,4%)	3/26(11,5%)	13/144(0,09%)

Observa-se, na Tabela 1, que ocorreu um declínio da frequência relativa à recuperação da bactéria com o avançar da idade no grupo controle positivo (ST) de 85,0% (17/20), aos sete dias; 70,0% (14/20) aos 14 dias; 50,0% (10/20) aos 21 dias e 40% (8/20) aos 28 dias de idade, das amostras analisadas. Isso sugere que os mecanismos naturais do organismo tentaram eliminar a *Salmonella*. A suscetibilidade das aves à colonização intestinal por *Salmonella* sp. é maior durante os primeiros dias de vida, sendo posteriormente reduzida à medida que há o crescimento da microbiota intestinal normal. Segundo Beal et al. (2014), o mecanismo de resistência idade-dependente, imunidade idade-dependente está correlacionado ao desenvolvimento natural do sistema imune com a idade e do estabelecimento da microbiota intestinal.

Outros fatores que podem ainda estar envolvidos na patogênese da salmonelose aviária são determinados pela habilidade da bactéria em colonizar o trato gastrointestinal, que parece estar relacionada com a imunidade inata da espécie hospedeira e com a diversidade de genes de virulência codificados pelo patógeno, pelas condições ambientais, grau de exposição, presença de infecções concomitantes (FLORES et al., 2008) e, ainda, pela via de inoculação, o tipo de sorovar e a dose do inóculo (MARCQ et al., 2011; SANTANA et al., 2012).

Nas aves inoculadas com *Salmonella* Typhimurium no primeiro dia de vida e que receberam lactulose simultaneamente [ST (1º d) + L (1º d)], o reisolamento da *Salmonella* ocorreu a partir de 14 e, até 28 dias, o patógeno se manteve num percentual de 10,7 a 17,8%. Esses dados indicam que a lactulose impediu a colonização da bactéria somente na primeira semana. Após esse período sua ação foi reduzida, pois ocorreu a reinfecção dos animais, provavelmente, pela via orofecal, que pode ser atribuída ao protocolo experimental, considerando que os animais contaminados foram alojados no mesmo ambiente e que a dose da lactulose foi ajustada para promover efeito discretamente laxante com o objetivo de impedir a colonização da bactéria.

No grupo em que inoculou a *Salmonella* Typhimurium e administrou a lactulose 48 horas depois [ST (1º d) + L (48 h)], as taxas de recuperação bacteriana apresentaram uma frequência de 10,7% (3/28) e

7,1% (2/28) nos dias 21 e 28 do experimento, respectivamente (Tabela 1). Nota-se que o produto usado atuou, enquanto fornecido, e teve uma ação mais discreta até 28 dias de tratamento, já que se registrou uma baixa frequência de recuperação bacteriana,

Observa-se (Tabela 1), que houve melhor proteção contra a *Salmonella* nos pintos que receberam a lactulose 48 horas antes de serem desafiados. Esses resultados comprovam que a lactulose apresentou efeitos preventivos, promovendo um trânsito mais rápido do conteúdo, o que impediu a aderência do patógeno à mucosa epitelial e, consequentemente, a sua invasão e colonização.

Os grupos que receberam a lactulose e o inóculo bacteriano 48 horas depois [L (1º d) + ST (48 h)] apresentaram uma frequência de positividade maior que o grupo que recebeu inicialmente o inóculo bacteriano e a lactulose 48 horas depois [ST (1º d) + L (48 h)]. A menor presença de *Salmonella* nos tratamentos em que utilizou a lactulose preventivamente pode ser explicada pelos princípios dos compostos com ações prebióticas, os quais se ligam a sítios receptores dos macrófagos através do reconhecimento de determinados açúcares presentes nas glicoproteínas da superfície epitelial das células, desencadeando uma reação em cascata que resulta na ativação dos macrófagos e liberação de citocinas, ativando a resposta imune adquirida.

Outro aspecto que foi evidenciado neste estudo foi a capacidade de invasão da *Salmonella*. Verificou-se que ocorreu uma diminuição na recuperação da bactéria nos *pools* de fígado e coração e nos baços no decorrer do experimento (Tabela 1). Já nas aves que receberam o inóculo no inglúvio e a lactulose na água no primeiro dia de vida [ST (1º d) + L (1º d)], observaram-se 0/28 (0%), 4/28 (14,2%); 3/28 (10,7%) e 3/28 (10,7%) aos sete, 14, 21 e 28 dias, respectivamente. Esses achados indicam que a lactulose não apresentou efeito sistêmico, pois, após a invasão da bactéria, ela permaneceu no organismo na mesma frequência até 28 dias da fase experimental.

Diariamente, duas vezes ao dia, as aves foram examinadas e os sinais clínicos observados consistiram, basicamente, na presença de excretas mais liquefeitas que, em determinadas situações, causaram

tamponamento de cloaca. Esses dados confirmam parcialmente as afirmações de Barrow (2010) de que não existe clareza na ocorrência de enterite em aves infectadas pela *Salmonella*, mas o acúmulo de excretas na região pericloacal caracteriza certa disfunção intestinal, quando a inoculação ocorre por via digestiva.

Tabela 2 – Frequência da mortalidade de frangos de corte, inoculados com *Salmonella* Typhimurium e medicadas com lactulose no período de 1-28 dias de vida

Tratamentos	Aves/Tratamento	Nº de óbitos	Índice de Mortalidade
Placebo	105	2	1,9
Controle Lactulose (L)	105	2	1,9
Controle positivo (ST)	105	3	2,85
ST (1º d) + L (1º d)	105	1	0,95
ST (1º d) + L (48 h)	105	1	0,95
L (1º d) + ST (48 h)	105	1	0,95
Total	630	10(10/630)	9,50%(10/630)

*Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de qui-quadrado ($P < 0,05$)

Acrescenta-se ainda que durante o período experimental, o índice de mortalidade total foi de 9/630 (9,50%), sendo que o grupo inoculado com *S. Typhimurium* apresentou 3/105 (2,85%), não mostrando diferenças significativas entre os demais tratamentos. Essas observações evidenciam que *Salmonella* Typhimurium e a lactulose nas doses administradas não determinaram mortalidade e que os óbitos ocorreram de forma aleatória e natural dentro da população. Por outro lado, o estado de portador assintomático manteve-se nos tratamentos (ST), ST (1º d) + L (1º d) ST (1º d) + L (48 h) até os 28 dias.

Paralelamente, coletaram-se os fígados para análises biométricas, os quais foram pesados com 7, 14, 21 e 28 dias de idade e tiveram seus pesos relativos calculados e anotados (Tabela 3).

Tabela 3 – Peso relativo de fígados aos 7, 14, 21 e 28 dias de idade de frango de corte, recebendo lactulose e/ou *Salmonella* Typhimurium

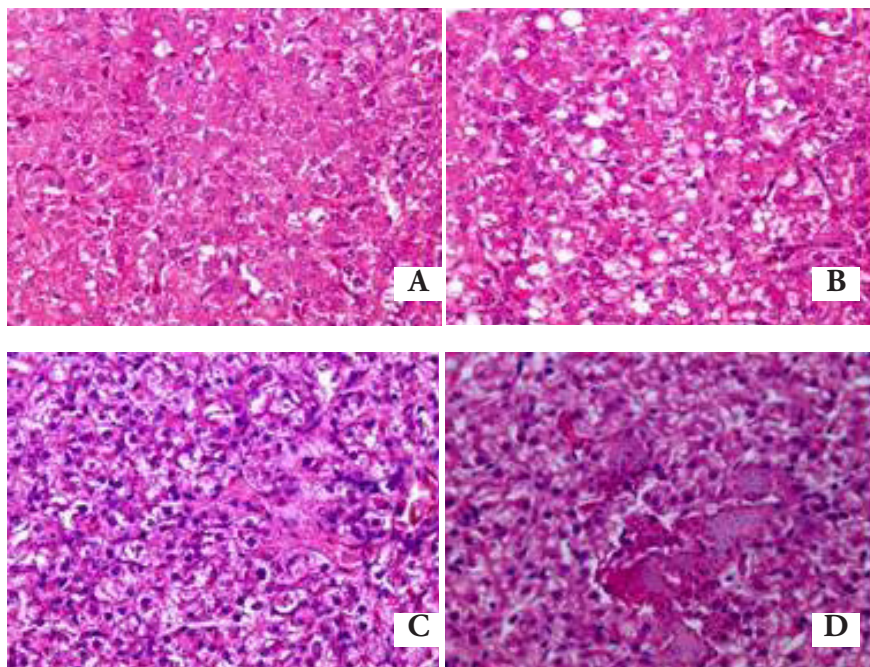
Tratamentos	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
Placebo	3,27C	2,70C	2,22B	2,00B
Controle Lactulose (L)	3,61BC	3,54A	2,16B	1,96B
Controle positivo (ST)	4,68AB	2,83BC	3,10AB	2,60AB
ST (1º d) + L (1º d)	4,82AB	3,62A	3,16AB	3,11A
ST (1º d) + L (48 h)	5,41 ^a	2,83BC	3,67A	3,07A
L (1º d) + ST (48 h)	4,60ABC	3,35AB	3,78A	2,91A
C.V. (%)	15,1938	10,8373	16,872	16,8876
P	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

A,B – médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,005)

Os maiores pesos relativos do fígado foram registrados nos grupos que receberam a inoculação bacteriana, com ou sem a lactulose. Esse aumento do peso pode ser resultante do processo infeccioso desencadeado pela *Salmonella* e mesmo pela ação da lactulose, pois o fígado tem a função metabólica extremamente importante de regular a concentração no sangue de metabólitos, particularmente carboidratos e aminoácidos, além de ser fisiologicamente responsável por neutralizar diferentes substâncias tóxicas, inclusive as produzidas por bactérias.

Dos mesmos fígados, aos 14 e 28 dias de vida, coletaram-se fragmentos que foram processados de acordo com Luna (1968), e submetidos às avaliações histopatológicas.

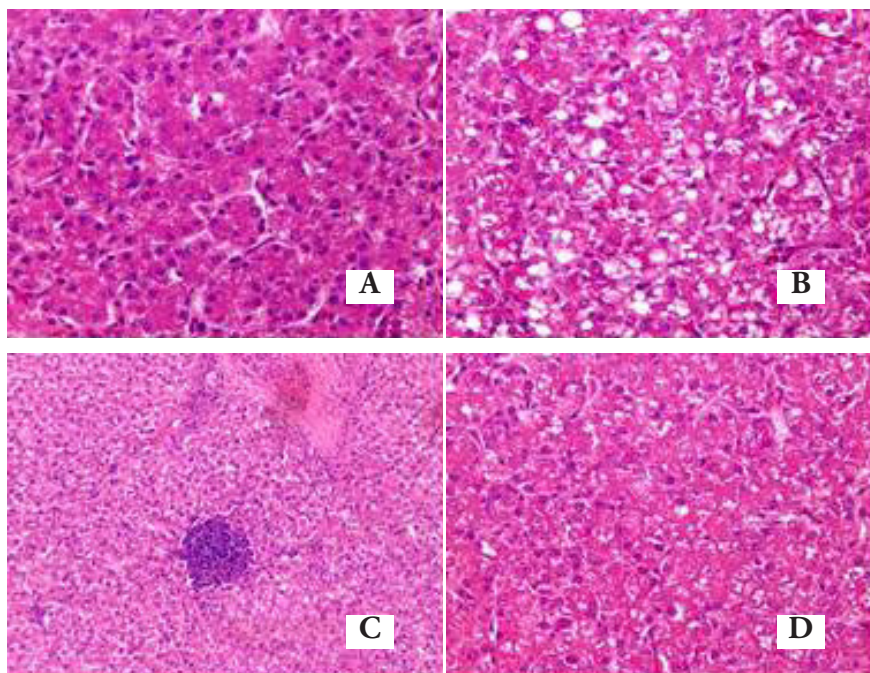
Figura 1 – A: Necrose hepatocitária difusa; B: Degeneração macrovascular hepatocitária; C: Necrose massiva de hepatócitos; D: *Granuloma* por *Salmonella*



Fonte: Próprios autores (2017).

Nas avaliações histopatológicas do fígado aos 14 dias, do grupo inoculado experimentalmente, somente com *Salmonella* Typhimurium (ST), observaram-se hepatócitos intumescidos em 60% (3/5), necrose difusa dos hepatócitos em 20% (1/5) e moderada degeneração microvascular com focos de necrose em 40% (2/5); aos 28 dias de idade, observou-se moderada e difusa degeneração hialina de hepatócitos em 20% (1/5) e necrose difusa de hepatócitos em 80% (4/5). Essas alterações refletem, provavelmente, os efeitos da bactéria. Entretanto, foram diferentes dos resultados obtidos por Barcelos et al. (2006), que, ao analisarem fígados infectados com esse patógeno, não observaram lesões microscópicas indicativas de infecção por *Salmonella* sp.

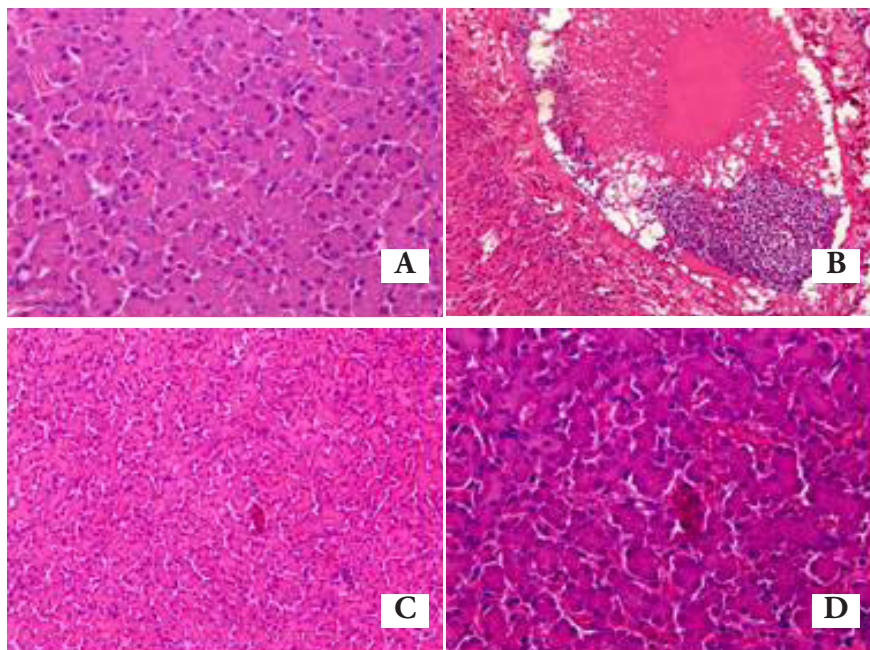
Figura 2 – A: Dilatação dos sinusoides; B: Degeneração macrovacuolar hepatocitária; C: Infiltrado linfocitário; D: Necrose dos hepatócitos



Fonte: Próprios autores (2017).

Os grupos inoculados com *Salmonella* Typhimurium e lactulose, independentes do momento de inoculação e fornecimento da lactulose, apresentaram, aos 14 dias de idade, alterações histopatológicas semelhantes. Os achados incluíram discreta dilatação de sinusoides em 33,3% (5/15), necrose difusa dos hepatócitos em 53,3% (8/15) e degeneração microvacuolar hepatocitária em 40% (6/15); aos 28 dias, identificaram-se as mesmas alterações dos 14 dias, incluindo múltiplos focos de infiltrados linfocitários em 100% (15/15) e necrose difusa de hepatócitos em 66,6% (10/15). Esses resultados indicam a ocorrência de uma reação inflamatória, com infiltrados linfocitários e necrose, as quais se assemelham a outras infecções bacterianas agudas. Esses achados foram parcialmente semelhantes aos observados por Hoerr (1996), que relatou que a infecção por *Salmonella* no fígado manifesta-se com zonas de necroses multifocais dos hepatócitos acompanhadas por infiltração linfocítica.

Figura 3 – A: Degeneração microvacuolar dos hepatócitos; B: presença de êmbolo linfocitário na artéria hepática; C; D: Evidenciação de sinusóides (20X e 40X)



Fonte: Próprios autores (2017).

Na análise histopatológica do fígado que recebeu apenas a lactulose (L), identificou-se, em 40% (2/5) das amostras, discreta dilatação de sinusóides e degeneração microvacuolar hepatocitária. A dilatação dos sinusóides hepáticos, observada em 40% (2/5) das amostras, foi um achado comum às amostras de todos os tratamentos que receberam a lactulose com ou sem o patógeno, mesmo após a sua retirada. Por isso, pode-se inferir que a lactulose promoveu discreta alteração nos sinusóides hepáticos, que são compatíveis com um quadro de discreta congestão (AGUIAR et al., 2011) sem uma indicação patológica específica. Segundo Randall e Reece (1996), as mais importantes alterações celulares de metabólicos tóxicos ocorrem no fígado, daí ter sido o órgão de eleição para realizar a histopatologia.

Conclusão

A lactulose, enquanto fornecida na dieta, é capaz de impedir a infecção sistêmica por *Salmonella* Typhimurium, mostrando melhor efeito se administrada preventivamente, embora determine discreta lesão hepática.

Referências

AARESTRUP, F. M.; JENSEN, V. F.; EMBORG, H.; JACOBSEN, E.; WEGENER, H. C. Changes in the use of antimicrobials and the effects on productivity of swine farms in Denmark. **American Journal of Veterinary Research**, v. 71, n. 7, p. 726-733, 2010.

AGUIAR, L. R. F.; NASSIF, P. A. N.; RIBAS, C. A. P. M.; CZECZKO, N. G.; RIBAS, M. M.; MARINHO JÚNIOR, C. H.; WENDLER, E. Regeneração do fígado após hepatectomia parcial em ratos submetidos à hipertensão portal pós-hepática. ABCD, **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 24, n. 2, p. 144-151, 2011.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de alimentos e vigilância sanitária**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/guia_alimentos_vigilancia_sanitaria.pdf. Acessado em 01/05/2014.

BARCELOS, A. S.; FLÔRES, M. L.; KOMMERS, G. D.; NASCIMENTO, V. P.; SEGABINAZI, S. D. Macroscopia, histopatologia e bacteriologia de fígados de frangos (*Gallus gallus*) condenados no abate. **Ciência Rural**, v. 36, n. 2, p. 561-572, 2006.

BARROW, P. A. The paratyphoid salmonellae. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 19, n. 2, p. 351-375, 2010.

BEAL, R. K.; WIGLEY, P.; POWERS, C.; HULME, S. D.; BARROW, P. A.; SMITH, A. L. Age at primary infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the chicken influences persistence of infection and subsequent immunity to re-challenge. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 100, p. 151-164, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº. 70**. Programa de Redução de Patógenos (PRP), v. 1, 2003, 168 p.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. **Salmonella serotype Enteritidis**, general information, MMWR, United States, 2011. Disponível em: www.cdc.gov. Acesso em: 07 de abril de 2014.

DAWOUD, T. M.; HERERRA, P.; HANNING, I.; KWON, Y. M.; RICKE, S. C. In vitro invasion of laying hen ovarian follicles by *Salmonella* Enteritidis strains. **Poultry Science**, v. 90, p. 1134-1137, 2011.

DESIN, T. S.; WISNER, A. L. S.; LAM, P. S.; BERBEROV, E.; MICKAEL, C. S.; POTTER, A. A.; KOSTER, W. Evaluation of *Salmonella* entérica serovar Enteritidis pathogenicity island-1 proteins as vaccine candidates against *S. Enteritidis* challenge in chickens. **Veterinary Microbiology**, v. 148, p. 298-307, 2011.

FERNÁNDEZ, A.; LARA, C.; LOSTE, A.; CALVO, S.; MARCA, M. C. Control of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 experimental infection by fosfomycin in newly hatched chicks. **Comparative Immunology, Microbiology & Infections Disease**, v. 24, p. 207-216, 2001.

FLORES, G. R.; CASAS, F. C.; LÓPEZ, J. A. Q.; PELÁEZ, C. C.; BRAVO, O. U. Patogenia de *Salmonella* Enteritidis FT 13a y *Salmonella* Enteritidis biovar Issatschenko en pollos de engorda. **Veterinária México**, v. 39, n. 2, p. 145-160, 2008.

FUDGE, A.M. Avian liver and gastrointestinal testing. In: FUDGE, A.M. **Laboratory medicine – avian and exotic pets**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000. p. 35-55.

GAGGIA, F.; MATTARELLI, P. Y.; BIAVATI, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, p. 15-28, 2010.

GEORGIA POULTRY LABORATORY. **Monitoring and detection of *Salmonella* in poultry and poultry environment** *Salmonella* Oakwood: Georgia Poultry Laboratory, 1997. 293p.

GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P. I.; BOCKEMUHL, J.; GRIMONT, P. A.; WEILL, F. X. Supplement 2003–2007 to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, n. 47, v. 161, p. 26-29, 2010.

HOLZ, P. H.; MIDDLETON, D. R. Prospective Study. **Medical Surgery**, v. 15, n. 1, p. 4-6, 2005.

KAMPHUES, J.; TABELING, R.; STUKE, O. Possible interesting dietetic effects of lactulose as a feed additive in pig feed. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 110, n. 9, p. 365-368, 2003.

KANEKO, J. J. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 4. ed. San Diego: Academic, 1989. 932p.

LANGHOUT, P. Alternativas ao uso de quimioterápicos na dieta de aves: A visão da indústria e recentes avanços. In: CONFERÊNCIA APINCO 2005 DE CIÊNCIA

E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2005, Santos, 2005. **Anais...**, Santos: FACTA. p. 21, 2005.

LORENZONI, G. Salmonellosis. In: LORENZONI, G. **Poultry diseases influenced by gastrointestinal health**. Thrumpton: Ed. Nottingham, seção IV, 2010. p.73-78.

LUMEIJ, J. T.; WESTERHOF, Blood chemistry for the diagnosis of hepatobiliary disease in birds. A review. **Veterinary Questions and Answers**, v. 9, p. 255-261, 1997.

LUNA, L. G. **Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3.ed. New York: McGraw-Hill, 1968, 258p.

MARCQ, C.; COX, E.; SZALO, I. M.; THÉWIS, A.; BECKERS, Y. *Salmonella* Typhimurium oral challenge model in mature broilers: Bacteriological, immunological, and growth performance aspects. **Poultry Science**, n. 90, p. 59-67, 2011.

NICOLI, J. R.; VIEIRA, L. Q. Probióticos, prebióticos e simbióticos moduladores do ecossistema digestivo. **Ciência Hoje**, v. 28, n. 63, p. 34-38, 2000.

RANDALL, C. J.; REECE, R. L. **Color atlas of avian histopathology**. Turin: Mosby-Wolfe, 1996. 232p.

REZENDE, C. S. M. **Ocorrência de *Salmonella* em lotes de frangos de corte de agroindústrias goianas: identificação bacteriológica e perfil de sensibilidade a antimicrobianos**. 2002. 73 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Sanidade Animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2002.

SAKITA, G. Z. **Efeito de mananoligossacarídeos sobre parâmetros zootécnicos e histomorfométricos duodenais de ratos wistar**. 2014. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade do Oeste Paulista. Presidente Prudente, 2014.

SANTANA, E. S.; ANDRADE, M. A.; ROCHA, T. M.; STRINGHINI, J. H.; CAFÉ, M. B.; PORTO, R. N. G.; BARNABÉ, A. C. S.; ALCÂNTARA, J. B. Influência da lactulose no desempenho zootécnico e na taxa de reisolamento fecal em frangos de corte experimentalmente inoculados com *Salmonella* Typhimurium. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 8, p. 1884-1889, 2012.

SANTOS, I. I.; CORÇÃO, G.; KESSLER, A. M. DE.; LARANJEIRA, V. S. DOS.; LIMA, M. S. Microbiota ileal de frangos de corte submetidos a diferentes dietas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 3, p. 643-647, 2012.

SAS Institute. SAS (Statistical Analysis System). **User's Guide: Statistics**. Cary, NC: SAS Institute INC, 2009.

SCHUMANN, C. Clinical Medical and technological propertie of lactulose. An Update. **European Journal of Nutrition**, v. 41, Suppl. 1, p. 117-125, 2002.

TORRES-RODRIGUEZ, S. E.; HIGGINS, J. L. S.; WOLFENDEN, A. D.; GAONA-RAMIREZ, G.; BARTON, J. T.; TELLEZ, G.; DONOGHUE, A. M.; HARGIS, B. M. Efeito da Lactose como um Prebiótico no peso corporal de perus sob condições comerciais. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 16, p. 635-641, 2007.

VICENTE, J.; WOLFENDEN, A.; TORRES-RODRIGUEZ, A.; HIGGINS, S.; TELLEZ, G.; HARGIS, B. Effect of a *Lactobacillus* Species-Based Probiotic and Dietary Lactose Prebiotic on Turkey Poult Performance With or Without *Salmonella* Enteritidis Challenge. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 16, p. 361-364, 2007.

WAITZBERG, D. L. **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, v. 2, 2009. 2489 p.

YAN, G. L.; GUO, Y. M.; YUAN, J. M.; LIU, D.; ZHANG, B. K. Sodium alginate oligosaccharides from brown algae inhibit *Salmonella* Enteritidis colonization in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 90, p. 1441-1448, 2011.

SOBRE OS AUTORES

ADRIANO JABUR BITTAR – Fisioterapeuta, mestre em Artes Cênicas pela Universidade Federal da Bahia (UFBA) e doutor em Arte pela Universidade de Brasília (UnB). Coordenador da Pós-graduação em Pilates da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO). Coordenador da Rede Brasil-Reino Unido em Medicina e Ciência da Dança. Docente do curso de graduação em Fisioterapia da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Câmpus ESEFFEGO, Goiânia-GO. E-mail: adriano@studioabittar.com

ALESSANDRA RIBEIRO SARTOR LIMA – Farmacêutica Industrial, mestre em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde pelo Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). E-mail: sartorlima@terra.com.br

ANA CAROLINE DE SOUZA BARNABÉ – Médica Veterinária, mestre em Ciência Animal pela Universidade Federal de Goiás (UFG). Doutoranda do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). E-mail: carolvillela@hotmail.com

ANA PAULA BERNARDES ALMEIDA – Farmacêutica, mestranda do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás (UFG). E-mail: anaalmeida.b@outlook.com

ANTÔNIO CARLOS SEVERO MENEZES – Químico Industrial, mestre em Química Orgânica pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), doutor e pós-doutor em Química pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Docente dos cursos de graduação em Química Industrial e Química Licenciatura da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas, Anápolis-GO. Docente dos Programas de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) e Ciências Moleculares (PPGCM) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). E-mail: antonio.menezes@ueg.br

BRUCE SOARES CARDOSO – Farmacêutico, mestre em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde pelo Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). Doutorando do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Patologia Molecular da Universidade de Brasília. E-mail: brucecardoso@yahoo.com.br

CÁTIA LIRA DO AMARAL – Farmacêutica bioquímica, mestre em Toxicologia, doutora em Ciências pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP) e pós-doutora pelo Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Pesquisadora visitante na Universidad de Navarra (Espanha). Docente do curso de graduação em Farmácia da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas Henrique Santillo, Anápolis-GO. E-mail: catia.amaral@ueg.br

CIBELLE KAYENNE MARTINS ROBERTO FORMIGA – Fisioterapeuta, mestre em Educação Especial pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), doutora em Ciências Médicas pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP), pós-doutora pela FMRP-USP e pela Vrije University Amsterdam (Holanda). Docente do curso de graduação em Fisioterapia da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Câmpus ESEFFEGO, Goiânia-GO. Docente do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). E-mail: cibelle.formiga@ueg.br

CLAUDIA CRISTINA GARCIA MARTIN-DIDONET – Graduada em Ciências Biológicas, mestre em Biologia Vegetal pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), doutora e pós-doutora em Ciências (Bioquímica) pela Universidade Federal do Paraná (UFPR). Docente dos cursos de graduação em Farmácia e Química Licenciatura da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas, Anápolis-GO. Docente do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). E-mail: ccdidonet@gmail.com

DANIELA SACRAMENTO ZANINI – Psicóloga, doutora e pós-doutora em Psicologia Clínica e da Saúde pela Universidad de Barcelona (Espanha). Docente no curso de graduação e no Programa de Pós-Graduação em Psicologia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO). E-mail: dazanini@yahoo.com

DEBBORAH GONÇALVES BEZERRA – Farmacêutica, mestre em Recursos Naturais do Cerrado pelo Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Recursos Naturais do Cerrado (RENAC) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). Doutoranda do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Recursos Naturais do Cerrado (RENAC) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). E-mail: debborah.b@gmail.com

EDEMILSON CARDOSO DA CONCEIÇÃO – Farmacêutico, mestre e doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade de São Paulo (USP), pós-doutor pela mesma instituição. Docente da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (UFG). Docente nos Programas de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da UFG (Goiás) e da UFPA (Pará) e Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica da rede: UFG (Goiás), UFPA (Pará), UFAM (Amazonas) e UNIFAP (Amapá). E-mail: ecardosoufg@gmail.com

EDUARDO LOPES DE PAULA – Químico Industrial, mestre em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde pelo Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). E-mail: edulopiz@hotmail.com

ELIANA MARTINS LIMA – Farmacêutica Bioquímica, mestre e doutora em Fármacos e Medicamentos pela Universidade de São Paulo (USP). Pós-doutora na área de Sistemas Poliméricos para *Drug Delivery* na University of Pennsylvania e estágio Sênior em *Nanotechnology Based Cancer Therapeutics* no Massachusetts Institute of Technology – MIT (Cambridge-USA). Docente da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (UFG). Docente dos Programas de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da UFG e de Nanotecnologia Farmacêutica (Associação UFG, UFRGS, USP-RP, UNESP-Araraquara, UFPE, UFSC, UFOP, UFRN, UFSM). E-mail: emlima@ufg.br

ELIETE SOUZA SANTANA – Médica Veterinária, mestre e doutora em Ciência Animal pela Universidade Federal de Goiás (UFG), com doutorado *sandwich* pela Universidade de Murcia (Espanha) e pós-doutora pela UFG. Docente do curso de graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Goiás, Câmpus Palmeiras de Goiás, Palmeiras de Goiás–GO. Docente dos Programas de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) e Mestrado Profissional em Desenvolvimento Rural Sustentável da Universidade Estadual de Goiás (UEG). Coordenadora do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS). E-mail: elietessouza@yahoo.com.br

ENDERSON PETRÔNIO DE BRITO FERREIRA – Agrônomo, mestre em Agronomia e doutor em Fitotecnia pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. É pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Arroz e Feijão e orientador de Mestrado e Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Goiás. E-mail: endersonferreira@gmail.com

ERICK DE OLIVEIRA LEMES – Farmacêutico, mestrando do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). E-mail: erickprojetocientifico@outlook.com

GILBERTO LUCIO BENEDITO DE AQUINO – Farmacêutico, mestre e doutor em Química pela Universidade de São Paulo. Pós-doutor pela Universidade de Coimbra (UC) (Portugal). Docente do

curso de graduação em Farmácia da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas Henrique Santillo. Anápolis-GO. Docente dos Programas de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) e Ciências Moleculares (PPGCM) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). E-mail: gilberto.benedito@ueg.br

GIULIANA MUNIZ VILA VERDE – Farmacêutica, mestre em Biologia e doutora em Biologia Molecular pela Universidade Federal de Goiás. Pós-doutora pela Universidade Federal de Goiás (UFG). Docente do curso de graduação em Farmácia da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas Henrique Santillo. Anápolis-GO. Docente do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Moleculares (PPGCM) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). E-mail: giuliana.muniz@ueg.br

GRAZIELE LOPES TELES – Psicóloga. Possui experiência na área de Promoção de Saúde e Prevenção de Doenças, atuou em Psicologia Hospitalar, dando suporte psíquico ao sujeito em adoecimento, sua família e a equipe multiprofissional. E-mail: grazi_teles@hotmail.com

IRISIASMINE DE REZENDE ARAÚJO – Farmacêutica. Mestranda do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). E-mail: irisiasmine@hotmail.com

ISABELA JUBÉ WASTOWSKI – Biomédica, mestre e doutora em Imunologia Básica e Aplicada pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) e pós-doutora pela Universidade Paris Diderot (França). Docente do curso de graduação em Estética e Cosmética da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Câmpus Goiânia – Laranjeiras, Goiânia-GO. Docente dos Programas de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) e Ambiente e Sociedade (PPGAS) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). E-mail: wastowski@gmail.com

IVANO ALESSANDRO DEVILLA – Engenheiro Agrícola, mestre e doutor em Engenharia Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa,

pós-doutor pela mesma instituição. Docente do curso de graduação em Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas, Anápolis-GO. Docente do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Engenharia Agrícola (PPGEA) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). E-mail: devilla@ueg.br

JAQUELINE EVANGELISTA DE QUEIROZ – Farmacêutica, mestranda do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Moleculares (PPGCM) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). E-mail: jaqueevan.je@gmail.com

JAMES TEIXEIRA RODRIGUES – Farmacêutico, especialista em Farmacologia Clínica pela Universidade Federal de Goiás e mestrando do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). E-mail: jms.rodrigues@gmail.com

JÉSSICA PIRES VALLE – Graduada em Ciências Biológicas modalidade licenciatura, mestre em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde pelo Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). E-mail: jeessvalle@gmail.com

JOELMA ABADIA MARCIANO DE PAULA – Farmacêutica, mestre e doutora em Biologia pela Universidade Federal de Goiás (UFG). Pós-doutora em Inovação Farmacêutica pela Universidade Federal de Goiás (UFG). Docente do curso de graduação em Farmácia da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas Henrique Santillo, Anápolis-GO. Coordenadora do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás (UEG) nos anos 2016 e 2017. E-mail: joelma.paula@ueg.br

JOSÉ DANIEL RIBEIRO CAMPOS – Químico, mestre e doutor em Química pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e pós-doutor pela Universidade de Brasília (UnB). Docente dos cursos de Química Industrial e Química Licenciatura da Universidade Estadual

de Goiás, Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas Henrique Santillo, Anápolis-GO. Docente do Programa de Mestrado Profissional em Ensino de Ciências (PPEC) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). E-mail: daniel.campos@ueg.br

KARINA FREIRE d'EÇA NOGUEIRA SANTOS – Graduada em Ciências Biológicas, mestre em Biologia Molecular pela Universidade Federal de Goiás (UFG) e doutora em Bioquímica pela Universidade Federal do Paraná. Atualmente é bolsista do Programa Nacional de Pós-Doutorado (PNPD – CAPES) do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). E-mail: kabiomol@gmail.com

LARISSA BATISTA DA SILVA – Graduada em Ciências Biológicas modalidade licenciatura, mestre em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde pelo Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). E-mail: silvalarissas@gmail.com

LUCAS HENRIQUE FERREIRA SAMPAIO – Biomédico, mestre e doutor em Medicina Tropical pelo Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG) e pós-doutor em Engenharia Genética Aplicada a Imunologia (vacinologia) pela University of Washington (USA). Docente do curso de graduação em Estética e Cosmética da Universidade Estadual de Goiás, Câmpus Goiânia – Laranjeiras, Goiânia-GO. Docente do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). E-mail: lucas.sampaio@ueg.br

LUCAS LEONARDO DA SILVA – Graduado em Ciências Biológicas modalidade licenciatura, mestre em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde pelo Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). E-mail: lucasleo.bio@gmail.com

LUCIANA REBELO GUILHERME – Graduada em Ciências e em Química modalidade licenciatura, mestre em Química pela Universi-

dade Federal do Paraná (UFPR), doutora em Química pela Universidade Estadual Paulista (UNESP – Araraquara) e pós-doutora pelo Centro de Investigación Cooperativa en Biomateriales, CICBIOMAGUNE (Espanha). Docente dos cursos de graduação em Química Licenciatura e Química Industrial da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas, Anápolis-GO. Docente do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás. E-mail: luciana.guilherme@ueg.br

MAÍSA BORGES COSTA – Química, mestre e doutora em Química Orgânica pela Universidade de Brasília (UnB) e pós-doutora em Inovação Farmacêutica pela Universidade Federal de Goiás (UFG). Docente dos cursos de graduação em Química Licenciatura e Química Industrial da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas, Anápolis-GO. Docente dos Programas de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) e Ciências Moleculares (PPGCM) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). E-mail: maisabc@gmail.com_

MARIA AUXILIADORA ANDRADE – Médica Veterinária, mestre e doutora em Ciência Animal pela Universidade Federal de Goiás (UFG). Tem experiência na área de Medicina Veterinária, com ênfase em Doenças Infecciosas de Animais. Docente da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (UFG). Vice-diretora da Escola de Veterinária da UFG nos anos de 1998-2002. E-mail: maa@evz.ufg.br

MARTINA ESTEVAM BROM VIEIRA – Fisioterapeuta, mestre e doutora em Ciências (Saúde Mental) pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP). Docente do curso de graduação em Fisioterapia da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Câmpus ESEFFEGO, Goiânia-GO. E-mail: martinabrom@gmail.com

MURILLO FERNANDES FERREIRA – Graduação em andamento em Química Industrial da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas, Anápolis-GO. E-mail: mff779@gmail.com

PATRÍCIA JOSÉ MARQUES TANNÚS – Farmacêutica, especialista em Tecnologia Industrial Farmacêutica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) / IGTF e mestre pelo Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). E-mail: patriciamtannus@yahoo.com.br

PLÍNIO LÁZARO FALEIRO NAVES – Graduado em Ciências Biológicas modalidade Médica, mestre em Medicina Tropical pela Universidade Federal de Goiás (UFG), doutor em Microbiologia pela Universidade Complutense de Madrid (Espanha) e pós-doutor pela Universidade Federal de Goiás (UFG). Docente dos cursos de graduação em Farmácia e Química Industrial da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas, Anápolis-GO. Docente dos Programas de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) e Ciências Moleculares (PPGCM) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). E-mail: plinionaves@ueg.br

RAFAELA NOLETO DOS SANTOS – Fisioterapeuta, mestranda do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). E-mail: rafinhanoletto@hotmail.com

RAYANE SANTA CRUZ MARTINS DE QUEIROZ ANTONINO – Farmacêutica, mestre em Ciência e Engenharia de Materiais pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). Doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Ciência Farmacêutica da Universidade Federal de Goiás (UFG). E-mail: rayane.scruz@gmail.com

RENATA AWAD – Farmacêutica, mestranda do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). E-mail: re_awad92@hotmail.com

RENATO GOMES SANTOS – Químico, mestre em Ciências Moleculares pelo Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências

Moleculares (PPGCM) da Universidade Estadual de Goiás (UEG).
E-mail: renato_fsc@hotmail.com

ROBSON RODRIGUES SANTANA – Graduando em Engenharia Agrícola pela Universidade Estadual de Goiás. Possui Curso Técnico em Eletromecânica pela Escola SENAI. E-mail: robsonengenharia@outlook.com

SINARA PEREIRA BRASIL – Graduada em Química modalidade licenciatura, mestre em Ciências Moleculares pelo Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Moleculares (PPGCM) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). E-mail: sinarapb@hotmail.com

TÂNIA CRISTINA DIAS DA SILVA HAMU – Fisioterapeuta, mestre e doutora em Ciências da Saúde pela Universidade de Brasília (UnB) e pós-doutora em Engenharia Elétrica e da Computação pela Universidade Federal de Goiás (UFG). Docente do curso de graduação em Fisioterapia da Universidade Estadual de Goiás, Câmpus ESEF-FEGO. Goiânia-GO. E-mail: tania.ft@gmail.com

THAIS LEITE NASCIMENTO – Farmacêutica, mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Goiás (UFG), doutora em Farmacotécnica e Biofarmácia pela Escola de Inovação Terapêutica da Université Paris-Sud 11 (França). Atualmente é pesquisadora no Laboratório de Nanotecnologia e Sistemas de Liberação de Fármacos (Farma-Tec) da Universidade Federal de Goiás (UFG) e Docente colaboradora do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). E-mail: thais.leite.nascimento@gmail.com

VANESSA CRISTIANE SANTANA AMARAL – Farmacêutica-Bioquímica, mestre em Biologia pela Universidade Federal de Goiás (UFG). Doutora em Ciências Fisiológicas pelo Programa Interinstitucional em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e Universidade Estadual Paulista (UNESP) Júlio de Mesquita Filho e pós-doutora em Neuropsicofarmacologia pela Universidade Estadual Paulista (UNESP) Júlio de Mesquita Filho. Docente dos cursos de graduação em Farmácia e Ciências Biológicas da Universi-

dade Estadual de Goiás (UEG), Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas, Anápolis-GO. Docente do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás (UEG). E-mail: vanessa.cristiane@ueg.br

SOBRE O LIVRO

Formato: 16x22,5cm
Tipologia: Minion Pro
Número de Páginas: 410
Suporte do livro: E-book

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
BR-153 – Quadra Área, Km 99 – 75.132-903 – Anápolis-GO
www.ueg.br / Fone: (62) 3328-1181

2019
Impresso no Brasil / Printed in Brazil

s 12 and 371392 is not 11. one is a
member of haplogroup R1b.

O livro como o próprio nome diz, engloba conhecimento e interdisciplinaridade aplicados à saúde de forma geral. Dividido em quatro partes, ele descreve de forma sucinta e acessível a profissionais de Ciências da Saúde: Saberes e Práticas Interdisciplinares – diversas áreas, apresentando informações sobre biotecnologia, saúde física e mental, inovações em saúde e sanidade animal.

Para quem gosta de biotecnologia como eu, o leitor vai se surpreender com as novidades a respeito de tecnologias relacionadas a microrganismos e suas aplicações. Além disso, o livro traz também uma série de revisões com novidades sobre biofármacos, em especial os fitoterápicos, bem como suas diferentes formas de produção e a manutenção da qualidade. No decorrer de sua leitura, é difícil não trazer à tona o polêmico embate sobre o potencial que o Brasil tem com sua biodiversidade e o longo caminho que as futuras gerações terão que percorrer para preservá-la ao mesmo tempo em que aproveitam de tal potencial

Luis Eduardo Maggi

Doutor em Engenharia Biomédica pela
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)
Professor na Universidade Federal do Acre (UFAC)
Vice-coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental da UFAC

ISBN: 978-85-5582-060-1