

REVISTA

FARMÁCIA GENERALISTA

GENERALIST PHARMACY JOURNAL

**ANAIS DO I WORKSHOP
DO PROGRAMA DE PÓS
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS
UNIVERSIDADE
FEDERAL DE ALFENAS**

Volume 1, n.1, 2019
PET FARMÁCIA UNIFAL-MG

UNIFAL-MG

Anais do I Workshop do Programa de Pós-graduação de Ciências Farmacêuticas

Realizado pelo Programa de Pós-graduação de Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG.

UNIFAL-MG/Alfenas, de 02 a 06 de abril de 2019.

Publicado pela Revista Farmácia Generalista / Generalist Pharmacy Journal

Disponível em:

<https://publicacoes.unifal-mg.edu.br/revistas/index.php/revistafarmaciageneralista>

COMISSÃO ORGANIZADORA

Coordenador: Marcos Vinícios Salles Dias - Professor de Magistério Superior

Vice-Coordenador: Marília Gabriella Alves Goulart Pereira - Professor de
Magistério Superior

Coordenadora discente: Lauana Aparecida Santos - Representante discente

Comissão de Infraestrutura

Diogo Teixeira Carvalho - Professor de Magistério Superior

Bruna Pinheiro Pereira - Representante discente

Lauana Aparecida Santos - Representante discente

Marina Prado Rubinho - Representante discente

Rafaela Figueiredo Rodrigues - Representante discente

Rafael Leite Coelho - Representante discente

Sandra Barbosa Neder Agostini - Representante discente

Comissão Científica

Eduardo Costa de Figueiredo - Professor de Magistério Superior

Alessandra Oliveira Silva - Representante discente

Ananda Pulini Matarazzo - Representante discente

Josidel Conceição Oliver - Representante discente

Comissão de Patrocínio e Divulgação

Carla Speroni Ceron - Professor de Magistério Superior

Antônio Alves Pereira Júnior - Representante discente

Gabriel Estevam Santos de Amorim - Representante discente

Julia Rosental de Souza Cruz - Representante discente

Matheus Siqueira Silva - Representante discente

Milton Kennedy Aquino Júnior - Representante discente

Rayssa Araújo dos Santos - Representante discente

Thúlio Wliandon Lemos Barbosa - Representante discente

SUMÁRIO

RESUMOS EXPANDIDOS	6
Efeito do uso crônico de esteroides anabolizantes na dosagem de aspartato aminotransferase	7
Desempenho de manose, trealose e manitol como crioprotetores para complexos polieletrólíticos de quitosana	13
Biodisponibilidade relativa de duas formulações de venlafaxina 75 mg administradas em voluntários sadios em condições de jejum e pós-prandial	20
Os fármacos moduladores do sistema renina-angiotensina poderiam ser relevantes para o tratamento da infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> ?	26
Estudo <i>in vitro</i> do potencial osteogênico de membrana porosa de polímero PCL para a regeneração óssea guiada	36
RESUMOS SIMPLES	43
Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE-UV para quantificação de alopurinol	44
Avaliação do perfil histológico em modelo experimental da paracoccidiodomicose no tratamento com itraconazol combinado com laserterapia de baixa potência	45
Influência do tratamento antifúngico e antiinflamatório na resposta granulomatosa da paracoccidiodomicose na fase inicial da doença	46
Estereologia da resposta granulomatosa da paracoccidiodomicose experimental em camundongos tratados com itraconazol e celecoxib na fase inicial da infecção	47
Estudo de formas sólidas de espironolactona	48
Obtenção e caracterização de formas sólidas de alopurinol	49
Obtenção, caracterização e estudos de solubilidade e estabilidade de formas sólidas de acetato de fludrocortisona	50
Extratos de sementes de camu-camu (<i>Myrciaria dubia</i>) previnem dano cromossômico e atuam como agentes antiproliferativos	51
Avaliação da atividade leishmanicida <i>in vivo</i> a partir de derivado da miltefosina	52
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> : efeitos citotóxicos e antiproliferativos <i>in vitro</i> da fração acetato e fração 100% metanol em células de câncer e normais	53
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> : efeitos antimalários <i>in vitro</i> da fração acetato e fração 100% metanol em linhagens de <i>Plasmodium falciparum</i>	54
Potencial terapêutico do ravuconazol em combinação com fármacos reposicionados na infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i>	55
Bioprospecção e caracterização de fungos endofíticos produtores de compostos bioativos isolados de <i>Dalbergia ecastaphyllum</i> L.Taub	57
Ação antimalárica do camu-camu (<i>Myrciaria dubia</i>) não envolve inibição da polimerização do heme	58
Avaliação de <i>Lavandula angustifolia</i> mill. e <i>Lavandula dentata</i> l. sobre células planctônicas e biofilmes de <i>Candida albicans</i> e espécies não- <i>albicans</i> de <i>Candida</i> spp.	59

Avaliação do efeito do composto 4-nitrobenzoilcumarínico em monoterapia ou associado com o benznidazol na miocardite de camundongos infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	60
Avaliação da formação de biofilmes por isolados clínicos e ambientais de <i>Cryptococcus neoformans</i> e determinação da sensibilidade antifúngica de células sésses e planctônicas	61
Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana contendo pregabalina para tratamento de dor neuropática	62
Avaliação do potencial insulínico do óleo de baru <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	63
Efeitos do hipotireoidismo induzido experimentalmente sobre o comportamento depressivo e na farmacocinética da venlafaxina em ratos <i>Wistar</i> adultos	64
Avaliação da expressão do gene <i>CAP1</i> em <i>Candida albicans</i> tratada com concentrações subinibitórias de antifúngicos	65
Impacto do tratamento com ravuconazol e anlodipino no perfil de citocinas de camundongos experimentalmente infectados por <i>Trypanosoma cruzi</i>	66
Desenvolvimento e validação de métodos físico-químico e microbiológico para diferentes formulações de cápsulas de sulfato de neomicina 500mg.....	67
Estudos de liberação da donepezila a partir de um sistema precursor de cristal líquido de fase hexagonal	68
Estudo estrutural e físico-químico de formas sólidas da buclizina.....	69
Determinação de ácidos biliares empregando fase sólida molecularmente impressa no preparo de amostras de soro	70
Uso de nanopartículas de albumina sérica bovina para o preparo de amostras complexas	71
Prevalência de <i>Helicobacter pylori</i> em pacientes na região do Vale do Paraíba – SP	73
Síntese de derivados da licarina a como agentes tripanocidas potenciais	75
Análise do crescimento bacteriano de fígado de camundongos infectados e não infectados com <i>Schistosoma mansoni</i>	76
Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de pregabalina aplicado ao teste de liberação <i>in vitro</i> da nanopartícula.....	77
Características sociodemográficas da paracoccidiodomicose no sul do estado de Minas Gerais no período de 2007 à 2017.	78
Síntese e avaliação biológica <i>in vitro</i> de sulfonamidas potencialmente antiproliferativas, obtidas por hibridação molecular a partir de fenilpropanoïdes.....	79
Aumento da atividade de NOX 2 por aminoguanidina e as implicações no sistema redox de ratos diabéticos tipo 2	81
Avaliação da influência da glicoproteína-P na farmacocinética da carbamazepina em ratos epiléticos.....	82
Desenvolvimento de protótipos de fármacos Leishmanicidas: estudos computacionais por modelagem molecular, síntese química e avaliação farmacológica de derivados oxímicos a partir do Safrol.	84
<i>Candida albicans</i> expostas a antifúngicos e fagócitos aumentam a expressão gênica de aspartato proteases secretadas	86

Avaliação do potencial de membrana mitocondrial e de geração de peróxido de hidrogênio em promastigotas de <i>Leishmania</i> tratadas com compostos cumarínicos ..	87
Avaliação da atividade leishmanicida <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de compostos de prata contendo imidazolina-2-tiona.....	88
Avaliação das propriedades probiótica, antioxidante e anti-inflamatória da cerveja de quefir e seus efeitos sobre a função hepática de ratos <i>Wistar</i>	89
Planejamento e síntese de híbridos di-hidroeugenol-pentamidina de potencial atividade antimicrobiana	90
Avaliação leishmanicida e citotóxica de derivados da Licarina A <i>in vitro</i>	91
Exposição à nicotina durante o início do período pós-natal: Vulnerabilidade ao estresse na vida adulta?	92
Determinação de ácidos biliares e seus conjugados em soro por extração em fase sólida <i>on-line</i> acoplada ao LC-MS/MS	93
Planejamento e síntese de derivado otimizado de cumarina leishmanicida com vistas à redução de sua toxicidade e melhoria de solubilidade	94
Híbridos de 5-nitroimidazóis condensados a fenilpropanoides, substâncias com ação potencial antiparasitária e citotóxica	95
Aplicação de sorventes magnéticos para análise rápida e direta de nicotina presente em amostras biológicas por espectrometria de massas ambiente	96
Síntese e avaliação farmacocinética experimental em ratos <i>Wistar</i> de derivado glicosídico do eugenol	97
Diagnóstico diferencial da proteína NS1 de Zika vírus e Dengue vírus através do reconhecimento com polímeros impressos molecularmente	98

RESUMOS EXPANDIDOS

Efeito do uso crônico de esteroides anabolizantes na dosagem de aspartato aminotransferase.

Bruno Damiano¹, Carla Miguel de Oliveira¹, Jéssica Magalhães Toledo¹, Larissa Coelho de Carvalho Rosa¹, Tayara Moraes Vergueiro Tavares¹, Alessandra Esteves², Wagner Costa Rossi Junior², Maria Rita Rodrigues¹

¹UNIFAL-MG, Faculdade de Ciências Farmacêuticas

²UNIFAL-MG, Departamento de Anatomia

professorbrunodamiao@gmail.com

RESUMO

Esteroides Anabólicos Androgênicos (EAAs) são derivados sintéticos do hormônio testosterona. O uso médico é irrisório, atualmente, se comparado ao abuso ilícito dessas substâncias, sendo o Brasil um dos grandes consumidores mundiais, principalmente entre adolescentes e adultos jovens do sexo masculino. O estudo atual objetivou analisar o efeito de dois dos anabolizantes mais utilizados no país sobre a dosagem sérica da enzima hepática Aspartato Aminotransferase (AST). Para isso, foram utilizados 182 ratos Wistar macho, divididos em 26 grupos de 7 animais cada. Os animais receberam duas doses semanais, subcutâneas, de Decanoato de Nandrolona, Cipionato de Testosterona ou um Mix dos dois anabolizantes, nas doses de 0, 5, 10 e 15 mg/kg, submetidos ou não ao exercício físico resistido (escada vertical). O tratamento durou 8 semanas, sendo considerado um tratamento crônico. Os resultados mostraram uma elevação dos níveis séricos da enzima hepática AST, que apresentou um aumento progressivo na curva dose-resposta. Os dados possibilitam tecer uma relação direta entre o aumento da dose dos anabolizantes utilizados com as alterações do parâmetro analisado.

Palavras-chave: Esteroides Anabólicos Androgênicos (EAAs), parâmetros bioquímicos, enzimas hepáticas.

Effect of chronic use of anabolic steroids in aspartate aminotransferase dosage.

ABSTRACT

Anabolic Androgenic Steroids (AAS) are synthetic derivatives of the hormone testosterone. Medical use is now ridiculous compared to the illicit abuse of these substances, Brazil being one of the great consumers worldwide, especially among adolescents and young adult males. The present study aimed to analyze the effect of two of the most used anabolic agents in the country on the serum dosage of the liver enzyme Aspartate Aminotransferase (AST). For this, 182 male

Wistar rats were divided into 26 groups of 7 animals each. The animals received two weekly doses, subcutaneous, of Nandrolone Decanoate, Testosterone Cypionate or a Mix of the two anabolic agents, at doses of 0, 5, 10 and 15 mg / kg, submitted or not to resisted physical exercise (vertical ladder). The treatment lasted 8 weeks and was considered a chronic treatment. The results showed elevated serum levels of the AST liver enzyme, which showed a progressive increase in the dose-response curve. The data make it possible to establish a direct relationship between the dose increase of the anabolic agents used and the changes in the parameter analyzed.

Key words: Anabolic Androgenic Steroids (AAS), biochemical parameters, liver enzymes.

INTRODUÇÃO

Os esteroides anabólicos androgênicos (EAAs) são hormônios sintéticos derivados da testosterona (BARCELOUX; PALMER, 2013). Nas últimas décadas, a quantidade de anabolizantes utilizados pela medicina se tornou irrelevante se comparado ao abuso dessas substâncias feito de maneira ilícita (LUSSETI et al., 2015). O Brasil é o segundo país no ranking mundial dos maiores consumidores de anabolizantes, com o uso registrado em capitais e cidades das cinco regiões do país, inclusive entre alunos do ensino médio e fundamental (NOGUEIRA, 2015).

Os efeitos colaterais do abuso dessas substâncias estão relacionados, à nível de frequência e intensidade/gravidade, com o princípio ativo da droga, com a via de administração utilizada, com a duração do ciclo de uso e com fatores e susceptibilidades individuais. (MHILLAJ et al., 2015; NIEDFELDT et al., 2018). Efeitos hepáticos devido ao abuso de esteroides aparecem em relatos de casos da década de 1950, como colestases e tumores (SOLIMINI et al., 2017). A hepatotoxicidade dos EAAs pode estar relacionada a fatores como susceptibilidade genética e um aumento da infiltração de neutrófilos, eosinófilos e linfócitos no tecido hepático. Pesquisas já relataram alterações de estrutura e função, acarretando hepatite, hiperplasia e adenoma hepatocelular (SOLIMINI et al., 2017). A hepatotoxicidade pode ser vista na elevação das enzimas transaminases, em injúrias vasculares que se tornam crônicas, em tumores hepáticos e também na esteatose hepática. Porém, grande parte das mudanças e injúrias hepáticas causados por EAAs cessam e o fígado consegue recuperar sua função e atividade normais quando o uso é interrompido (BOND et al., 2016; SOLIMINI et al., 2017).

O atual trabalho objetivou relacionar o uso de esteroides anabolizantes androgênicos (EAAs), em quatro doses diferentes, em animais sedentários e exercitados, sobre o peso médio ganho por cada animal (peso final menos o peso inicial – em gramas) e sobre a dosagem sérica da enzima hepática AST (aspartato Aminotransferase).

METODOLOGIA

Foram utilizados 182 ratos Wistar machos (26 grupos com 7 animais cada) (TANEHKAR et al., 2013) com 8 semanas de vida e peso inicial entre 250 e 350 gramas. Foram escolhidos dois anabolizantes: Cipionato de Testosterona (vendido no Brasil como Deposteron®) e Decanoato de Nandrolona (vendido no Brasil como Deca-Durabolin). As doses utilizadas (0, 5, 10 e 15 mg/kg) foram aplicadas de forma subcutânea, duas vezes na semana (nas segundas-feiras e quintas-feiras), durante 8 semanas, totalizando 16 aplicações por animal. Metade dos animais foram submetidos a três sessões semanais de exercício físico resistido, em um modelo conhecido como Escada Vertical, baseado no modelo de Casilhas e seus colaboradores (2013).

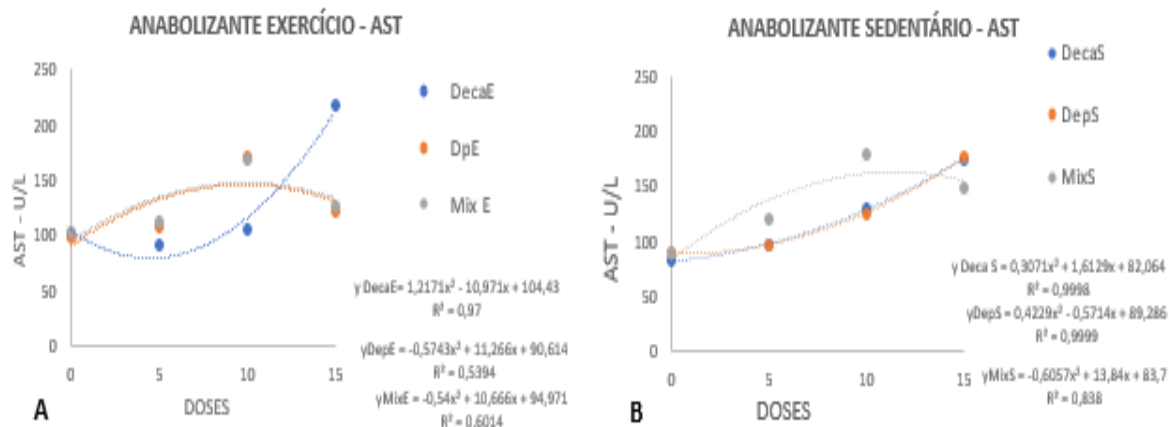
Após realização do tratamento, o sangue dos animais foi coletado através do método de decapitação. As amostras de sangue foram armazenadas em tubo sem anticoagulante e centrifugadas durante 10 minutos a 2.500 RPM. O soro obtido foi armazenado a -20 graus célsius para a análise bioquímica subsequente. A enzima Aspartato transaminase (AST) foi determinada utilizando-se um analisador automático (LabMax Pleno®, labtest Diagnóstica, Brasil) com um kit Labtest® comercial, através do método cinético (UV-IFCC).

O estudo representa um delineamento inteiramente casualizado (DIC), portanto, a análise estatística foi realizada por meio da Análise de Variância (ANOVA three-way), seguida do teste de comparação de médias Tukey. Além disso, as quatro doses escolhidas para cada anabolizante e para o mix permitiram que fosse feita uma Regressão Linear Simples, onde foi obtida uma curva dose e resposta com seu correspondente Coeficiente de Determinação (R²).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 mostra os resultados da regressão linear feita com as médias das dosagens séricas da enzima hepática AST. A figura 1-A apresenta os valores dos animais submetidos ao tratamento com anabolizantes e exercício físico, enquanto a figura 1-B apresenta os resultados obtidos dos animais tratados com anabolizantes, porém sedentários.

Figura 1 – Curva dose-resposta da dosagem sérica média da enzima hepática Aspartato Aminotransferase dos grupos tratados com anabolizantes com e sem exercício físico resistido.



Legenda: 1A – Dosagem sérica média da enzima hepática AST (em U/L) nos grupos tratados com anabolizante e exercício físico resistido. 1B – Dosagem sérica média da enzima hepática AST (em U/L) nos grupos tratados com anabolizante e sedentários. Onde: D = Deca; Dp = Deposteron; M = Mix; E = Exercício; S = Sedentário.

A figura 1A demonstra que o anabolizante Deca-Durabolin aumento, efetiva e significativamente, os níveis da enzima AST. Seu coeficiente de determinação de 97% demonstra que o modelo explica 97% do aumento sérico da enzima, ou seja, conforme aumenta-se a dose do anabolizante em questão, maiores os valores séricos da enzima AST dos animais tratados. Para o anabolizante Deposteron® e para o Mix dos dois anabolizantes, o modelo apresentou um baixo coeficiente de determinação, mostrando que o modelo não é significativo, ou seja, conforme aumentamos a dosagem dos anabolizantes, o modelo não explica o aumento sérico da enzima AST.

A figura 1B demonstra que para os anabolizantes Deca-Durabolin® e Deposteron®, separados, o modelo explica mais de 95% das alterações observadas, ou seja, conforme aumenta-se a dose destes anabolizantes, aumenta-se também os valores séricos da enzima hepática AST. O Mix dos dois anabolizantes mostrou um coeficiente de determinação (R²) mais baixo, de 83%, mostrando que o modelo é significativo, porém, uma quantidade de enzimas séricas maior nos animais tratados com 10mg/kg em comparação com os animais tratados com 15 mg/kg, demonstra que quando misturados, esses anabolizantes apresentam maior hepatotoxicidade na dosagem de 10 mg/kg.

As enzimas AST e ALT estão presentes em grandes quantidades nos hepatócitos, e um aumento de seus níveis plasmáticos reflete um dano hepatocelular ou ao menos um aumento da permeabilidade da membrana hepatocelular (NIEDTIFIELD, 2018). Aumentos dos níveis dessas

enzimas causado pelo abuso de esteroides está na faixa de 2 a 3 vezes maior do que as dosagens dessas enzimas em sujeitos não usuários (HARTGENS, KUIPERS, 2004).

Porém, apenas o aumento nos níveis das enzimas hepáticas no plasma demonstra uma relação muito simplista entre o uso de esteroides e efeitos hepáticos (SOLIMINI et al., 2017), uma vez que o aumento dessas enzimas acontece também em praticantes de musculação e animais submetidos a atividades físicas mesmo sem o uso de esteroides, relacionado exclusivamente com o dano muscular gerado pelo exercício (HARTGEN, KUIPERS, 2004). Por esse motivo, e pelo curto tempo de duração das enzimas AST e ALT na circulação sanguínea após lesão muscular, no atual estudo os animais fizeram a uma atividade física pelo menos 30 horas antes do sacrifício, evitando assim possível interferência do exercício físico nos níveis de AST e ALT.

CONCLUSÕES

Conclui-se que os anabolizantes utilizados elevaram a dosagem sérica da enzima hepática AST, independente da presença ou não de exercício físico resistido. Observando os valores da dosagem sérica de AST para os tratamentos Deposteron e Mix, conclui-se que os animais submetidos ao exercício físico resistido podem ter se beneficiado de um possível efeito hepatoprotetor do treinamento, uma vez que os coeficientes de determinação de ambos os modelos demonstram uma menor relação entre o aumento das doses e o aumento na quantidade de enzimas.

REFERÊNCIAS

BARCELOUX, D.G.; PALMER, R.B. Anabolic-androgenic steroids. **Disease-a-month: DM**, v. 59, n. 6, p. 226-248, 2013.

BOND, P., LLEWELLYN, W., VAN MOL, P. Anabolic androgenic steroid-induced hepatotoxicity. **Medical hypotheses**, 93, 150-153, 2016.

CAMILLETI-MOIRÓN, D.; APARICIO, V.A.; NEBOT, E.; MEDINA, G.; MARTINER, R. High-intensity exercise modifies the effects of Stanozolol on brain oxidative stress in rats. **International Journal of Sports Medicine**. V.1055, p. 10-16, 2015.

CASSILHAS, R.C.; REIS, I.T.; VENÂNCIO, D.; FERNANDES, J.; TUFIK S. Animal model for progressive resistance exercise: a detailed description of model and its implications for basic research in exercise. **Motriz: revista educação física [online]** V.19, n.1, 178-184, 2013.

DO CARMO, E.C.; FERNANDES, T.; KOIKE, D.; DA SILVA JR, N.D.; MATTOS, K.C.; ROSA, K.T. Anabolic steroid associated to physical training induces deleterious cardiac effects. **Medical Science Sports Exercise**, v.43(10), p.1836-48, 2011.

HARTGENS, F.; KUIPERS, H. Effects of androgenic-anabolic steroids in athletes. **Sports medicine**, v. 34, n. 8, p. 513-554, 2004.

LUSETTI, M.; LICATA, M.; SILINGARDI, E.; BONETTI, L.R. Pathological changes in anabolic androgenic steroid users. **Journal of Forensic and Legal Medicine**. V.33, p.101-104, 2015.

MHILLAJ, E.; MORGESE, M.G.; TUCCI, P.; BONE, M. Effects of anabolic androgens on brain reward function. **Frontiers in Neuroscience**. V.9, p.295-302, 2015.

NIEDFELDT, M. W. Anabolic Steroid Effect on the Liver. **Current sports medicine reports**, v. 17, n. 3, p. 97-102, 2018.

NOGUEIRA, F.R.S.; BRITO, A.F.; VIEIRA, T.I.; OLIVEIRA, C.V.C.; GOUVEIA, R.L.B. Prevalência de uso de recursos ergogênicos em praticantes de musculação na cidade de João Pessoa, Paraíba. Rev. **Brasileira de Ciências do Esporte**. V.37, p. 56-64, 2015.

SOLIMINI, R.; ROTOLO, M. C.; MASTROBATTISTA, L.; MORTALI, C.; MINUTILLO, A.; PICHINI, S.; PALMI, I. Hepatotoxicity associated with illicit use of anabolic androgenic steroids in doping. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, 7-16, 2017.

TANEHKAR, F.; RAGHIGHI, P.A.; VAFAEI, A.A.; SAMEI, H.R.; MILADI, G.H. Voluntary exercise does not ameliorate spatial learning and memory deficits induced by chronic administration of nandrolone decanoate in rats. **Hormone and Behavior**. V. 63, p.158-165, 2013.

Desempenho de manose, trealose e manitol como crioprotetores para complexos polieletrólíticos de quitosana

Sandra Barbosa Neder Agostini^{1*}; Victor Lima de Souza Machado¹; Valéria de Moura Leite Naves¹; Denismar Alves Nogueira²; Gislaine Ribeiro Pereira¹; Flávia Chiva Carvalho¹

¹Universidade Federal de Alfenas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Departamento de Alimentos e Fármacos

²Universidade Federal de Alfenas, Instituto de Ciências Exatas/Departamento de Estatística

*sbnader@gmail.com

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a obtenção de nanopartículas liofilizadas obtidas a partir de complexos polieletrólíticos (PECs) de quitosana associada a ftalato de hipromelose (HPMCP) empregando crioprotetores como trealose, manose e manitol. Os resultados de distribuição de tamanho de partícula, índice de polidispersão, eficiência de encapsulação, morfologia e perfil de liberação do fármaco apontam a manose como melhor crioprotetor na manutenção da estrutura dos PECs.

PALAVRAS-CHAVE: liofilização; crioprotetor; quitosana; ftalato de hypromelose

Performance of mannose, trehalose and mannitol as cryoprotectants for chitosan polyelectrolytic complexes

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the obtention of freeze-dried nanoparticles from polyelectrolyte complexes (PECs) based on chitosan and hypromellose phthalate (HPMCP). Trehalose, mannose and mannitol were used as cryoprotectants. The particle size, polydispersity index, drug entrapment efficiency, morphology and drug release profile indicate mannose as the best cryoprotectant in order to maintain the PECs structure.

KEYWORDS: freeze-drying; cryoprotectant; chitosan; hypromellose phthalate.

INTRODUÇÃO

A complexação polieletrólítica é muito empregada na obtenção de nanopartículas de quitosana, por ser um método que não requer equipamentos onerosos, porém o produto final obtido é uma suspensão aquosa, que pode sofrer problemas de estabilidade. Como alternativa podemos liofilizar o produto. Os crioprotetores mais reportados no caso dos PECs são açúcares, principalmente trealose e manitol (ABDELWAHED *et al.*, 2006). A manose é um sacarídeo que vem sendo explorado com finalidade de aumentar a internalização das partículas pelos macrófagos, mas ainda não há relatos sobre seu efeito crioprotetor. Os estudos encontrados empregam estes açúcares de maneira isolada, e poucos estudos avaliam a eficiência comparativa entre os mesmos na manutenção da estrutura nanoparticulada dos PECs após a liofilização. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar o efeito da presença de manose, trealose e manitol durante a liofilização de PECs de quitosana e HPMCP.

METODOLOGIA

Uma solução de metotrexato $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ em tampão fosfato pH 7,4 foi gotejada sobre uma dispersão de quitosana $4,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ em ácido acético $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 5,5, contendo NaCl 200 mmol.L^{-1} , sob agitação magnética. Em seguida, uma dispersão de HPMCP $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ em solução de NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 5,5, contendo NaCl 200 mmol.L^{-1} foi gotejada sobre a primeira mistura. O sistema foi mantido sob agitação por mais 30 minutos. A proporção quitosana:HPMCP foi 3:1 e a concentração de metotrexato em relação à massa polimérica foi 5%. A suspensão fresca de PECs foi refrigerada por 24 h antes da caracterização ou da adição de crioprotetores.

Os crioprotetores avaliados foram: trealose 10% (T10); trealose 5% (T5); manose 10% (M10); manose 5% (M5); trealose 5% + manose 5% (TM10); trealose 2,5% + manose 2,5% (TM5); manitol 10% (ML10) e manitol 5% (ML5). Após a dissolução do açúcar nas suspensão de PECs, as amostras, contidas em pequenos frascos redondos de vidro, foram parcialmente mergulhadas em nitrogênio líquido e giradas a fim de se congelarem na forma de um filme fino ao longo das paredes internas do frasco de vidro.

As amostras congeladas foram liofilizadas à temperatura de 224,15 K e pressão de 2,4 Pa. Uma amostra sem crioprotetor (SC) foi congelada e liofilizada sob as mesmas condições.

Para caracterização, as amostras descongeladas foram ressuspensas numa mistura de solução ácido acético $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 5,5, solução de NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 5,5 e solução tampão fosfato pH 7,4, na mesma proporção do meio em que as partículas foram obtidas.

O tamanho e PDI dos PECs foram determinados por espalhamento dinâmico de luz (DLS) a 25°C (Zetasizer Nano ZS, Malvern). A morfologia por microscopia de força atômica (MFA) foi determinada no microscópio NX10 (Park Systems), no modo “True-non-contact”.

A eficiência de encapsulação (EE) foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), no sobrenadante das amostras centrifugadas a $12000 \times g$ por 2h. A liberação de

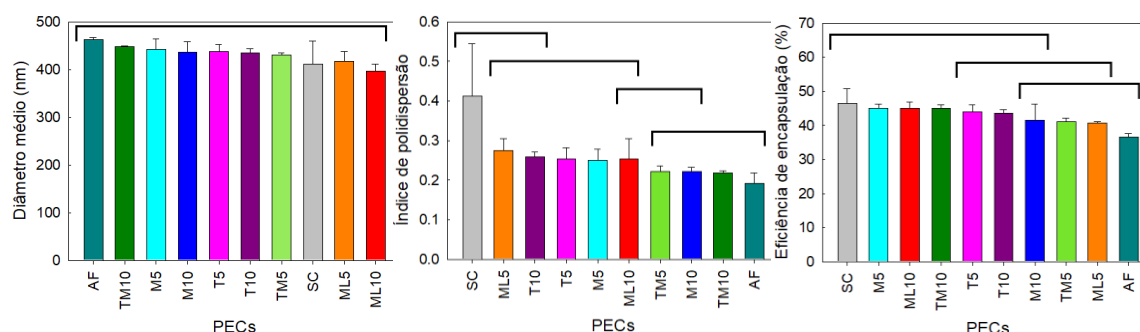
MTX foi realizada em células de difusão tipo Franz cobertas com membrana de diálise de acetato de celulose regenerada (MENDES *et al.*, 2019). Como meio receptor utilizou-se fluido sinovial simulado composto por solução aquosa de cloreto de sódio 0,80%(m.v⁻¹), cloreto de potássio 0,02%(m.v⁻¹), fosfato de sódio dibásico 0,14%(m.v⁻¹) e fosfato de potássio monobásico 0,02%(m.v⁻¹), com pH ajustado para 6,8. O teste foi realizado a 37°C, sob agitação de 300 rpm e as condições *sink* foram garantidas. O meio receptor foi analisado por CLAE.

A análise estatística foi feita pelo teste Kruskal Wallis, pelo *software* R (R CORE TEAM, 2018) usando o pacote Agricolae (MENDIBURU, 2017).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de tamanho de partícula, PDI e EE encontram-se na Figura 1. O tamanho das partículas após a liofilização variou de 397,00±14,20 nm (ML10) a 447,84±1,66 nm (TM10). Não houve diferença estatística entre qualquer dos tratamentos e AF (amostra fresca, não liofilizada) (461.93±4,68 nm) ou SC (411,38±47,52 nm).

Figura 1 – Influência dos diferentes crioprotetores sobre o tamanho, a polidispersão e a eficiência de encapsulação dos complexos polieletrólíticos



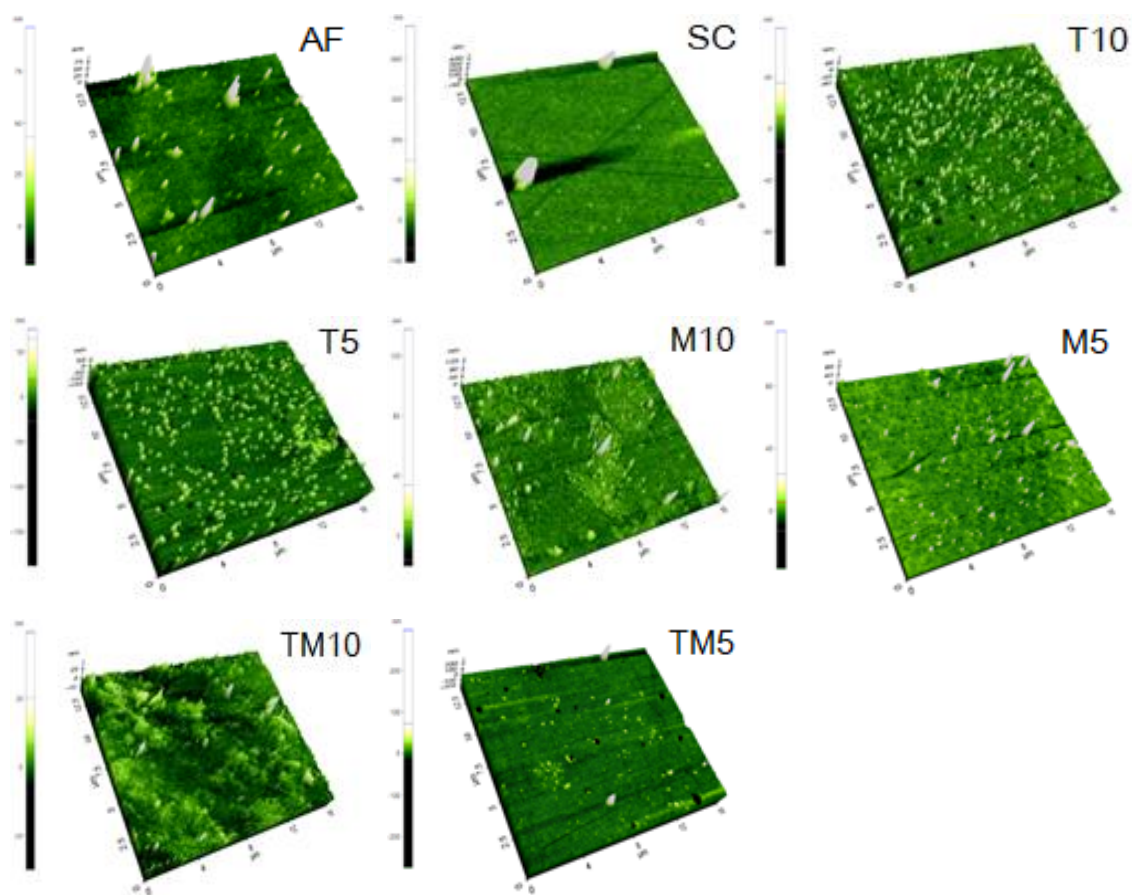
Legenda: PECs= complexos polieletrólíticos; AF= suspensão fresca de complexos polieletrólíticos; SC=liofilizado sem crioprotetor; T10=liofilizado contendo trealose 10%; T5=liofilizado contendo trealose 5%; M10=liofilizado contendo manose 10%; M5=liofilizado contendo manose 5%; TM10=liofilizado contendo trealose 5%+manose 5%; TM5=liofilizado contendo manose 2,5%+manose2,5%; ML10=liofilizado contendo manitol 10%; ML5=liofilizado contendo manitol 5%; os colchetes foram usados para delimitar grupos com igualdade estatística.

Fonte: DO AUTOR (2019)

As amostras nas quais apenas trealose foi utilizada como crioprotetor foram facilmente ressuspensas. Entretanto, o PDI de T10 foi equivalente ao de SC. Apesar do PDI de T5 ter sido menor que o de SC, foi mais alto que o de AF. T10 e T5 também foram estatisticamente diferentes

de AF e iguais a SC com relação a EE. Pela análise de MFA (Fig. 2 e 3) T10 e T5 exibiram numerosas partículas uniformes cuja altura foi menor do que de FS. Aparentemente, o uso de trealose causou a desagregação das partículas, o que pode ser desejável. Entretanto, também pode ter ocorrido fragmentação uma vez que o PDI aumentou significativamente com o tratamento, independente da concentração utilizada.

Figura 2 - Imagens topográficas em 3D dos PECs, antes e após a liofilização, obtidas por microscopia de força atômica

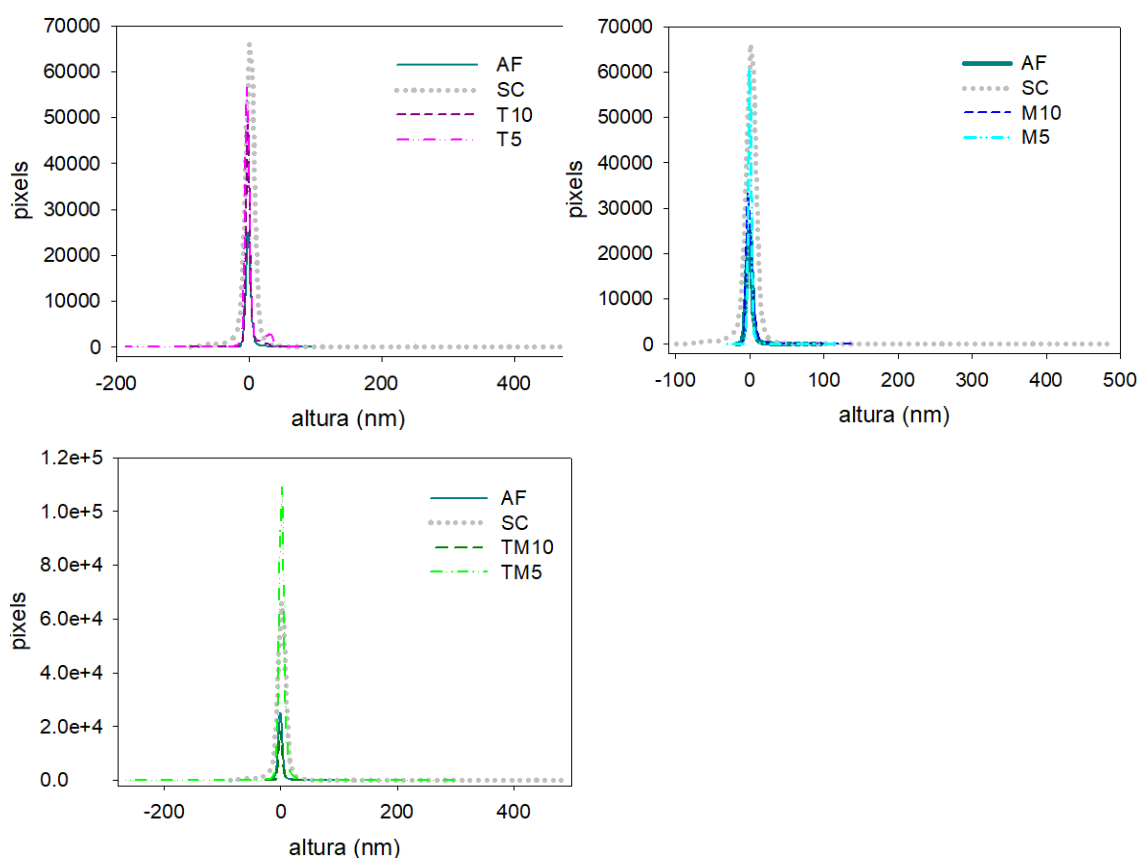


Legenda: AF= amostra fresca; SC= liofilizado sem crioprotetor; T10= liofilizado com trealose 10%; T5= liofilizado com trealose 5%; M10= liofilizado com manose 10%; M5= liofilizado com manose 5%; TM10= liofilizado com trealose 5% + manose 5%; TM5= liofilizado com trealose 2,5% + manose 2,5%
Fonte: DO AUTOR (2019)

A utilização de manose a 10%, além de preservar o tamanho, manteve o PDI e a EE inalterados após a liofilização. Além disso, a microscopia revelou que M10 e M5 foram as amostras mais semelhantes a AF tanto no aspecto topográfico quanto na distribuição de altura. A eficiência crioprotetora da manose também ficou evidente pela liberação de MTX a partir de M5, cujo perfil foi equivalente ao demonstrado por AF (Fig. 4).

Na literatura consta que a trealose possui bom desempenho como crioprotetor devido a apresentar alta temperatura de transição vítrea (ABDELWAHED *et al.*, 2006). A temperatura de transição vítrea da trealose é 241,15 K (SIMPERLER *et al.*, 2007) e a da manose, 258 K (NOEL; PARKER; RING, 2000). A temperatura de transição vítrea do manitol é ainda mais alta, 284 K (ZHU *et al.*, 2015). Entretanto, não foi possível ressuspender adequadamente as amostras liofilizadas com manitol e com exceção da EE apresentada por ML5, não se observou outra característica a favor de tal crioprotetor.

Figura 3 – Curvas de distribuição de altura dos PECs, analisados por microscopia de força atômica

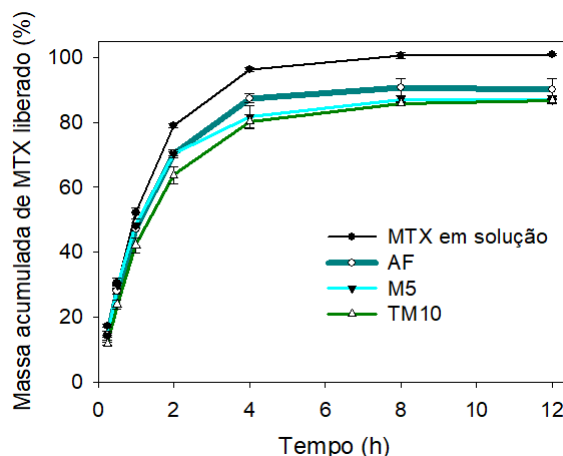


Legenda: AF= amostra fresca; SC= liofilizado sem crioprotetor; T10= liofilizado com trealose 10%; T5= liofilizado com manose 5%; M10= liofilizado com manose 10%; M5= liofilizado com manose 5%; TM10= liofilizado com trealose 5% + manose 5%; TM5= liofilizado com trealose 2,5% + manose 2,5%

Fonte: DO AUTOR (2019)

A associação de manose e trealose, tanto a 5 quanto a 10%, foi eficaz para manter o PDI. TM5 preservou também a EE (Fig. 1). O perfil de liberação de MTX a partir de TM10 foi equivalente ao de AF (Fig. 4).

Figura 4 – Perfis de liberação de MTX a partir de AF, M5, TM 10 e solução do fármaco.



Legenda: MTX= metotrexato; AF= amostra fresca; M5= liofilizado com manose 5%; TM10= liofilizado com trealose 5% + manose 5%.

Fonte: DO AUTOR (2019).

CONCLUSÃO

O trabalho revelou a manose como crioprotetor mais eficaz para os PECS de quitosana que os crioprotetores reportados até então.

AGRADECIMENTOS

CAPES (#1241/2014); FAPEMIG; CNPq (#454679/2014-9); FINEP (0179/12); CEMIC – Centro de Microscopia da Unifal-MG – Finep (0179/12); Laboratório de Bioquímica Clínica e Experimental da Unifal-MG; Laboratório de Microbiologia e Imunologia Básicas da Unifal-MG.

REFERÊNCIAS

ABDELWAHED, W. *et al.* Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. **Adv. Drug Delivery Rev.**, v. 58, p. 1688-1713, 2006.

MENDES *et al.* Development and characterization of nanostructured lipid carrier-based gels for transdermal delivery of donepezil. **Colloids Surf., B**, v. 177, p. 274-281, 2019.

MENDIBURU, F. **Agricolae: statistical procedures for agricultural research version 1.2-8**. 2017. Sítio eletrônico: <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>.

NOEL, T. R.; PARKER, R.; RING, S. G. Effect of molecular structure and water content on the dielectric relaxation behavior of amorphous low molecular weight carbohydrates above and below their glass transition. **Carbohydr. Res.**, v. 329, p. 839-845, 2000.

R CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Viena: R Foundation for Statistical Computing, 2018. Sítio eletrônico: <https://www.R-project.org/>.

SIMPERLER, A. *et al.* The glass transition temperatures of amorphous trehalose-water mixtures and the mobility of water: an experimental and in silico study. **Carbohydr. Res.**, v. 342, p. 1470-1479, 2007.

ZHU, M. *et al.* Possible existence of two amorphous phases of D-mannitol related by a first-order transition. **J. Chem. Phy.**, v. 142, p. 244504, 2015.

Biodisponibilidade relativa de duas formulações de venlafaxina 75 mg administradas em voluntários sadios em condições de jejum e pós-prandial

Alessandra Ferreira dos Santos^{1*}; Quevellin Alves dos Santos Francisco^{1,2}; Carlos Eduardo Melo Corrêa¹; Vanessa Begamin Boralli Marques³.

¹Instituto Cláudia Marques de Pesquisa e Desenvolvimento Ltda., Centro de Bioequivalência

²Universidade Federal de Alfenas, Programa de Pós-Graduação em Enfermagem Mestrado

³Universidade Federal de Alfenas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas

alessandra.santos@icmpd.com.br

RESUMO

De acordo com as autoridades regulatórias mundiais os estudos de biodisponibilidade relativa com produtos de liberação modificada administrados por via oral devem ser realizados em condições de jejum e pós-prandial. A venlafaxina é um inibidor potente da recaptção neuronal de serotonina e norepinefrina e inibidor fraco da recaptção da dopamina. É utilizada como antidepressivo e no tratamento da ansiedade. O objetivo deste trabalho foi avaliar a bioequivalência de uma nova formulação de venlafaxina cápsulas de liberação controlada de 75 mg (teste) e a formulação de referência para cumprir os critérios regulatórios de comercialização do produto teste no Brasil. Foram conduzidos dois estudos em voluntários sadios e as formulações administradas em dose única, sob as condições de jejum e pós-prandial. Cada estudo foi conduzido de maneira independente, sendo ambos abertos, do tipo cruzado 2x2, randomizados, envolvendo 48 voluntários de ambos os sexos, com intervalo de quatorze dias entre os períodos de administração. Os eventos adversos foram monitorados durante todo o estudo. Uma série de amostras de sangue foram coletadas até 96h e as concentrações de venlafaxina foram determinadas por um método bioanalítico utilizando CLUE-EM/EM. As análises farmacocinéticas e estatísticas foram realizadas através do software WinNonlinTM. As formulações foram consideradas bioequivalentes pois os ICs 90% para as médias geométricas (teste e referência) para $C_{máx}$ e ASC estão dentro do intervalo 80% a 125%. Em ambas as condições de administração, jejum e pós-prandial, de acordo com os critérios exigidos pela ANVISA, as formulações são intercambiáveis.

PALAVRAS-CHAVE: Bioequivalência; Venlafaxina; Jejum; Pós-prandial.

Relative bioavailability of two formulations of venlafaxine 75 mg given in healthy volunteers under fasted and fed conditions

ABSTRACT

According to the world regulatory authorities, relative bioavailability studies with modified-release products administered orally should be performed under fasted and fed conditions. Venlafaxine is a potent inhibitor of neuronal reuptake of serotonin and norepinephrine and a weak dopamine reuptake inhibitor. It is used as an antidepressant and in the treatment of anxiety. The objective of this study was to evaluate the bioequivalence of a new formulation of venlafaxine controlled release capsules of 75 mg (test) and the reference formulation to meet the regulatory criteria for the commercialization of the test product in Brazil. Two studies were conducted in healthy volunteers and formulations given as a single dose under fasting and fed conditions. Each study was conducted independently, both open-label, 2x2 crossover, randomized, involving 48 volunteers of both sexes, with a fourteen day interval between administration periods. Adverse events were monitored throughout the study. A series of blood samples were collected up to 96 h and venlafaxine concentrations were determined by a bioanalytical method using CLUE-MS / MS. Pharmacokinetic and statistical analyzes were performed using WinNonlin™ software. The formulations were considered bioequivalent since the 90% CIs for the geometric means (test and reference) for C_{max} and ASC are within the range of 80% to 125%. In both conditions of administration, fasting and postprandial, according to the criteria demanded by ANVISA, the formulations are interchangeable.

KEYWORDS: Bioequivalence; Venlafaxine; Fasting; Fed.

INTRODUÇÃO

A venlafaxina e a O-desmetilvenlafaxina (ODV), seu metabólito ativo, têm efeito farmacológico único e são inibidores potentes da recaptação neuronal de serotonina e norepinefrina e inibidores fracos da recaptação da dopamina. O cloridrato de venlafaxina é indicado no tratamento da depressão, incluindo depressão com ansiedade associada, na prevenção de recaída e recorrência da depressão. No tratamento de ansiedade ou transtorno de ansiedade generalizada (fobia social) e no transtorno do pânico (ALLGULANDER, HACKETT, SALINAS 2001).

Após a administração oral, pelo menos 92% de uma dose única de venlafaxina é absorvida. A biodisponibilidade absoluta da venlafaxina é de 45% e as concentrações plasmáticas máximas do fármaco e de seu metabólito ativo foram alcançadas em 5,5 e 9 horas, respectivamente. Ambas apresentam cinética linear no intervalo de dose de 75 a 450 mg/dia após

administração a cada 8 horas. As respectivas taxas de ligação às proteínas plasmáticas de venlafaxina e de ODV são de aproximadamente 27% e 30%. A venlafaxina sofre extenso metabolismo hepático e é biotransformada no seu principal metabólito ativo, a ODV, pela isoenzima CYP2D6 do citocromo P450. A eliminação renal da venlafaxina e seus metabólitos é a principal via de excreção com cerca de 5% de uma dose administrada excretada na urina como fármaco inalterado. As meias-vidas de eliminação da venlafaxina e da ODV são de aproximadamente 5 horas e 11 horas, respectivamente. A liberação prolongada de venlafaxina, fornece uma taxa mais lenta de absorção, mas a mesma extensão de absorção comparada com o comprimido de liberação imediata (MONTGOMERY, ET AL., 2004; LIEBOWITZ, et al, 2005).

No Brasil, os testes de biodisponibilidade relativa são necessários para o registro de medicamentos similares e genéricos que utilizam o critério de bioequivalência. Com base nessa conclusão, pode-se afirmar posteriormente que a qualidade terapêutica dessas formulações é essencialmente a mesma. Isto significa que os efeitos benéficos e os eventos adversos são essencialmente os mesmos e, portanto, as formulações são intercambiáveis.

De acordo com as autoridades regulatórias mundiais os estudos de biodisponibilidade relativa de produtos de liberação modificada administrados por via oral devem ser realizados em condições de jejum e pós-prandial. O objetivo deste trabalho foi avaliar a bioequivalência de uma formulação teste contendo 75 mg de cloridrato de venlafaxina em cápsulas de liberação controlada e comparada com a formulação de referência em voluntários sadios de ambos os sexos em condições de jejum e pós-prandial.

MATERIAL E MÉTODO

Protocolo clínico

Os protocolos foram aprovados pelo CEP da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Os estudos foram conduzidos de acordo com a Declaração de Helsinque e as Boas Práticas Clínicas, além das diretrizes da ANVISA para estudos de biodisponibilidade relativa / bioequivalência. Todas as etapas foram realizadas pelo Instituto Cláudia Marques de Pesquisa e Desenvolvimento (ICMP&D). Após explicação da natureza e finalidade da pesquisa os voluntários assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido antes do início do estudo.

Voluntários

Os dois estudos foram realizados com 48 indivíduos adultos sadios de ambos os sexos, com idades entre 18 a 50 anos com índice de massa corporal (IMC) de 18 a 30 kg/m². Todos os voluntários gozavam de boas condições de saúde, como evidenciado nas histórias médicas, exames físicos e exames clínicos e laboratoriais realizados durante o processo de seleção.

Desenho do estudo

Foram conduzidos dois estudos de bioequivalência e as formulações foram administradas em dose única, sob as condições de jejum e pós-prandial. No estudo em condições de jejum, os voluntários receberam uma única cápsula gelatinosa dura de liberação controlada de 75 mg contendo cloridrato de venlafaxina da formulação teste ou formulação de referência, não tendo consumido alimentos desde o jantar da noite anterior (aproximadamente 9 horas de jejum). No estudo pós-prandial, os voluntários receberam um desjejum padronizado (hiperlipídico e hipercalórico) 30 minutos antes da administração das formulações de cloridrato de venlafaxina 75 mg em dose única (teste ou referência). Os eventos adversos foram monitorados durante todo o estudo com base em sinais vitais, exames laboratoriais, observação por parte da equipe e relatos espontâneos dos voluntários. As amostras de sangue (7,5 mL) foram coletas nos tempos: 0 (basal), 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5; 9; 10; 11; 12; 24; 48; 72; 96 horas, em tubos contendo heparina. O plasma obtido por centrifugação a 3.500 rpm por 10 minutos a 4°C foi armazenado a -20°C.

Determinação de venlafaxina em amostras de plasma

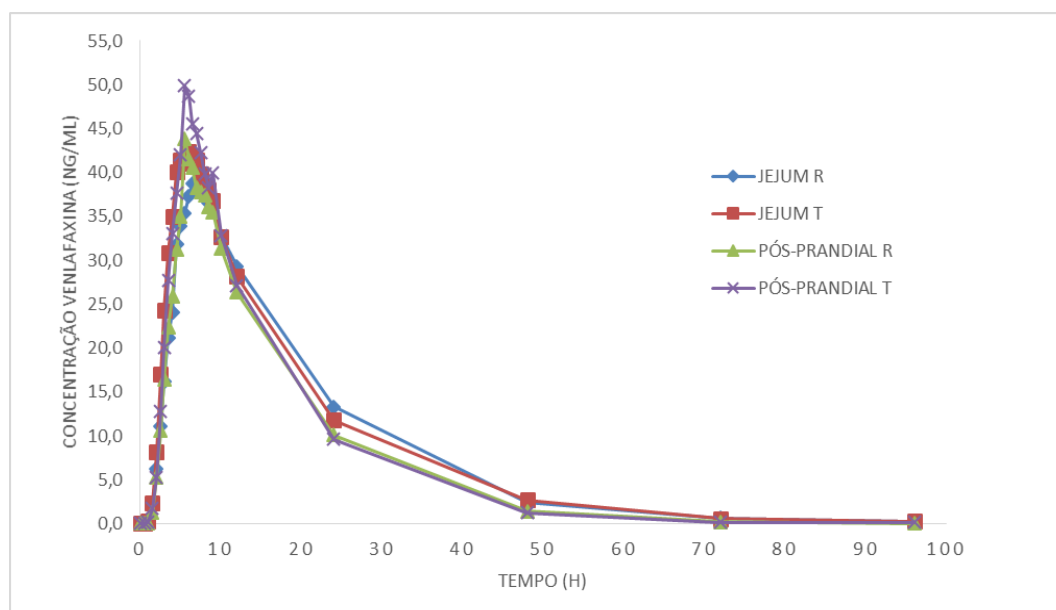
Foi desenvolvido e validado um método bioanalítico utilizando cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLUE-EM/EM), de acordo com as diretrizes da ANVISA e as Boas Práticas de Laboratório. Foram determinados os parâmetros de validação sendo eles, recuperação, linearidade, limite inferior de quantificação, precisão, exatidão, especificidade e estabilidade foram determinados. Todas as amostras do mesmo voluntário foram analisadas na mesma corrida analítica.

Análise farmacocinética e estatística.

As análises farmacocinéticas e estatísticas foram realizadas através do software WinNonlin™ 5.3. As formulações seriam consideradas bioequivalentes se os ICs 90% para as médias geométricas (teste e referência) para $C_{máx}$ e ASC estivessem dentro do intervalo 80% a 125%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com as agências regulatórias os estudos de biodisponibilidade relativa de produtos de liberação modificada administrados por via oral devem ser realizados em condições de jejum e pós-prandial. Um total de quarenta voluntários saudáveis de ambos os sexos do estudo em jejum e quarenta e um do estudo pós-prandial completaram os estudos. Os perfis das concentrações médias no plasma para as formulações teste e referência contendo cloridrato de venlafaxina são mostrados na figura 1.

Figura 1 - Curva de concentração *versus* o tempo.

Sob condições de jejum e pós-prandial, o $T_{\text{máx}}$ da formulação de referência ocorreu mais tarde do que o da formulação teste. As diferenças não foram estatisticamente significativas e provavelmente não são clinicamente relevantes. Os parâmetros farmacocinéticos obtidos para a venlafaxina em ambos os estudos estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Média aritmética dos parâmetros farmacocinéticos de venlafaxina após administração oral em dose única de 75 mg em cápsula de liberação controlada (teste e referência) em jejum (N = 40) e pós-prandial (N = 41).

Parâmetros	Jejum		Pós-prandial	
	Referência	Teste	Referência	Teste
C_{max} (ng/mL)	43,01	46,10	48,00	54,34
ASC_{0-t} (ng*h/mL)	758,51	766,58	641,72	668,80
ASC_{0-inf} ((ng*h/mL)	815,12	819,10	694,93	728,39
$T_{\text{máx}}$ (h)	6,50	5,74	6,22	5,50
K_{el} (1/h)	0,08	0,08	0,08	0,09
$T_{1/2}$ (h)	9,52	9,15	9,07	8,66

Nestes estudos realizados em condições de jejum e pós-prandial, os ICs de 90% para as médias de $C_{\text{máx}}$ e ASC_{0-t} estão dentro da faixa de aceitação da ANVISA de 80% a 125% e descritos na tabela 2.

Tabela 2. O intervalo de confiança de 90% (IC 90%) das razões médias (teste / referência) log-transformados para os parâmetros farmacocinéticos $C_{m\acute{a}x}$ e ASC_{0-t} , nos estudos jejum e pós-prandial.

Parâmetros	Jejum		Pós-prandial	
	Razão T/R (%)	IC (%)	Razão T/R (%)	IC (%)
$C_{m\acute{a}x}$	108,20	102,76 – 113,93	113,40	106,31 – 120,96
ASC_{0-t}	97,80	90,86 – 105,27	102,31	96,75 – 108,19

Os resultados dos estudos mostraram que as duas formulações são comparáveis em relação à taxa e extensão da absorção nas duas condições jejum e pós-prandial. Além disso, ambas as formulações foram bem toleradas na administração de dose única. Não houve eventos adversos graves relatados neste estudo. Os eventos adversos mais comuns ($\geq 5\%$) no estudo em jejum foram náusea (20%), cefaleia (17,5%), vômitos (4%) e diarreia (5%) e no estudo alimentado foram náusea (34%), cefaleia (17%). Não houve alterações significativas no pré-estudo e avaliação laboratorial pós-estudo em quaisquer voluntários.

CONCLUSÃO

As formulações teste e referência foram consideradas estatisticamente bioequivalentes em ambas as condições de administração podendo ser as mesmas intercambiáveis.

REFERÊNCIAS

- ALLGULANDER, C., HACKETT, D., SALINAS, E. Venlafaxine extended release (ER) in the treatment of generalized anxiety disorder: Twenty-four-week placebo-controlled dose-ranging study. *British Journal of Psychiatry*, v. 179, p.15–22, 2001.
- LIEBOWITZ MR, MANGANO RM, BRADWEJN J, ASNIS G. A randomized controlled trial of venlafaxine extended release in generalized social anxiety disorder. *Journal Clinical Psychiatry*, v.66, p.238–47, 2005.
- MONTGOMERY SA, ETNSUAH R, HACKETT D, KUNJ NR, RUDOLPH RL. Venlafaxine versus placebo in the preventive treatment of recurrent major depression. *Journal Clinical Psychiatry*, v.65, p.328–36, 2004.

Os fármacos moduladores do sistema renina-angiotensina poderiam ser relevantes para o tratamento da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*?

THAIANY Goulart de Souza e Silva^{1*}; LÍVIA de Figueiredo Diniz²; ANA Lia Mazzeti²; ANDREA Aparecida dos Santos Mendonça¹; REGGIANI Vilela Gonçalves³; RÔMULO Dias Novaes¹.

¹Departamento de Biologia Estrutural, Instituto de Ciência Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas; ²Departamento de Patologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, ³Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa.

*E-mail: thaiany300@gmail.com

RESUMO

Moléculas efetoras do Sistema Renina-Angiotensina (SRA), exercem ações imunomoduladoras sobre leucócitos, apresentam efeitos na patogênese da doença de Chagas, porém seu impacto na infecção pelo *Trypanosoma cruzi* ainda é pouco conhecido. Neste contexto, utilizamos uma revisão sistemática para integrar evidências pré-clínicas (*in vitro* e *in vivo*) e clínicas, para investigar a relevância de fármacos moduladores da angiotensina no tratamento de infecções por *T. cruzi*. A partir de uma busca estruturada e abrangente nos bancos de dados, apenas estudos originais foram analisados. Os fármacos captopril, enalapril e losartan, moduladores do SRA, foram usados nos estudos pré-clínicos e clínicos. Os principais achados *in vitro* indicam que esses fármacos aumentam a captação do parasito pela célula hospedeira, expressão de IL-12 por células dendríticas infectadas e atenuação da produção de IL-10 e IL-17 por linfócitos T CD8⁺. Nos estudos em modelos animais redução da parasitemia, do parasitismo tecidual, da infiltração de leucócitos e da mortalidade foram observados nos animais infectados pelo *T. cruzi* recebendo fármacos moduladores do SRA. Nos estudos clínicos, os fármacos exerceram um impacto controverso nos níveis de citocinas e hormônios, e um efeito limitado na função cardiovascular. A avaliação das evidências pré-clínicas e clínicas devem ser analisadas cuidadosamente, devido ao alto risco de viés encontrado na avaliação da qualidade metodológica desses estudos.

PALAVRAS-CHAVE: inibidores da angiotensina; doença de Chagas; parasitologia experimental e clínica; sistema renina-angiotensina.

Could the modulatory drugs of the renin-angiotensin system be relevant for the treatment of *Trypanosoma cruzi* infection?

ABSTRACT

Effector molecules of the Renin-Angiotensin System (RAS), which exert immunomodulatory actions on leukocytes, have effects on the pathogenesis of Chagas disease, but their impact on *Trypanosoma cruzi* infection is still poorly understood. In this context, we used a systematic review to integrate pre-clinical (*in vitro* and *in vivo*) and clinical evidence to investigate the relevance of angiotensin-modulating drugs in the treatment of *T. cruzi* infections. From a structured and comprehensive search in the databases, only original studies were analyzed. The RAS modulating drugs captopril, enalapril and losartan were used in preclinical and clinical studies. The major *in vitro* findings indicate that these drugs increase parasite uptake by the host cell, expression of IL-12 by infected dendritic cells, and attenuation of IL-10 and IL-17 production by CD8⁺ T lymphocytes. In the animal studies, parasitemia reduction, tissue parasitism, leukocyte infiltration and mortality were observed in the *T. cruzi* infected animals receiving modulating SAR drugs. In clinical studies, the drugs had a controversial impact on cytokine and hormone levels, and a limited effect on cardiovascular function. The evaluation of preclinical and clinical evidence should be carefully analyzed because of the high risk of bias encountered in assessing the methodological quality of these studies.

KEYWORDS: angiotensin inhibitors; Chagas disease; experimental and clinical parasitology; renin-angiotensin system.

INTRODUÇÃO

A Doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é uma infecção tropical negligenciada que acomete cerca de 6-7 milhões de pessoas no mundo, sobretudo nos países da América Latina (Lara et al., 2018; Ribeiro et al., 2018; WHO, 2018). A infecção pelo *T. cruzi* é uma zoonose em áreas endêmicas e exibe aumento na incidência e prevalência em áreas não endêmicas, especialmente na América do Norte, Europa, Ásia e África (Angheben et al., 2015; Noireau et al., 2009). Na ausência do inseto vetor, a propagação da doença de Chagas em países não endêmicos, geralmente ocorre devido à migração de pessoas infectadas de países endêmicos, transfusão sanguínea, transplante de órgãos infectados e transmissão vertical (Rassi et al., 2009).

As manifestações clínicas da doença de Chagas na fase aguda são inespecíficas, podendo apresentar febre, vômito, letargia e anorexia (Malik et al., 2015; Pinto et al., 2008). Cerca de 60-70% dos indivíduos infectados permanecem assintomáticos durante anos de infecção (Fresno e

Girones, 2018), contudo, 30% das pessoas infectadas podem apresentar anormalidades anatômicas e funcionais cardíacas e/ou digestivas na fase crônica (Rassi et al., 2012). Embora a patogênese não seja completamente compreendida, a Cardiomiopatia chagásica é a manifestação clínica mais séria e frequente da fase crônica sintomática e está associada à altas taxas de morbidade e mortalidade (Medei et al., 2008; Biolo et al., 2010).

O tratamento da doença de Chagas é baseado nos fármacos nitroheterocíclicos benznidazol e nifurtimox, os quais são mais efetivos na infecção aguda, com taxas de cura de 50-60% (Nogueira et al., 2018). Entretanto, ambos induzem toxicidade sistêmica, baixa efetividade nas infecções crônicas (taxa de cura de 0 a 30%), efeitos colaterais o qual está relacionado à altas taxas de descontinuação do tratamento (14,5-75%) (Gulin et al., 2018; Pérez-Molina et al., 2013; Rassi et al., 2017).

Nesse sentido, é necessário e urgente investigar alvos moleculares úteis no desenvolvimento de novos fármacos tripanocidas. Além de estarem envolvidas na patogênese da doença de Chagas, moléculas efetoras do Sistema Renina-Angiotensina (SRA) estão envolvidas na patogênese da doença de Chagas (Botoni et al., 2007; Teixeira et al., 2011). A quimioterapia baseada em fármacos moduladores do SRA, tais como enalapril, captopril e losartan, podem alterar a parasitemia e mortalidade de camundongos infectados pelo *T. cruzi*, por meio da modulação das moléculas angiotensina II (Ang II) e angiotensina 1-7 (Ang 1-7) (Leon et al., 2003; de Paula Costa et al., 2010; Botoni et al., 2013; Penitente et al., 2015). A resposta imune é a principal linha de defesa contra o parasito, e o potencial efeito antiparasitário de fármacos moduladores do SRA parece ser dependente do efeito de moléculas do SRA em células do sistema imune inato e adaptativo (de Paula Costa et al., 2010; Santos et al., 2010). Leucócitos como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas, mastócitos e linfócitos T, expressam diversas moléculas do SRA, tais como renina, angiotensinogênio, enzima conversora de angiotensina (ECA), angiotensina II e receptores de angiotensina (Costerousse et al., 1993; Reilly et al., 1982; Resende e Mill, 2002).

As evidências disponíveis sobre o impacto de fármacos moduladores dessas moléculas do SRA sobre a evolução da infecção pelo *T. cruzi* ainda é pouco compreendido. Assim, por meio de uma revisão sistemática, este estudo integrou evidências pré-clínicas (*in vitro* e *in vivo*) e dados clínicos, para investigar o potencial efeito antiparasitário e imunomodulador de fármacos moduladores da angiotensina no tratamento de infecções pelo *T. cruzi*.

MATERIAL E MÉTODOS

A revisão foi realizada baseada na diretriz PRISMA (Moher et al., 2009), e duas estratégias de busca de artigos relevantes foram adotadas: (i) uma primeira busca nos bancos de dados eletrônicos, e (ii) uma busca secundária da lista de referência de todos os estudos identificados na busca primária (Pereira et al., 2017). Na busca primária foram usados os bancos

de dados Pubmed/Medline, Web of Science e Scopus. Os filtros desenvolvidos para a busca primária foram estruturados nos níveis: (i) modelo doença: Tripanossomíase americana (doença de Chagas) e (ii) estratégia farmacológica/alvo biológico: fármacos moduladores do SRA. Nenhum limite cronológico ou de idioma foi aplicado na busca primária, e todos os artigos completos publicados até dezembro de 2018 foram incluídos na revisão sistemática.

Todos os estudos identificados na busca primária e secundária, foram analisados quanto ao título, resumo, e dados da publicação (jornal, volume, número, página e ano). O critério de inclusão adotado foi: estudos originais pré-clínicos e clínicos avaliando o impacto dos fármacos moduladores do SRA na infecção pelo *T. cruzi*. Os critérios de exclusão foram: artigos sem texto completo disponível, estudos secundários (revisões de literatura, comentários, cartas ao editor e editoriais), estudos não revisados por pares, estudos com múltiplas intervenções em que o efeito de fármacos moduladores do SRA não pode ser isolado (Pereira et al., 2017).

Nos estudos pré-clínicos foram extraídos dados a respeito das características dos modelos animais (espécies, linhagens, sexo e idade), cepa do parasito, inóculo (tamanho e via de administração), duração da infecção, desfechos primários (parasitemia, carga parasitária, mortalidade) e desfechos secundários (dados histopatológicos, imunológicos, marcadores neuroendócrino). Nos estudos clínicos, foram extraídos dados de: características da população (país, idade, sexo), características da doença (método de diagnóstico, tempo de infecção, fase da doença – aguda ou crônica), forma da doença (cardíaca, digestiva ou indeterminada), desfechos primários (mortalidade, função cardíaca), e desfechos secundários (marcadores neuroendócrinos).

A qualidade dos estudos pré-clínicos foram avaliados utilizando a ferramenta ARRIVE, um instrumento que fornece uma análise completa de todas as seções do artigo, considerando elementos essenciais que devem ser relatados em estudos sobre tripanossomíase humana (Pereira et al., 2017; Mcgrath e Lilley, 2015). O risco de viés em estudos pré-clínicos *in vivo* foi avaliado por meio da ferramenta SYRCLE's (Hooijmans et al., 2014). Os estudos clínicos foram avaliados quanto a qualidade e o potencial risco de viés, utilizando a ferramenta Downs and Black Measuring Quality (Downs and Black, 1998; Nogueira et al., 2018; Simic et al., 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos estudos pré-clínicos e clínicos, captopril, enalapril e losartan foram os fármacos usados como moduladores do SRA. As linhagens celulares usadas nos ensaios *in vitro* foram heterogêneas (monócitos, células dendríticas, linfócitos T, células endoteliais da veia umbilical humana e células do ovário de hamster chinês), assim como o tamanho do inóculo de parasitos e o tempo de infecção (3 h à 10 dias). Essa heterogeneidade limita a comparação entre esses estudos, e para uma abordagem imparcial requer uma análise individual da relação entre modelos experimentais e resultados biológicos. Mesmo que qualquer célula de mamífero nucleada possa ser parasitada por *T. cruzi* (Brener, 1973; Fernandes e Andrews, 2012), os modelos pré-clínicos

in vitro devem considerar se as linhagens celulares são relevantes para a fisiopatologia da doença de Chagas. Assim, a aplicação de células de ovário de hamster chinês e células endoteliais da veia umbilical primária humana estabelecidas por Scharfstein et al. (2000), apresenta resultados diferentes dos modelos sugeridos para o entendimento de alvos primários ou mecanismos efetores associados ao desenvolvimento de infecções por *T. cruzi*. Entretanto, o uso de monócitos, células dendríticas e linfócitos T como células hospedeiras (Santos et al., 2010; Monteiro et al., 2006), são importantes modelos *in vitro* para a interação direta do *T. cruzi* com células efectoras diretamente envolvidas no controle imunológico da sobrevivência e replicação do parasito (Ferraz et al., 2009; Da costa et al., 2014; Cardillo et al., 2015). O enalapril, um inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), foi analisado o potencial efeito citotóxico direto sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*. Foi observado um efeito antiparasitário dose-dependente, porém a abordagem do mecanismo não foi apresentado neste estudo. Apesar da heterogeneidade experimental, os principais achados dos estudos *in vitro*, indicam que os inibidores da ECA podem modular a interação patógeno-hospedeiro. Neste sentido captopril aumentou a captação do parasito pelas células hospedeiras (Scharfstein et al., 2000; Santos et al., 2010), a expressão de IL-12 pelas células dendríticas infectadas e IFN- γ pelos linfócitos T (Monteiro et al., 2006). Além disso, os estudos mostram que há uma atenuação da produção de IL-10 e IL-17 por células T CD8⁺ (Santos et al., 2010). Embora não seja conhecido nenhum outro estudo sobre os inibidores da ECA e *T. cruzi*, foram indicadas as propriedades imunomoduladoras do captopril, a partir da supressão da síntese de TNF- α e IL-1 α em células mononucleares desafiadas com LPS (Schindler et al., 1995; Peeters et al., 1998).

Nos modelos pré-clínicos *in vivo* todos os estudos utilizaram animais isogênicos, a maioria machos (n=4, 80%), de 4 a 10 semanas. As cepas de *T. cruzi* usadas para infecção foram heterogêneas, assim como o tamanho do inóculo, que variou de 50 a 10.000 parasitos por animal, sem uma relação direta com a massa corporal. Apenas enalapril, captopril e losartan foram usados, com doses de 15 a 25 mg/kg/dia. Muitos estudos indicaram que os fármacos moduladores do SRA foram efetivos em reduzir a parasitemia, fibrose e parasitismo tecidual, infiltração de leucócitos e mortalidade em animais infectados pelo *T. cruzi*. Esses efeitos foram parcialmente atribuídos às propriedades imunomoduladoras dos fármacos testados, os quais são principalmente associados com a redução dos níveis de TNF- α , IFN- γ , CCL2/MCP1 e CCL5/RANTES (de Paula Costa et al., 2010; Leite et al., 2017). Como todos os estudos apresentaram uma abordagem imunológica limitada, é difícil determinar até que ponto os efeitos protetores relatados foram resultados das adaptações imunológicas induzidas pelo captopril, enalapril e losartan.

As evidências disponíveis do efeito dos fármacos moduladores do SRA em pacientes com doença de Chagas são baseadas em casos clínicos, visto que nenhum ensaio clínico controlado randomizado foi identificado. Ao contrário dos estudos *in vitro* e *in vivo* os fármacos não foram

usados com finalidade antiparasitária, mas sim para melhorar a função cardiovascular em pacientes com Cardiomiopatia Chagásica Crônica (CCC).

Similar aos estudos em modelo animal, apenas captopril, enalapril e losartan foram analisados nas investigações clínicas. A indicação desses fármacos foi consistente com as diretrizes para o tratamento da cardiopatia chagásica, as quais recomendam administração de inibidores da ECA em todos pacientes com disfunção ventricular (Andrade et al., 2011). Todos os estudos determinaram a gravidade da CCC de acordo com a classificação estabelecida pela New York Heart Association (NYHA). O período de tratamento foi heterogêneo (4-120 dias), com doses de 5-150 mg/dia, e no geral o tratamento de pacientes Chagásicos com captopril, enalapril e losartan exerceram efeitos limitados na frequência cardíaca, pressão sanguínea, fração de ejeção, dimensões atriais e ventriculares e frequência de taquicardia ventricular. Apenas um estudo avaliou marcadores imunológicos (Botoni et al., 2007), o qual indicou que os fármacos moduladores do SRA foram efetivos em reduzir os níveis de RANTES, mas sem afetar MIP-1 α . Além disso, o tratamento foi efetivo em reduzir os níveis de norepinefrina (Roberti et al., 1992) e peptídeo natriurético cerebral (PNC) (Botoni et al., 2007), porém sem impacto nos níveis de renina. Além de exercer um importante papel regulador da função cardiovascular, essas moléculas são relevantes marcadores de lesão cardíaca na doença de Chagas. Assim, altos níveis circulantes de PNC é frequentemente detectado em pacientes com CCC (Talvani et al., 2004; Garcia-Alvarez et al., 2010), e níveis elevados de norepinefrina vem sendo associado a um mau prognóstico em pacientes Chagásicos, um aspecto potencialmente relacionado com sobrecarga hemodinâmica e risco elevado de falha cardíaca (Kao et al., 1989; Roberti et al., 1992).

Embora nosso grupo de revisão sistemática analise criticamente as evidências pré-clínicas e clínicas sobre o efeito da modulação do SRA em infecções por *T. cruzi*, a interpretação dos resultados deve considerar limitações específicas de cada desenho de estudo. Uma alta proporção de critérios essenciais relatados em estudos com animais foram negligenciados. Em geral, as principais fontes de viés foram associadas à alocação, avaliação de desfechos aleatórios, ocultação de alocação e cegamento experimental. Tais informações quando não relatadas, limitam a reprodutibilidade e a confiabilidade dos resultados pré-clínicos, indicando uma limitada validade interna e externa dos estudos individuais. Os estudos clínicos apresentaram uma melhor qualidade do que estudos em modelos animais. No entanto, a ausência de estudos controlados randomizados e todas as limitações metodológicas observadas, indicam que as evidências clínicas aqui descritas, devem ser cuidadosamente interpretadas.

CONCLUSÃO

Embora haja uma base clara para o uso de fármacos moduladores do SRA como agentes imunomoduladores, a relevância desses fármacos como terapia antiparasitária ou estratégia de suporte cardiovascular em pacientes com CCC requer mais estudos controlados com uma

abordagem mecanicista. Como procedimento simples para melhorar a qualidade da pesquisa, requerimentos metodológicos essenciais podem ser incorporados nos estudos pré-clínicos e clínicos. Neste sentido, estudos pré-clínicos com maior qualidade podem ser desenvolvidos a partir do uso de diretrizes bem delimitadas, incluindo aqueles fornecidos pela CAMARADE (Collaborative Approach to Meta-Analysis and Review of Animal Data from Experimental Studies – <http://camarades.info>), e SYRCLE (Systematic Review Centre for Laboratory animal Experimentation – <http://www.SYRCLE.nl>).

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, J.P. et al. I Latin American Guideline for the diagnosis and treatment of Chagas' heart disease: executive summary. **Brazilian Cardiology Archives**, v. 96, n. 6, p. 434–442, 2011.
- ANGHEBEN, A. et al. Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries. **Blood transfusion**, v.13, n. 4, p. 540-550, 2015.
- BIOLO, A.; RIBEIRO, A.L.; CLAUSELL, N. Chagas cardiomyopathy-where do we stand after a hundred years? *Progress in Cardiovascular Disease*. **Elsevier**, v. 52, n. 4, p.300-316, 2010
- BOTONI, A. et al. A randomized trial of carvedilol after renin-angiotensin system inhibition in chronic Chagas cardiomyopathy. **American Heart Journal**, v.153, n. 4, p.1–8, 2007.
- BOTONI, F.A. et al. Treatment of Chagas cardiomyopathy. **BioMed Research International**, v.1, p. 1–9, 2013.
- BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma Cruzi*. **Annual Review of Microbiology**, v.27, p.347-382, 1973.
- CARDILLO, F. et al. Immunity and immune modulation in *Trypanosoma cruzi* infection. **Pathogens and Disease**, v. 73, n. 9, p. 1-18, 2015.
- COSTEROUSSSE, O. Angiotensin I-converting enzyme in human circulating mononuclear cells: genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes. **The Biochem Journal**, v. 290, n. 1, 33–40, 1993.
- DA COSTA, T.A. et al. Immunomodulation by *Trypanosoma cruzi*: toward understanding the association of dendritic cells with infecting TcI and TcII populations. **Journal of Immunology Research**, v. 1, p. 1–12, 2014.
- DE PAULA COSTA, C.G. et al. Enalapril prevents cardiac immune-mediated damage and exerts anti-*Trypanosoma cruzi* activity during acute phase of experimental Chagas disease. **Parasite Immunology**, v. 32, n.3, p. 202–208, 2010.
- DOWNS, S.H.; BLACK, N. The feasibility of creating a checklist for the assessment of the methodological quality both of randomised and nonrandomized studies of health care interventions. **Journal of Epidemiol and Community Health**, v. 52, n. 6, p. 377–384, 1998.
- FERNANDES, M.C.; ANDREWS, N.W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n.3, p. 734–747, 2012.
- FERRAZ, M.I. et al. Absence of CD4 + T lymphocytes, CD8 + T lymphocytes, or B lymphocytes has different effects on the efficacy of posaconazole and benznidazole in treatment of

experimental acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 53, p. 174–179, 2009.

FRESNO, M.; GIRONES, N. Regulatory lymphoid and myeloid cells determine the cardiac immunopathogenesis of *Trypanosoma cruzi* infection. **Frontiers in Microbiology** v. 9, p. 1–10, 2018.

GARCIA-ALVAREZ, A. et al. Chagas cardiomyopathy: The potential of diastolic dysfunction and brain natriuretic peptide in the early identification of cardiac damage. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 9, e-826, 2010.

GULIN, J.E.N. et al. Molecular and biological characterization of a highly pathogenic *Trypanosoma cruzi* strain isolated from a patient with congenital infection. **Experimental Parasitology** v. 186, p. 50–58, 2018.

HOOIJMANS, C.R. et al. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. **BMC Medical Research Methodology** v. 14, p. 1–9, 2014.

KAO, W.; GHEORGHIAD, M.; HALL, V.; GOLDSTEIN, S. Relation between plasma norepinephrine and response to medical therapy in men with congestive heart failure secondary to coronary artery disease or idiopathic dilated cardiomyopathy. **The American Journal of Cardiology**, v. 64, p. 609–613, 1989.

LARA, L.S. et al. *Trypanosoma cruzi* infection of human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes: an in vitro model for drug screening for Chagas disease. **Microbes and Infection**, v. 18, n. 5, p. 1–12, 2018.

LAWRENCE, T. The nuclear factor NF-kappa B pathway in inflammation. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v.1, n.6, p. 1–10, 2009.

LEITE, A.I.J. et al. The immunomodulatory effects of the enalapril in combination with benznidazole during acute and chronic phases of the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 174, 136–145, 2017.

LEON, J.S.; WANG, K.; ENGMAN, D.M. Captopril ameliorates myocarditis in acute experimental Chagas disease. **Circulation**, v. 107, 2264–2269, 2003.

MALIK, L.H.; SINGH, G.D.; AMSTERDAM, E.A. The epidemiology, clinical manifestations, and management of Chagas heart disease. **Clinical Cardiology**, v. 38, 565–569, 2015.

MCGRATH, D.; TARLETON, R. Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunological Reviews**, v. 201, 304–317, 2004.

MEDEI, E.H. et al. Role of autoantibodies in the physiopathology of Chagas' disease. **Brazilian Cardiology Archives**, v. 91, p. 1–10, 2008.

MONTEIRO, A.C. et al. Cooperative activation of TLR2 and bradykinin B2 receptor is required for induction of type 1 immunity in a mouse model of subcutaneous infection by *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Immunology**, v. 177, p. 6325–6335, 2006.

NOGUEIRA, S.S. et al. Challenges of immunosuppressive and antitrypanosomal drug therapy after heart transplantation in patients with chronic Chagas disease: a systematic review of clinical recommendations. **Transplantation Reviews**, v. 32, p.157–167, 2018.

NOIREAU, F.; DIOSQUE, P.; JANSEN, A.M. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. **Veterinary Research**, v. 40, p. 26, 2009.

PEETERS, A.C. et al. The effect of renin-angiotensin system inhibitors on pro-and anti-inflammatory cytokine production. **Immunology**, v. 94, p. 376–379, 1998.

PENITENTE, A.R. et al. Enalapril in combination with Benznidazole reduces cardiac inflammation and creatine kinases in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, p. 976–982, 2015.

PEREIRA, R.M. et al. Applicability of plant-based products in the treatment of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei* infections: a systematic review of preclinical in vivo evidence. **Parasitology**, v. 144, p. 1275–1287, 2017.

PÉREZ-MOLINA, J.A. et al. Nifurtimox therapy for Chagas disease does not cause hypersensitivity reactions in patients with such previous adverse reactions during Benznidazole treatment. **Acta Tropica**, v. 127, p. 101–104, 2013.

PINTO, A.Y.N. Acute phase of Chagas disease in the Brazilian Amazon: study of 233 cases of Pará, Amapá and Maranhão observed between 1988 and 2005. **Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine**, v. 41, p. 602–614, 2008.

RASSI Jr, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. **Memories of the Oswaldo Cruz Institute**, v. 104, p. 152–158, 2009.

RASSI Jr, A.; RASSI, A.; REZENDE, J.M. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, p. 275–291, 2012.

RASSI Jr.; MARIN-NETO, J.A.; RASSI, A. Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial. **Memories of the Oswaldo Cruz Institute**, v. 112, p.224–235, 2017.

REILLY, C.F. et al. Rapid conversion of angiotensin I to angiotensin II by neutrophil and mast cell proteinases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 257, p. 8619–8622, 1982.

RESENDE, M.M.; MILL, J.G. Alternative routes of angiotensin II production and their importance under physiological or pathophysiological conditions. **Brazilian Cardiology Archives**, v. 78, p. 425–431, 2002.

RIBEIRO, A.L.P. Functional capacity in Chagas disease. **Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine**, v. 51, P. 413–414, 2018.

ROBERTI, R.R. et al. Chagas cardiomyopathy and captopril. **European Heart Journal**, v. 13, p. 966–970, 1992.

SANTOS, J.S.C. et al. Captopril increases the intensity of monocyte infection by *Trypanosoma cruzi* and induces human T helper type 17 cells. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 162, p. 528–536, 2010.

SCHAFSTEIN, J. et al. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, p.1289–1300, 2000.

SCHINDLER, R.; DINARELLO, C.A.; KOCH, K.M. Angiotensin-converting enzyme inhibitors suppress synthesis of tumor necrosis factor and interleukin 1 by human peripheral blood mononuclear cells. **Cytokine**, v. 7, p. 526–533, 1995.

SIMIC, M. et al. Gait modification strategies for altering medial knee joint load: a systematic review. **Arthritis Care and Research**, v. 63, p. 1–22, 2011.

TALVANI, A. et al. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor- α in Chagasic cardiomyopathy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p. 943–950, 2004.

TEIXEIRA, A.R. et al. Pathogenesis of Chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, p. 592–630, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease (American trypanosomiasis). WHO Technical Report Series. Geneva, Switzerland. **World Health Organization**, 2018.

Estudo *in vitro* do potencial osteogênico de membrana porosa de polímero PCL para a regeneração óssea guiada

Suelen Simões Amaral^{1*}; Idália Aparecida Waltrick de Brito Siqueira²; Eliandra de Sousa Trichês²; Luana Marotta Reis de Vasconcellos¹

¹Universidade Estadual Paulista – Unesp, Campus de São José dos Campos/ Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, Biopatologia Bucal,

²Universidade Federal de São Paulo – Unifesp, Unidade Talim/ Laboratório de Biocerâmicas, Biomateriais)

e-mail: suelensimoes@live.com

RESUMO

Atualmente estudos envolvendo biomateriais estão em crescimento, com destaque na área médica e odontológica. Utilizados por exemplo, na presença de defeito ósseo e lesões periapicais. Assim, verificou-se o comportamento *in vitro* de osteoblastos MG63 em contato com membranas reabsorvíveis porosas de policaprolactona (PCL), incorporadas com fibras cerâmicas de silicato de cálcio (CaSiO₃), visando aplicação na regeneração óssea guiada. Foram utilizados os seguintes grupos, PCL P - porosa sem adição de CaSiO₃; PCL + 5%CaSiO₃; PCL + 10%CaSiO₃ e o grupo controle. Foram avaliadas a viabilidade celular, atividade da fosfatase alcalina e presença de nódulos de mineralização. Os dados foram analisados por ANOVA e Tukey (p<0.05). Nenhum grupo experimental foi citotóxico, PCL P e PCL 10% apresentaram maior viabilidade celular com diferença estatística do grupo PCL 5% (p<0.05), a presença de células viáveis em todos os grupos, sugere que íons de CaSiO₃ não têm efeito significativo sobre a proliferação celular. A atividade de ALP foi semelhante estatisticamente ao controle (p>0.05) no entanto, observou-se que todos os grupos exibiram maior atividade de ALP que o grupo controle, sugere-se que a incorporação de CaSiO₃ pode ter acelerado a fase de diferenciação celular. Em um período de 21 dias, houve a produção de nódulos mineralizados, indicando que as células MG63 foram capazes de aderir, proliferar e produzir nódulos mineralizados em membranas poliméricas. Conclui-se que as membranas de PCL incorporadas com CaSiO₃, não apresentam citotoxicidade celular, assim como, o biomaterial contribui com a osteogênese, demonstrando a capacidade de ser utilizado no tratamento de lesões periapicais.

PALAVRAS-CHAVE: Biomateriais; polímeros; osteogênese.

In vitro study of osteogenic potential of PCL polymer porous membrane for guided bone regeneration

ABSTRACT

Currently, studies involving biomaterials are growing, with emphasis in the medical and dental areas. Used for example, in the presence of bone defect and periapical lesions. Thus, it verified the in vitro behavior of MG63 osteoblasts in contact with polycaprolactone porous resorbable membranes (PCL), incorporated with calcium silicate ceramic fibers (CaSiO_3), for application in guided bone regeneration. The following groups were used, PCL P - porous without addition of CaSiO_3 ; PCL + 5% CaSiO_3 ; PCL + 10% CaSiO_3 and the control group. Cell viability, alkaline phosphatase activity and presence of mineralization nodules were evaluated. Data were analyzed by ANOVA and Tukey ($p < 0.05$). No experimental group was cytotoxic, PCL P and PCL 10% presented greater cell viability with a statistical difference of the PCL 5% group ($p < 0.05$), the presence of viable cells in all groups, suggests that CaSiO_3 ions have no significant effect on cell proliferation. The ALP activity was statistically similar to the control ($p > 0.05$); however, it was observed that all groups showed higher ALP activity than the control group, it is suggested that CaSiO_3 incorporation may have accelerated the cell differentiation phase. In a period of 21 days, there was the production of mineralized nodules, indicating that MG63 cells were able to adhere, proliferate and produce mineralized nodules in polymer membranes. It is concluded that the PCL membranes incorporated with CaSiO_3 do not present cellular cytotoxicity, as well as, the biomaterial contributes to the osteogenesis, demonstrating the capacity to be used in the treatment of periapical lesions.

KEYWORDS: Biomaterials; polymers; osteogenesis.

INTRODUÇÃO

Atualmente, pesquisas voltadas ao desenvolvimento de biomateriais estão em crescente evolução. A área de biomateriais é um campo com amplas perspectivas de crescimento futuro e apresenta uma diversidade de aplicações de interesse médico e odontológico. Particularmente na clínica odontológica, a utilização de biomateriais representa um potente instrumento terapêutico nas atividades cirúrgicas na presença de defeitos ósseos e lesões periapicais (CORDAS, 2006; BUGARIN, GARRAFA, 2007; SHEIKH *et al.*, 2015; FERNANDES *et al.*, 2017; SLADKOVA *et al.*, 2017).

O tecido ósseo é um tecido com alta capacidade de regeneração, assim, experimentos vêm sendo estimulados a serem estudados, utilizando a associação de diferentes biomateriais a diversas substâncias objetivando a reconstrução de defeitos ósseos (SICCA *et al.*, 2000; NACER,

2009; CHAI *et al.*, 2017). Esses defeitos são provenientes de patologias congênitas ou adquiridas, como infecções, traumatismos e vários outros fatores clínicos que podem influenciar a funcionalidade das áreas afetadas.

Os biomateriais são empregados em componentes implantados no corpo humano doente ou danificados. Polímeros, cerâmicas, metais podem ser usados como biomateriais (CALLISTER Jr, RETHWISCH, 2016).

Nos últimos anos, os polímeros biodegradáveis tais como a policaprolactona (*Poly ε – Caprolactone*, PCL) têm sido pesquisados para aplicações como matriz extracelular em bioimplantes. O PCL apresenta degradação mais lenta, sendo ideal para condições médicas que necessitam de um tempo prolongado para regeneração óssea (BEACHLEY, WEN, 2010). Porém, segundo Nair e Laurencin (2007) este polímero têm uma baixa resistência mecânica limitando a aplicação na medicina regenerativa óssea.

Para solucionar esta baixa resistência mecânica destes polímeros, sugere-se a incorporação de fibras de silicato de cálcio, as quais podem melhorar a resistência mecânica e a biocompatibilidade (CALLISTER Jr, 2008).

Atualmente, se faz necessário desenvolver novas técnicas de fabricação de biomateriais, como também, compreender através de um estudo mais detalhado as características de suas propriedades. Este trabalho teve por objetivo investigar o comportamento celular *in vitro* de membranas porosas de polímero PCL incorporadas com fibras de silicato de cálcio, se apresentam biocompatibilidade e capacidade osteocondutora, para que possam ser aplicados em eventos relacionados à regeneração óssea guiada em lesões periapicais.

METODOLOGIA

Para o teste de citotoxicidade, foram plaqueadas 20.000 células por poço (n=3 para cada grupo experimental) e incubadas em estufa com 5% CO₂ a 37°C por 24h. Após este período, as culturas celulares foram expostas aos grupos experimentais e mantidas em estufa por mais 24 h. O grupo controle foi determinado como sendo o poço com a presença de células e ausência das membranas poliméricas testadas. Assim, posteriormente ao período de 24h, realizou a remoção do conteúdo dos poços e a placa foi lavada três vezes com PBS estéril para descartar células mortas e resíduos. Após a lavagem, acrescentou 50 µL do reagente Alamar Blue (Thermo Scientific – EUA) a 10% em meio de cultura (DMEM) em cada poço e a placa foi levada a estufa por 4 h, sob temperatura de 37°C e 5% de CO₂. Durante este período, a resazurina azul não-fluorescente é reduzida a resofurin de cor rosa fluorescente. Posteriormente, foi realizada a leitura da absorbância dos poços em espectrofotômetro de microplacas (Cambrex Elx808cse - Lonza) com comprimento de onda de 570 nm. A viabilidade celular foi expressa como a porcentagem em relação ao grupo controle (=100%).

A atividade da fosfatase alcalina foi determinada após 14 dias (n=3 para cada grupo experimental), nos mesmos lisados utilizados para quantificar a proteína total, por meio da liberação de timolftaleína por hidrólise do substrato timolftaleína monofosfato, utilizando kit comercial de acordo com as instruções do fabricante (Labtest Diagnóstica). Inicialmente, 50 µL de timolftaleína monofosfato foram misturados com 0,5 mL de tampão dietanolamina a 0,3 M, pH 10,1. À solução foi acrescentada alíquota de 50 µL dos lisados obtidos de cada poço, permanecendo por 10 minutos à 37°C em banho-maria. Para o desenvolvimento de cor, foram adicionados 2 mL de Na₂CO₃ a 0,09 M e NaOH a 0,25 M. A absorbância foi mensurada em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 590 nm e a atividade da fosfatase alcalina avaliada seguindo os procedimentos dos cálculos preconizados na bula do kit comercial. Os dados obtidos foram expressos como atividade da fosfatase alcalina normalizada pelo conteúdo de proteína total e os valores apresentados em µmol de timolftaleína/h/µg de proteína/mL.

Para a formação de nódulos de mineralização as células foram colocadas em placas de 24 poços (n=3 para cada grupo experimental), foi realizado o plaqueamento de 20.000 células por poço e incubadas por 24 h a 37°C. Após esse período, o meio antigo foi removido e as culturas celulares foram expostas aos grupos experimentais. O grupo controle foi caracterizado como sendo o poço com a presença de células e ausência das membranas poliméricas testadas. As culturas celulares foram mantidas em estufa por 21 dias. As células aderidas foram lavadas em 1 mL de solução de Hank's (Sigma) a 37°C por duas vezes e as células foram fixadas em 2 mL de álcool 70% por 1 h a 4°C. Em seguida, o álcool foi retirado e os poços lavados com 1 mL PBS (Cultilab) por duas vezes. Posteriormente, o PBS foi retirado, a cultura celular lavada com 1 mL de água deionizada por duas vezes e corada com vermelho de Alizarina S 2% (Sigma), pH 4,2, por 15 min à temperatura ambiente. Depois disso, cada poço foi lavado várias vezes com intuito de retirar o excesso de corante e as placas deixadas por 24 h em temperatura ambiente para secagem total dos poços. Depois da secagem, os poços foram avaliados qualitativamente em relação à formação de nódulos de matriz mineralizada. Essa análise qualitativa foi baseada em avaliações macro e microscópicas das formações nodulares de matriz mineralizada, as quais foram fotografadas com câmera digital (Sony Digital F828, CyberShot, 8.0 megapixels) acoplada em microscópio de luz invertida (Microscópio Carl Zeiss Microimaging GmbH – Axiovert 40 C, Alemanha).

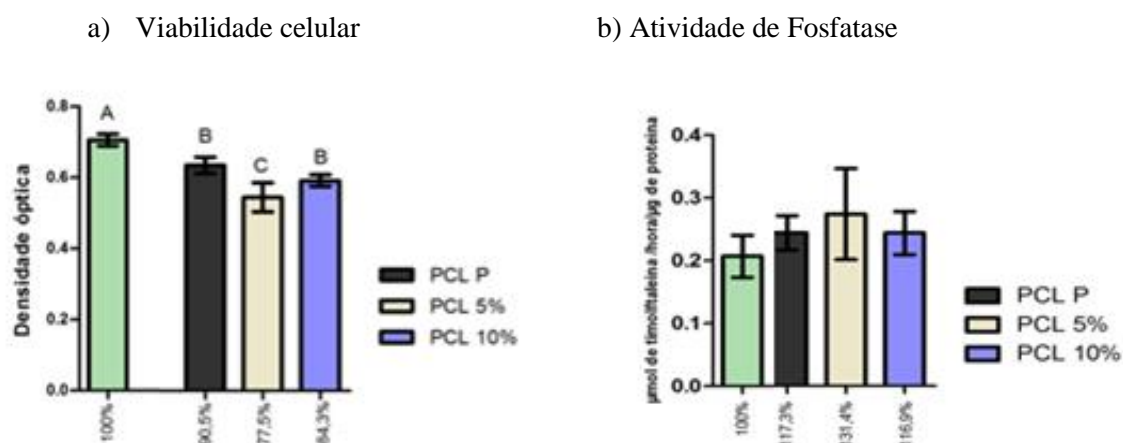
RESULTADO E DISCUSSÃO

Os valores obtidos de viabilidade celular pelos grupos experimentais (Figura 1a), foram menores e exibiram diferença estatisticamente significativa (p<0.05) quando comparados com o controle. O grupo PCL P apresentou maior viabilidade celular 90,5%, seguido do grupo PCL 10%

que resultou em 84,3% de viabilidade celular. Por outro lado, o grupo PCL 5% apresentou menor viabilidade celular, 77,5%, diferindo estatisticamente dos demais grupos ($p < 0.05$). Os resultados revelaram que os grupos experimentais são biocompatíveis *in vitro*, pois não apresentaram citotoxicidade, sugerindo que íons de silicato de cálcio não têm efeito significativo sobre a proliferação celular.

Um importante marcador para a diferenciação osteoblástica é a produção da enzima da fosfatase alcalina. O grupo PCL 5% apresentou maior atividade de fosfatase alcalina em relação ao PCL 10% e o PCL P. De acordo com os valores obtidos na análise da atividade da fosfatase alcalina, todos os grupos experimentais não apresentaram diferença significativa ($p > 0.05$) com relação ao grupo controle, como pode ser observado na (Figura 1b). Dziadek *et al.* (2014) avaliaram a atividade da fosfatase alcalina de osteoblasto em contato com materiais poliméricos de PCL, no período de 7 dias e concluíram que o efeito de partículas como íons de cálcio, silício e fosfato liberados pelos vidros bioativos presentes na matriz polimérica de PCL está relacionado com a intensificação da atividade da fosfatase alcalina. A partir do nosso estudo sugere-se que a incorporação de silicato de cálcio pode ter acelerado a fase de diferenciação celular, como também, a mineralização. Já que nos grupos experimentais aos 14 dias, observou-se que todos os grupos exibiram maior atividade de fosfatase que o grupo controle, porém sem diferença estatística ($p > 0.05$).

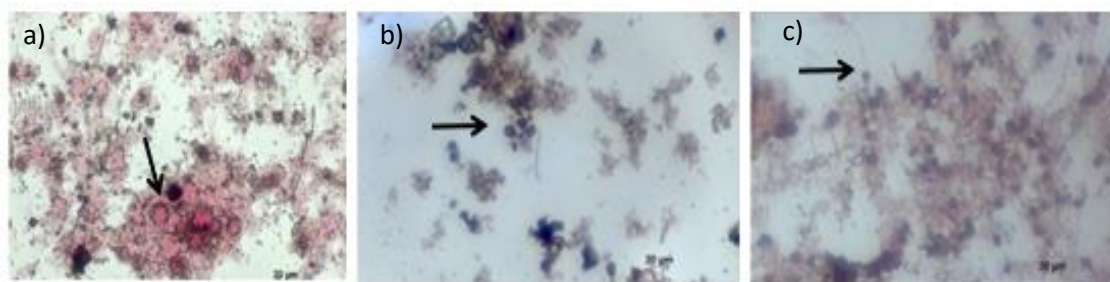
Figura 1. Análise *in vitro*. a) Viabilidade celular em célula osteoblástica MG63 pelo teste de Alamar Blue. b) Gráfico de ALP.



Legenda - Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais (ANOVA, teste de Tukey, $p < 0.05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 2 - Formações nodulares.



Legenda: a) PCL 5%, b) PCL 10% e c) PCL 15%.

Fonte: Do autor.

Pode-se observar, conforme a (Figura 2), que todos os grupos experimentais permitiram a formação de nódulos de mineralização. Uma vez que os grupos experimentais apresentaram quantidade de formação de nódulos semelhantes entre eles. Indicando que as células MG-63 foram capazes de aderir, proliferar e formar nódulos mineralizados em membranas poliméricas. Da mesma forma, que acredita-se que a alta atividade da fosfatase alcalina, pode estar relacionada com a incorporação de silicato de cálcio e assim favorecer a diferenciação celular, sugere-se que este fato ocorra também com o processo de mineralização. A mineralização é a fase final da diferenciação de osteoblastos, onde a matriz mineral constituída por hidroxiapatita é secretada e depositada por osteoblastos maduros (FAREA *et al.*, 2014).

CONCLUSÃO

Concluiu-se que experimentalmente que as membranas reabsorvíveis porosas de policaprolactona (PCL) incorporadas com fibras cerâmicas de silicato de cálcio quando submetidas a ensaios *in vitro* não apresentam citotoxicidade celular, assim como, verificou-se que o biomaterial contribui com a osteogênese.

REFERÊNCIA

BEACHLEY, VINCE; WEN, XUEJUN. Polymer nanofibrous structures: Fabrication, biofunctionalization, and cell interactions. **Progress In Polymer Science**, [s.l.], v. 35, n. 7, p.868-892, jul. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.03.003>.

BUGARIN JÚNIOR, JOÃO GERALDO; GARRAFA, VOLNEI. Bioética e biossegurança: uso de biomateriais na prática odontológica. **Revista de Saúde Pública**, [s.l.], v. 41, n. 2, p.223-228, abr. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0034-89102007000200008>.

CALLISTER W. D. **Ciência e Engenharia de materiais**: uma introdução. Trad. Sérgio Mutrilo Stamile Soares. 7. ed. 705 p. - Rio de Janeiro: LTC, 2008

CALLISTER W. D.; RETHWISCH D. G. **Ciência e Engenharia de materiais**: uma introdução. Trad. Sérgio Murilo Stamile Soares. 9. ed. - Rio de Janeiro: LTC, 2016

CHAI, YOKE CHIN et al. Harnessing the Osteogenicity of In Vitro Stem Cell-Derived Mineralized Extracellular Matrix as 3D Biotemplate to Guide Bone Regeneration. **Tissue Engineering Part A**, [s.l.], v. 23, n. 17-18, p.874-890, set. 2017. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/ten.tea.2016.0432>.

CORDAS, C. M. **Biomateriais**: utilização e controle em meios fisiológicos. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Revista Proformar. 2006; 13:11

DZIADEK, MICHAL et al. Effect of the preparation methods on architecture, crystallinity, hydrolytic degradation, bioactivity, and biocompatibility of PCL/bioglass composite scaffolds. **Journal Of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, [s.l.], v. 103, n. 8, p.1580-1593, 23 dez. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.b.33350>.

FAREA, MANAL et al. Synergistic effects of chitosan scaffold and TGF β 1 on the proliferation and osteogenic differentiation of dental pulp stem cells derived from human exfoliated deciduous teeth. **Archives Of Oral Biology**, [s.l.], v. 59, n. 12, p.1400-1411, dez. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.08.015>.

FERNANDES, JOÃO S. et al. Multifunctional bioactive glass and glass-ceramic biomaterials with antibacterial properties for repair and regeneration of bone tissue. **Acta Biomaterialia**, [s.l.], v. 59, p.2-11, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2017.06.046>.

NACER R.S. **Estudo do comportamento do polímero de mamona como material de substituição óssea em defeito diafisário no fêmur de ratos frente a alterações secundárias à associação de nanopartículas de sílica e zircônia**. Campo Grande Dissertação [Mestrado em saúde e desenvolvimento] - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul; 2009

NAIR, LAKSHMI S.; LAURENCIN, CATO T.. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress In Polymer Science**, [s.l.], v. 32, n. 8-9, p.762-798, ago. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017>.

SHEIKH, ZEESHAN; SIMA, CORNELIU; GLOGAUER, MICHAEL. Bone Replacement Materials and Techniques Used for Achieving Vertical Alveolar Bone Augmentation. **Materials**, [s.l.], v. 8, n. 6, p.2953-2993, 27 maio 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ma8062953>.

SICCA C. M.; OLIVEIRA R. C.; SILVA T. L.; CESTARI T. M.; OLIVEIRA D. T.; BUZALAF M. A. R.; TAGA R.; TAGA E.M.; GRANJEIRO J.M.; KINA J.R. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos. Efeito do tamanho da partícula. **Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru**. 2000 jan/jun; 8 (1/2): 1-10.

SLADKOVA, MARTINA et al. Engineering human bone grafts with new macroporous calcium phosphate cement scaffolds. **Journal Of Tissue Engineering And Regenerative Medicine**, [s.l.], v. 12, n. 3, p.715-726, 25 set. 2017. <http://dx.doi.org/10.1002/term.2491>.

RESUMOS SIMPLES

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE-UV para quantificação de alopurinol

Homero de oliveira Junior, Thúlio Wliandon Lemos Barbosa, Lilian Pereira Franco, Magali Benjamim de Araújo, Rudy Bonfilio.

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).

Email: homero2@hotmail.com

O alopurinol é um inibidor de xantina oxidase utilizado no tratamento de gota. Ele apresenta baixa solubilidade em água e solventes orgânicos, sendo somente solúvel em sistemas aquosos ácido-base. Um método adequadamente desenvolvido e validado é necessário para identificar e quantificar um fármaco, e fornece uma importante ferramenta no controle de qualidade de medicamentos. O objetivo desse projeto foi desenvolver e validar um método para quantificação de alopurinol em matérias-primas e comprimidos. Utilizou-se CLAE-UV para tal estudo e a RDC 166/2017 como órgão regulador para os parâmetros analisados (seletividade, linearidade, efeito matriz, precisão, exatidão, limite de quantificação, limite de detecção e robustez). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software BioEstat 5.0. As condições otimizadas foram: tampão fosfato pH 5,25, força iônica (FI) 0,1 mol. L⁻¹ como solvente; fase móvel constituída de tampão fosfato (pH 5,25 e força iônica 0,1): metanol (95:5, v/v); coluna C18, 150 mm x 4,6 mm, 5 µm; temperatura de 25 °C; fluxo de 1 mL. min⁻¹ e injeção de 20 µL. O estudo foi realizado em dois comprimentos de onda: 230 nm e 250 nm de acordo com o espectro de varredura do alopurinol. O método demonstrou-se linear nas concentrações 8, 12, 16, 20 e 24 µg.mL⁻¹, em 250 nm, além de apresentar maior coeficiente angular a partir da equação da reta ($y = 69862x + 22764$) do que em 230 nm ($y = 45872x + 8599,2$). O método mostrou-se seletivo e exato em ambos os comprimentos de onda. Além disso, não foram observados efeitos de matriz em 230 nm ou 250 nm, sendo que os valores de LD e LQ para 230 nm foram 1,62 µg.mL⁻¹ e 4,91 µg.mL⁻¹, respectivamente, e para 250 nm foram 0,70 µg.mL⁻¹ e 2,12 µg.mL⁻¹, respectivamente. O método demonstrou-se preciso em 250 nm, sendo que, no ensaio de precisão intermediária as amostras se mostraram estatisticamente diferentes na concentração baixa de 4 µg.mL⁻¹ para 230 nm com adição de placebo. No ensaio de robustez foram realizados estudos de alterações de parâmetros como tempo de extração, pH da fase móvel e colunas de marcas diferentes com mesmas especificações. O estudo a partir da análise de *t de student* demonstrou que o método não é robusto em pH fora da faixa de 5,25, portanto, é necessário controlar o pH da fase móvel para uma análise adequada. Concluímos que um método adequado e validado é importante para conseguir um bom resultado ao objetivo do método utilizado.

Palavras-chave: Alopurinol; Métodos analíticos; Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; Validação Analítica; RDC 166/2017.

Auxílio financeiro: CNPq.

Avaliação do perfil histológico em modelo experimental da paracoccidioidomicose no tratamento com itraconazol combinado com laserterapia de baixa potência

J.C. Grisolia¹, L.A. Santos¹, A.M. de Oliveira², L.C.C Malaquias¹, L.M.C. Verinaud³, Z.P. Camargo⁴, E. Burger¹.

1 Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), Alfenas, MG, Brasil

2 Laboratório de Patologia, Hospital Universitário Alzira Vellano, Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Alfenas, MG, Brasil

3 Department de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

4 Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP-SP), São Paulo, SP, *Brasil*.

A paracoccidioidomicose (PCM) é a micose sistêmica mais prevalente na América Latina, causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), requer tratamento longo e complicado, justificando estudos que ampliem as opções terapêuticas. O Itraconazol (Itra) é eficaz para a PCM e requer terapia mais curta que outras drogas. Propomos a administração simultânea de Itraconazol (Itra) e Terapia Laser de Baixa Potência (LLLT) para melhor controle dos estágios iniciais da PCM experimental. Obtivemos uma população celular muito rica em neutrófilos (PMN) inoculando Pb em bolsas de ar subcutânea em camundongos, e avaliamos o efeito de Itra e/ou LLLT em seu tamanho, composição e arquitetura de tecidos e intensidade de inflamação analisando vasos, neovas, números de fibroblastos, fibrócitos e de fungos. A viabilidade das células da bolsa de ar foi sempre superior a 70%, portanto, nenhum dos tratamentos teve efeitos adversos, e cerca de 80% das células eram PMN. Analisando a ‘air pouch’ em termos de volume, peso e diâmetro, observamos diferenças significativas entre os grupos tratados com diferentes doses de Itra e também quando este tratamento foi associado à LLLT. A mais alta dose de Itra (50 mg/mL) resultou em redução significativa da ‘air pouch’. Lesões de camundongos infectados não tratados tinham estroma mal definido, parênquima desorganizado, grandes áreas de inflamação consistindo de PMN e fibrose com necrose coagulativa e liquefativa. Animais infectados e tratados com LLLT mostraram padrões semelhantes, exceto para a necrose coagulativa. Camundongos tratados com Itra (independente da dose) e LLLT apresentaram parênquima discretamente desorganizado, com algumas áreas de inflamação, fibrose e necrose liquefativa. As áreas de lesão foram menores no grupo LLLT. A intensidade do processo inflamatório e o número de vasos e neovas diminuíram quando a concentração de Itra em combinação com LLLT aumentou. Itra a 3 e 10 mg/mL associada a LLLT aumentou o número de fibroblastos e fibrócitos. Números de Pb diminuíram significativamente quando Itra foi administrada em todas as concentrações, e quando usado em combinação com LLLT. Itra a 50 mg/mL causou uma redução significativa no tamanho da ‘air pouch’, indicando um controle dose-resposta. Portanto, nossos resultados sugerem fortemente que a eficiência da Itra é aprimorada pela LLLT.

Auxílio financeiro: CNPq 305216/2016-3 and FAPEMIG APQ 012941-16. Grisolia, JC and Santos, LA are recipient of CAPES scholarship.

Influência do tratamento antifúngico e antiinflamatório na resposta granulomatosa da paracoccidiodomicose na fase inicial da doença.

Lauana Aparecida Santos¹, Julianne Caravita Grisolia¹, Luiz Cosme Cotta Malaquias¹, Adriano Macedo de Oliveira², Liana Maria Cardoso Verinaud³, Zoilo Pires de Camargo⁴, Eva Burger¹.

1 Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), Alfenas, MG, Brasil

2 Laboratório de Patologia, Hospital Universitário Alzira Vellano, Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Alfenas, MG, Brasil

3 Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil.

4 Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, SP, Brasil.

E-mail: lauanasantos20@gmail.com

O fungo termo-dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* é agente etiológico da paracoccidiodomicose. Micose sistêmica granulomatosa de maior prevalência no Brasil que quando estabelecida o tratamento é longo. Portanto, é relevante os estudos dos mecanismos patológicos e o quanto o tratamento influencia no combate deste fungo. Neste trabalho os animais foram infectados via intraperitoneal com a cepa virulenta de *P. brasiliensis* (Pb18) e após três dias de infecção iniciou-se o tratamento por gavagem nos grupos com itraconazol (3mg/mL), celecoxib (6mg/mL) e combinação de itraconazol (3mg/mL)/celecoxib (6mg/mL) por 15 dias diariamente. Após, os animais foram pesados, realizado o teste de hipersensibilidade do tipo tardio com paracoccidiodina e coletados sangue total para a obtenção de soro com 7 e 15 dias de infecção. No último dia de infecção os animais foram sacrificados e coletados baço, pulmão, fígado e epíplon/pâncreas. Os órgãos foram pesados, medidos, macerados, processados e corados com H/E para histologia geral, realização de unidades formadoras de colônias (CFU) e dosagem de óxido nítrico. Os resultados de hipersensibilidade mostraram que os animais tratados com itraconazol (3mg/mL)/celecoxib (6mg/mL) tiveram menor reatividade e no ensaio de ELISA tiveram menores títulos de anticorpos anti-IgG quando comparado com o grupo infectado não tratado. O peso corporal não teve diferença estatística. O baço e epíplon tiveram menor peso e o pulmão menor volume no grupo tratado com itraconazol (3mg/mL)/celecoxib (6mg/mL). O diâmetro dos órgãos não teve diferença estatística. O número de CFU foi menor para todos os órgãos e a concentração de óxido nítrico menor no fígado e epíplon no grupo tratado com itraconazol (3mg/mL)/celecoxib (6mg/mL) quando comparado com o grupo infectado e não tratado. Na histologia geral mostrou que o tratamento com itraconazol (3mg/mL)/celecoxib (6mg/mL) reduziu as lesões e severidade da resposta granulomatosa para todos os órgãos. O epíplon órgão de choque para este modelo de infecção nos animais tratados com itraconazol (3mg/mL)/celecoxib (6mg/mL) notou-se que tinha pouca quantidade de fungos com morfologia preservada. A partir destes resultados pode-se concluir que a combinação de fármacos influenciou de forma positiva no controle da resposta granulomatosa auxiliando no combate do fungo, sugerindo que o tratamento combinado com a resposta imunopatológica interagiram refletindo na redução das lesões.

Palavras-chave: Paracoccidiodomicose. Itraconazol. Celecoxib

Auxílio financeiro: CNPq 305216/2016-3 and FAPEMIG APQ 012941-16. Grisolia, JC is recipient of CAPES scholarship.

Estereologia da resposta granulomatosa da paracoccidiodomicose experimental em camundongos tratados com itraconazol e celecoxib na fase inicial da infecção

Lauana Aparecida Santos¹, Julianne Caravita Grisolia¹, Luiz Cosme Cotta Malaquias¹, Adriano Macedo de Oliveira², Liana Maria Cardoso Verinaud³, Zoilo Pires de Camargo⁴, Eva Burger¹.

1 Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), Alfenas, MG, Brasil

2 Laboratório de Patologia, Hospital Universitário Alzira Vellano, Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Alfenas, MG, Brasil

3 Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil.

4 Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, SP, Brasil.

E-mail: lauanasantos20@gmail.com

Paracoccidoides brasiliensis é o fungo agente etiológico da paracoccidiodomicose. É uma doença granulomatosa que a formação do granuloma é um mecanismo para tentar bloquear e limitar a invasividade deste fungo. Nas formas benignas desta micose pode ser caracterizado com granulomas compactos e com poucos fungos. Nas formas severas podem ser encontrados granulomas frouxos, necrose e vários fungos com morfologia preservada. Neste estudo foi analisado os aspectos estereológicos da resposta granulomatosa em animais infectados com *P. brasiliensis* e tratados com itraconazol e celecoxib na fase inicial da infecção. Os animais foram infectados via intraperitoneal com a cepa virulenta de *P. brasiliensis* (Pb18) e após três dias de infecção iniciou-se o tratamento por gavagem nos grupos com itraconazol (3mg/mL), celecoxib (6mg/mL) e itraconazol (3mg/mL)/celecoxib (6mg/mL) por 15 dias. Após, o período de 15 dias de infecção os animais foram sacrificados e coletados baço, pulmão, fígado e epíplon/pâncreas processados corados com H/E para análises estereológica e sangue total para avaliação do número relativo de células periféricas. Os resultados demonstraram que na contagem diferencial de sangue periférico os animais que receberam a combinação de drogas tiveram uma mudança do perfil celular quando comparado com os animais infectados não tratados. Na celularidade tecidual também foi possível verificar esta mudança celular em todos os órgãos coletados. Ao avaliarmos a quantidade de processo inflamatório (pulmão, fígado e epíplon) verificou-se que o número de células inflamatórias diminuiu em todos os órgãos coletados gradativamente nos grupos tratados com celecoxib, itraconazol e na celecoxib/itraconazol. Ao analisar o score de inflamação observa-se que nos animais tratados com itra/celecoxib tiveram em todos os órgãos coletados score moderado de inflamação, sendo significativamente estatístico quando comparado com grupo infectado e não tratado, somente celecoxib e itraconazol. A quantidade de vasos e neovasos foi menor no pulmão e epíplon nos grupos tratados com itra e celecoxib quando comparados com os grupos infectado e não tratado e somente itra e celecoxib. A quantidade de granulomas totais no fígado, pulmão e epíplon foi diminuindo nos grupos tratados com celecoxib, itraconazol e itra e celecoxib respectivamente, no pulmão não teve significância estatística. Ao avaliar o tipo de granuloma é possível perceber que os animais que receberam a combinação de fármacos tiveram menor quantidade de granulomas exudativos quando comparados com os demais grupos, também obtiveram menor número de granuloma organizados para todos os órgãos coletados. A partir destes resultados é possível concluir que o itraconazol e celecoxib combinados diminuíram as lesões ocasionadas pela presença do fungo e sugerindo.

Palavras-chave: *Paracoccidoides brasiliensis*. Esterologia. Resposta granulomatosa.

Auxílio financeiro: CNPq 305216/2016-3 and FAPEMIG APQ 012941-16. Grisolia, JC is recipient of CAPES scholarship.

Estudo de formas sólidas de espironolactona

Thúlio Wliandon Lemos Barbosa¹, Antônio Carlos Doriguetto², Magali Benjamim de Araújo¹, Rudy Bonfilio¹.

1. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).

2. Instituto de Química, Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).

Email: thuliolemos@gmail.com

Espironolactona (SRP) de fórmula molecular C₂₄H₃₂O₄S é um fármaco pertencente a Classe II de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (baixa solubilidade e alta permeabilidade). A variação no estado-sólido desse fármaco pode acometer características como solubilidade, biodisponibilidade e estabilidade físico-química, o que pode prejudicar a qualidade do medicamento. Neste estudo foi obtida a SPR 1/3 hidratada a partir da recristalização utilizando um sistema de solubilização em acetona a frio. Portanto, o objetivo desse trabalho foi a obtenção e caracterização da SPR 1/3 hidratada em comparação com a forma preferencialmente comercializada, a SPR forma II, pelas técnicas de Difração de Raio X (DRX), espectroscopia na região do infravermelho (IV), calorimetria diferencial exploratória (DSC) e termogravimetria (TG). O estudo foi realizado no Núcleo de Controle de Qualidade da Unifal-MG. A partir dos resultados de caracterização por DRX, IV, DSC e TG, pode-se perceber que a forma 1/3 hidratada se converte totalmente em forma II após aquecimento a 180 °C. Os estudos de solubilidade a 37 °C mostraram que a SPR 1/3 hidratada é estatisticamente menos solúvel que a SPR forma II em todos os meios testados, e que apresenta conversão parcial do estado sólido da SPR forma II em SPR 1/3 hidratada nos meios de H₂O e HCl 0,01 M. Após seis meses, no estudo de estabilidade acelerada a 40 °C e 70 % UR, as formas estudadas apresentaram estabilidade físico-química. Conclui-se, a partir destes resultados, que o controle adequado dos medicamentos a partir de sua caracterização do estado-sólido é de fundamental importância para não comprometer sua qualidade.

O projeto foi aceito para publicação na revista Journal of Pharmaceutical Sciences, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.03.001>.

Palavras-chave: Espironolactona; Estado-sólido; Caracterização; Solubilidade; Estabilidade Acelerada.

Auxílio financeiro: Fapemig, Pibic e CNPq, além do apoio do laboratório NQC da Unifal-MG.

Obtenção e caracterização de formas sólidas de alopurinol

Rafaella Magnusson Sousa Talmeli¹, Thúlio Wliandon Lemos Barbosa¹, Antônio Carlos Doriguetto², Magali Benjamim de Araújo¹, Rudy Bonfilio¹.

1. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).

2. Instituto de Química, Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).

Email: rafatalmeli@gmail.com

O alopurinol é um medicamento utilizado na forma farmacêutica comprimidos para tratamento de hiperuricemia. É classificado como classe II pelo Sistema de Classificação Biofarmacêutica (baixa solubilidade e alta permeabilidade) e apresenta, até o momento, três formas sólidas descritas na base de dados *Cambridge Structural Database*: base livre anidra e dois sais, um sal de cloridrato e outro de hemissulfato, sendo a base livre anidra a forma comercializada em matérias-primas e comprimidos. É de conhecimento que sais geralmente apresentam maiores solubilidade e velocidade de dissolução do que suas correspondentes formas não ionizadas. Os objetivos deste trabalho são obter e caracterizar diferentes formas sólidas do alopurinol, partindo de sua base livre em matérias-primas. Os ensaios foram realizados no núcleo de Controle de qualidade da Unifal-MG. As técnicas utilizadas na caracterização são difração de raios-X por policristais (DRX), espectroscopia na região do infravermelho (IV), análises térmicas como calorimetria diferencial exploratória (DSC) e termogravimetria (TG), além de estudos de solubilidade a 25 °C e 37 °C e estabilidade acelerada. O cloridrato de alopurinol foi obtido por recristalização sob evaporação lenta de solvente em solução aquosa de HCl 0,1 M. Os resultados de caracterização demonstraram que a base livre e o cloridrato de alopurinol apresentam padrões distintos de difração de raios-X e diferentes espectros na região do infravermelho. Além disso, os resultados de análises térmicas mostraram que o cloridrato de alopurinol apresentou um evento endotérmico entre 111 °C e 234 °C com perda de 20 % de massa na faixa de 141 a 234 °C, que foi atribuído à saída do HCl da estrutura cristalina. Os ensaios de solubilidade a 25 °C e a 37 °C serão testados em três meios de pHs 1,2; 4,5 e 6,8 e em três tempos amostrados (24, 48 e 72 horas). O estudo de estabilidade acelerada será realizado por caracterização e doseamento do pó armazenado em 40 °C e 75 % UR durante os tempos de amostragem de 0, 3 e 6 meses. Concluindo, os estudos de caracterização realizados foram suficientemente capazes de diferenciar as duas formas sólidas de alopurinol estudadas. Além disso, o estudo de solubilidade e estabilidade acelerada poderão demonstrar se cloridrato de alopurinol pode ser uma estratégia viável para melhorar as características de baixa solubilidade apresentadas pelo alopurinol base livre.

Palavras-chave: Alopurinol; Estado-sólido; Caracterização; Solubilidade; Estabilidade Acelerada.

Agências financiadoras: Fapemig, CNPq.

Obtenção, caracterização e estudos de solubilidade e estabilidade de formas sólidas de acetato de fludrocortisona

Ataislaine Batista, Thúlio Wliandon Lemos Barbosa, Milena Carla Espósito, Magali Benjamim de Araújo, Rudy Bonfilio

Universidade Federal de Alfenas, Faculdade de Ciência Farmacêutica, Farmácia.
a.taislaineangere@hotmail.com

As moléculas no estado sólido podem apresentar mais de um empacotamento ou arranjo cristalino, o que pode resultar em alterações nas propriedades farmacotécnicas, na estabilidade física e química, na solubilidade, nas taxas de dissolução e na biodisponibilidade dos insumos e medicamentos. O acetato de Fludrocortisona é um corticosteroide que possui alta atividade mineralocorticoide sendo utilizado no tratamento da insuficiência adrenocortical. Até o momento, há descrições de duas formas anidras e dois solvatos (um hidrato e um solvato de propanol) para o acetato de fludrocortisona no banco de dados de *Cambridge Structural Database (CSD)*. Sabe-se que hidratos geralmente apresentam maior estabilidade e menor solubilidade que as formas anidras. O objetivo desse estudo foi obter formas sólidas de acetato de fludrocortisona a partir da matéria-prima por técnicas de recristalização e caracterizá-los utilizando as técnicas de difração de raios-X por policristais (DRXP), análises térmicas como a termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) e espectroscopia na região do infravermelho (IV-ATR). Além disso, realizar estudos de solubilidade e estabilidade acelerada entre as formas caracterizadas. Uma forma cristalina com padrão de difração de raio X diferente da matéria prima e das formas descritas no banco de dados CSD foi obtida através de recristalização por evaporação lenta de solvente em clorofórmio e acetona 6:4 v/v e caracterizada até o momento pelas técnicas de DRX, IV e DSC. Os ensaios de solubilidade serão realizados em pelo menos três diferentes solventes aquosos a temperaturas $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Nos estudos de estabilidade, as formas sólidas serão acondicionadas em câmara climática a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 75\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$. As amostras serão então analisadas nos tempos 0 (zero), 3 (três) e 6 (seis) meses pelas técnicas descritas acima. Com os resultados obtidos busca-se verificar o comportamento dessa nova forma cristalina perante a forma preferencialmente comercializada e, assim, fornecer informações para contribuir para uma melhor segurança e garantia na qualidade de medicamentos contendo acetato de fludrocortisona.

Palavras-chave: Acetato de Fludrocortisona, Formas sólidas, Solubilidade, Estabilidade acelerada.

Auxílio financeiro: CNPq

Extratos de sementes de camu-camu (*Myrciaria dubia*) previnem dano cromossômico e atuam como agentes antiproliferativos

Mariana Araújo Vieira do Carmo¹, Marina Fidelis², Caroline Andolfato Sanchez¹, Carolina Giroto Pressete¹, Daniel Granato², Luciana Azevedo¹

1 Universidade Federal de Alfenas; PPG Biociências Aplicadas à Saúde

2 Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)

E-mail: marianavieira06@hotmail.com

As sementes e cascas de camu-camu podem apresentar maior potencial antioxidante e níveis importantes de polifenóis quando comparadas à polpa, uma vez que a maioria dos compostos bioativos é retida nessas partes da fruta. No entanto, esses subprodutos geralmente são descartados sem o benefício de seus componentes químicos. Recentemente, a extração e análise de compostos bioativos de subprodutos de frutas tem sido cada vez mais estudada para evitar perdas e desperdícios importantes, além de representar potenciais benefícios para aplicações nas indústrias de alimentos e farmacêutica. Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivos avaliar a atividade antiproliferativa *in vitro* de extratos de semente de camu-camu e a capacidade dos extratos em inibir dano cromossômico induzido pela cisplatina. As sementes dos frutos maduros foram obtidas para preparo dos extratos 100% H₂O, 100% EtOH, 50% H₂O + 50% EtOH, 25% H₂O + 75% EtOH, 75% H₂O + 25% EtOH. Para a avaliação citotóxica dos extratos de semente de camu-camu foi realizado o teste de proliferação celular (MTT) com concentrações entre 100-900 µg/ml em células cancerosas de pulmão A549. Para o ensaio de aberração cromossômica, as células A549 foram semeadas em frascos de 75 cm³ a uma densidade de 5 x 10⁵ células/frasco e as culturas foram divididas em quatro grupos: controle negativo, isto é, as células receberam apenas meio de cultura. No grupo 2, as células foram tratadas com 4 µmol/L de cisplatina (controle positivo). No grupo 3, as células foram tratadas com 50% H₂O + 50% EtOH extrato de semente de camu-camu (IC₅₀) e grupo 4 com uma combinação de 4 µM cisplatina e extrato 50% H₂O + 50% EtOH, por 48h. Seis horas antes da coleta das células, foram adicionados 200 µl de solução de colchicina (0,0016%) para interromper a divisão celular na metáfase. Lâminas foram feitas e coradas com Giemsa 10% para posterior análise do índice de aberrações cromossômicas. Todos os extratos de semente de camu-camu testados apresentaram atividade antiproliferativa contra células A549, sendo que o extrato 50% H₂O + 50% EtOH apresentou maior ação citotóxica (IC₅₀ = 278 µg/ml), enquanto o extrato 100% EtOH mostrou menor citotoxicidade (IC₅₀ = 785 µg/ml). As aberrações cromossômicas, independentemente do tipo, foram significativamente aumentadas em células tratadas com cisplatina 4 µmol/L (controle positivo) (1,62 ± 2,2) em comparação com o grupo controle negativo (0,22 ± 0,55). Além disso, o tratamento com camu-camu sozinho não induziu aberrações significativas (0,06 ± 0,24), indicando sua não-clastogenicidade/aneugenicidade. Além do efeito não tóxico, o extrato apresentou ação protetora diminuindo 37% do índice de quebras cromossômicas (1,02 ± 1,39) em relação ao grupo controle positivo, sugerindo que o extrato de semente de camu-camu pode atenuar o dano mutagênico induzido pela cisplatina. Os extratos de sementes de camu-camu apresentaram potente efeito citotóxico contra células A549, especialmente o extrato 50% H₂O + 50% EtOH, que apresentou também efeito protetor contra aberração cromossômica induzida por cisplatina.

Palavras-chave: Atividade antiproliferativa; aberração cromossômica, camu-camu.

Auxílio financeiro: CAPES; CNPq; UNIFAL-MG.

Avaliação da atividade leishmanicida *in vivo* a partir de derivado da miltefosina

Joana Carolina da Silva¹, Juliana Barbosa Nunes², Vanessa da Silva Gontijo¹, Patrícia Ferreira Espuri¹, Fabio Antonio Colombo¹, Marcos José Marques¹

¹Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG, Instituto de Ciências Biomédicas

²Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, FMSP, Programa de Fisiopatologia Experimental

*carol_dadal@hotmail.com

No presente estudo, o potencial terapêutico do composto 5-(4-(3-methanesulfonatepropyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl) dodecyl methanesulfonate (C11), análogo da Miltefosina, foi avaliado para leishmaniose visceral experimental. Para avaliar o potencial terapêutico do C11, hamsters foram infectados com *L. (L.) infantum* e foram tratados diariamente durante 10 dias com 25 mg de C11/kg de peso corporal por gavagem, ou com 50 mg de Glucantime/kg de peso corporal por via intraperitoneal. Um dia após a última dose, foi feita a eutanásia e a coleta de material para avaliar a expressão relativa de RNAm das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-17, TGF- β , IL-4 e IL-10 em fragmentos de baço e fígado; além do parasitismo do baço e do fígado e o registro das principais alterações histopatológicas. Os animais tratados com C11 apresentaram maior expressão das citocinas IL-17 e TNF- α e redução da expressão de IL-10 no baço comparado com o grupo controle infectado e não tratado (INT). Os grupos C11 e GLU apresentaram redução significativa dos níveis de IgG em relação ao grupo INT, $p < 0,05$. Além disto, os animais tratados com C11 tiveram menos parasitos no baço e no fígado quando comparados com o grupo INT, além de maior preservação da arquitetura de polpa branca no baço comparado com grupo controle INT e Glucantime. Em conjunto, esses achados indicam que o C11 é um composto interessante que deve ser considerado para o desenvolvimento de novos fármacos contra a leishmaniose visceral, devido seu efeito leishmanicida e ação imunoestimulante.

Palavras-chave: *Leishmania*; Derivados da Miltefosina; Ensaios *in vivo*; Resposta Imune.

***Sclerotinia sclerotiorum*: efeitos citotóxicos e antiproliferativos *in vitro*
da fração acetato e fração 100% metanol em células de câncer e
normais**

Carolina Giroto Pressete¹, Mario Ferreira Conceição Santos¹, Mariana Araújo Vieira do Carmo¹,
Carolina Adolfato Sanchez¹, Marisi Gomes Soares¹, Luciana Azevedo¹

1 Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL, Alfenas/Minas Gerais – Brasil.
carolinagp_94@msn.com

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* parece estar entre os patógenos vegetais mais devastadores e representa um dos maiores desafios para a produção agrícola, uma vez que o patógeno pode infectar culturas e hortaliças economicamente importantes, como feijão, soja, batata, ervilha e tomate. Por outro lado, um grande número de metabólitos secundários de fungos ocupa uma posição significativa na indústria farmacêutica e foram integrados ao desenvolvimento de drogas devido à ampla variedade de atividades biológicas, incluindo anticâncer, anti-inflamatória, antimicrobiana, antibacteriana e antiviral. Este estudo avaliou os efeitos citotóxicos e antiproliferativos *in vitro* de *S. sclerotiorum* como possível elemento estratégico de saúde. A amostra seca da espécie fúngica foi homogeneizada e extraída com 2 L de etanol. O solvente foi evaporado para 500 mL. O extrato etanólico resultante foi diluído com 50 mL de H₂O e particionado com acetato (3 x 500 mL), sendo obtido a fração acetato. A fração acetato foi submetido a uma cromatografia em coluna de fase reversa com um gradiente de H₂O / MeOH (metanol) como o eluente. Três frações acetato foram obtidas: 100% de H₂O, 1: 1 H₂O / MeOH e 100% de MeOH. Para os ensaios *in vitro* utilizou-se a fração acetato e a fração 100% MeOH. A atividade citotóxica e anti-proliferativa foram realizadas em células de adenocarcinoma do pulmão humano epitelial (A549), adenocarcinoma colorretal ileocecal (HCT8) e células pulmonares normais (IMR90). Considerando a atividade antiproliferativa, ambas as células cancerosas exibiram valores mais elevados de IG50 para a fração acetato (HCT8: 20 µg/mL e A549: 102 µg/mL) e a fração 100% MeOH (HCT8: 123 µg/mL e A549: 277 µg/mL) em comparação com a célula normal IMR90 (fração acetato: 16 µg/mL e fração 100% MeOH: 13 µg/mL). Estes resultados indicam que tanto a fração acetato como a fração 100% MeOH são mais citotóxicas para a célula normal, em comparação com as células cancerosas. Tanto para a fração acetato como para a fração 100% MeOH, os resultados sugerem que, para as células cancerosas é necessário utilizar concentrações mais elevadas da fração para inibir o crescimento de metade das células, ou seja, baixa citotoxicidade e ação antiproliferativa. Esta fração também teve atividades citotóxicas mais na linhagem celular não-cancerosa em comparação com a linhagem de células cancerosas, indicando que baixas concentrações desse tratamento podem matar a célula normal, mas não matam a célula cancerosa.

Auxílio financeiro: Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) [APQ 0285515] e concedeu bolsa de estudo à autora (Carolina Giroto Pressete). Agradecemos também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e bolsas de estudo para autores.

Sclerotinia sclerotiorum*: efeitos antimalários *in vitro* da fração acetato e fração 100% metanol em linhagens de *Plasmodium falciparum

Carolina Girotto Pressete¹, Mario Ferreira Conceição Santos¹, Mariana Araújo Vieira do Carmo¹, Caroline Adolfo Sanchez¹, Marisi Gomes Soares¹, Luciana Azevedo¹

1 Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL, Alfenas/Minas Gerais – Brazil. carolinagp_94@msn.com

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* parece estar entre os patógenos vegetais mais devastadores e representa um dos maiores desafios para a produção agrícola, uma vez que o patógeno pode infectar culturas e hortaliças economicamente importantes, como feijão, soja, batata, ervilha e tomate. Um grande número de metabólitos secundários de fungos ocupa uma posição significativa na indústria farmacêutica e foi integrado ao desenvolvimento de drogas devido à ampla variedade de atividades biológicas, além disso, sabe-se que este fungo pode produzir compostos, como ergosterol e peróxido de ergosterol e compostos deste tipo que possuem alta atividade antimalárica, antibacteriana, citotóxica e outras atividades farmacológicas. Este estudo avaliou os efeitos antimaláricos *in vitro* de *S. sclerotiorum* contra cepas de *Plasmodium falciparum*. A amostra seca da espécie fúngica foi homogeneizada e extraída com 2 L de etanol. O solvente foi evaporado para 500 mL. O extrato etanólico resultante foi diluído com 50 mL de H₂O e particionado com acetato (3 x 500 mL), sendo obtido a fração acetato. A fração acetato foi submetido a uma cromatografia em coluna de fase reversa com um gradiente de H₂O / MeOH (metanol) como o eluente. Três frações acetato foram obtidas: 100% de H₂O, 1: 1 H₂O / MeOH e 100% de MeOH. Para a avaliação da atividade antimalárica, a fração acetato e a fração 100% MeOH foram utilizados em duas linhagens de *Plasmodium falciparum*: W2 (resistente à cloroquina) e 3D7 (sensível à cloroquina). Considerando a atividade antimalárica, o teste mostrou que a fração acetato e a fração 100% MeOH apresentaram efeitos diferentes para ambas as cepas de *P. falciparum*. A fração acetato e a fração 100% MeOH apresentaram valores mais baixos IC₅₀ para W2 (330,4 e 362,3 µg/mL, respectivamente) em comparação com 3D7 (449,9 e 139,5 µg/mL, respectivamente). Assim, destacamos ambas as frações apresentaram melhores resultados frente à linhagem resistente à cloroquina quando comparada à linhagem sensível à cloroquina, pelo fato de apresentarem menores valores de IC₅₀. Sabe-se que o *S. sclerotiorum* pode produzir compostos, como o ergosterol e o peróxido de ergosterol, e este compostos podem possuir alta atividade antimalárica e outras atividades farmacológicas como uma fonte importante de pistas para a descoberta de drogas. No entanto, a partir dos resultados relatados neste trabalho, pode-se propor que a fração acetato e fração 100% MeOH extraídas deste fungo podem não ser valiosas para desenvolver uma nova classe de fármacos direcionados às vias plasmodiais, já que é necessária alta concentração para atingir o efeito terapêutico. O presente estudo é, no entanto, o primeiro relato das propriedades antiplasmodiais de *S. sclerotiorum* contra o *P. falciparum*.

Auxílio financeiro: Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) [APQ 0285515] e concedeu bolsa de estudo à autora (Carolina Girotto Pressete). Agradecemos também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e bolsas de estudo para autores

Potencial terapêutico do ravuconazol em combinação com fármacos reposicionados na infecção por *Trypanosoma cruzi*

Breno Vilas Boas Raimundo¹; Diego Fernandes Vilas Boas¹; Elda Gonçalves dos Santos¹; Thaiany Goulart de Souza e Silva¹; Ivo Santana Caldas¹; Ana Lia Mazzeti Silva²; Maria Terezinha Bahia²; Livia de Figueiredo Diniz Castro¹.

¹Universidade Federal de Alfenas – Departamento de Patologia e Parasitologia/UNIFAL-MG

²Universidade Federal de Ouro Preto – Departamento de Parasitologia/UFOP-MG

brenovilasboas2014@gmail.com

Trypanosoma cruzi é o agente etiológico da doença de Chagas, parasitose que afeta atualmente cerca de seis milhões de pessoas e é considerada uma doença negligenciada. Pesquisas recentes demonstram a necessidade de desenvolvimento de estratégias inovadoras na tentativa de obter tratamentos mais eficazes. O reposicionamento de fármacos é uma opção promissora, uma vez que avalia fármacos em uso, com perfil farmacocinético bem estabelecido. O ravuconazol é um antifúngico azólico com potente ação anti-*T.cruzi*; após resultados promissores desse fármaco em estudos experimentais, foi desenvolvido o E1224, um pró-fármaco do ravuconazol. Este pró-fármaco, apesar alcançar excelentes resultados pré-clínicos, quando testado em estudo clínico não foi efetivo em monoterapia, sendo sugerida sua utilização em terapia combinada a outros fármacos. O objetivo do nosso estudo foi analisar *in vitro* e *in vivo* a natureza da interação entre o ravuconazol e fármacos reposicionados sobre a cepa Y de *T.cruzi*. Inicialmente foram definidos os valores de EC-50 de cada fármaco (ravuconazol, amiodarona, clomipramina, nitazoxanida) sobre a infecção de células H9c2 por meio da incubação, por 48 horas, de diferentes concentrações dos fármacos com células previamente infectadas pelo parasito. Para determinação do efeito tripanossomicida foi analisado o percentual de infecção observado nas células infectadas na presença e ausência de tratamento. A seguir foram determinados os perfis de toxicidade das combinações utilizando a metodologia de redução da resazurina. A partir desses dados foram definidas as concentrações iniciais de cada fármaco para utilização combinada no mesmo modelo experimental. A natureza da interação foi identificada por meio dos valores de FIC (*fractional inhibitory concentration*) obtidos com auxílio do programa *CompuSyn*. Para os estudos *in vivo* foram utilizados 45 camundongos fêmeas da linhagem *Balb/C* experimentalmente infectados pela cepa Y. Grupos-controle infectados ou não foram incluídos. Os tratamentos foram administrados, por via oral, durante 5 dias, a partir do primeiro dia de parasitemia patente (ravuconazol 0,5mpk; ravuconazol 10mpk; benznidazol 100mpk; amiodarona 50mpk; ravuconazol 0,5mpk + amiodarona 50mpk). Nos diferentes grupos experimentais foram avaliados os parâmetros parasitemia e curva ponderal (até 15 dias de infecção). Os valores de EC-50 obtidos para cada fármaco foram: nitazoxanida >100 µm; clomipramina 11,1 ± 2,6 µm; amiodarona 26,5 ± 3,5 µm; ravuconazol 4,8 ± 1nm e benznidazol 7,5 ± 4,8 µm. A concentração citotóxica dos fármacos foi no mínimo duas vezes maior do que os valores de EC-50, exceto para clomipramina que apresentou induziu mortalidade de 50% das células hospedeiras na concentração de 11,1 ± 2,6 µm. Não houve toxicidade adicional resultante da combinação dos medicamentos. Tendo em vista a atividade anti-*T.cruzi* e perfil de toxicidade *in vitro* foram selecionados os fármacos para estudo em combinação; o ravuconazol e a amiodarona. Os resultados mostraram que há uma interação sinérgica entre eles, uma vez que a mistura de ambos resultou em valores de FIC (EC-50) < 0,5. Considerando este resultado promissor, foi realizada a avaliação *in vivo* da mesma combinação. A análise da parasitemia mostrou redução no número de parasitos nos animais tratados com 0,5mg/Kg de ravuconazol (301±181,5 parasitos/0,1mL de sangue) quando comparados aos camundongos não tratados (1442,5±415,3 parasitos/0,1mL de sangue); o mesmo efeito não foi observado com a amiodarona (50mg/Kg), cujo grupo apresentou média de 1198,33±601,6 parasitos/0,1mL de sangue. De forma interessante, nos animais tratados com os dois fármacos em combinação houve uma drástica redução do parasitismo (0,714286±1,75 parasitos/0,1mL), evidenciando um efeito benéfico resultante do uso concomitante. Adicionalmente, a terapia

combinada protegeu os animais da perda de peso induzida pela infecção, observada nos camundongos tratados com amiodarona e ravuconazol em monoterapia. Os resultados permitem concluir que há uma interação positiva entre o ravuconazol e a amiodarona *in vitro* e *in vivo*. O uso desta associação constitui uma alternativa promissora na busca de novos tratamentos para doença de Chagas, principalmente considerando que ambos os fármacos apresentam mecanismos de ação bem estabelecidos e são aprovados para uso clínico.

Palavras-chave: Doença de chagas; quimioterapia experimental; combinação de fármacos; modelos experimentais.

Auxílio financeiro: Capes; FAPEMIG.

Bioprospecção e caracterização de fungos endofíticos produtores de compostos bioativos isolados de *Dalbergia ecastaphyllum* L.Taub

Rayra Annara da Fonseca Otacilio Pinto¹, Daniel Viera de Moraes², Amanda Tristão Santini³, Patricia Lunardelli Negreiros de Carvalho⁴, Livia Maria Maciel da Fonseca⁵, Masaharu Ikegaki⁶.

¹ Universidade Federal de Alfenas-MG, Mestranda do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (PPGCB, UNIFAL-MG).

² Universidade de São Paulo (USP-SP), Doutorando do Programa de Pós Graduação em Ciências.

³ Universidade Federal de Alfenas-MG, Mestranda do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (PPGCB, UNIFAL-MG).

⁴ Universidade Federal de Alfenas-MG, Técnicos Administrativos em Educação .

⁵ Universidade Federal de Alfenas-MG, Acadêmica de Ciências Biológicas Bacharelado.

⁶ Universidade Federal de Alfenas-MG, Orientador Docente da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

E-mail : annara.rayra@bol.com.br

Os produtos naturais possuem potencial para a prospecção de moléculas em razão da diversidade de compostos químicos abundantes na natureza. Os metabólitos secundários de microrganismos endofíticos são conhecidos por suas atividades antimicrobianas, antitumorais, antioxidantes e por sua utilização na agroindústria. A *Dalbergia ecastaphyllum* é uma espécie vegetal distribuída na costa brasileira, sendo a principal fonte da matéria-prima da resina utilizada para a produção da própolis vermelha brasileira, produto com propriedades medicinais, seus endófitos constituem fontes atrativas para a bioprospecção de novos compostos biologicamente ativos. Este trabalho objetivou isolar fungos endofíticos de *D.ecastaphyllum* , avaliar seus extratos brutos, oriundos de processos de fermentação líquida, em ensaios biológicos *in vitro* de triagem antimicrobiana e investigar a produção enzimática de amilase. Um total de 60 folhas de *D.ecastaphyllum* coletadas em Canavieiras-BA, tiveram seus fragmentos inoculados em meio de cultura, resultando na obtenção de 150 fungos endofíticos, que foram categorizados previamente em 5 morfologias baseadas em suas características macroscópicas de cultivo. Os mesmos foram submetidos ao teste de produção de amilase sendo 12,67% (19) capazes de produzir a enzima *in vitro*. Uma triagem para selecionar cepas produtoras de antimicrobianos foi realizada frente a *S.aureus* ATCC 6538, *E.coli* ATCC 25922 e *C.albicans* ATCC 10231, de acordo com a metodologia do ágar em bloco. Apresentaram halos de inibição no teste de triagem 35 (23,33%) endófitos, os quais produziram halos de inibição com médias entre 11,5 mm a 24,5 mm de diâmetro. A partir da triagem pela metodologia do ágar em bloco, 11 endófitos foram selecionados de acordo com a expressividade e especificidade dos halos de inibição, e foram posteriormente submetidos à fermentação líquida para obtenção de seus extratos brutos, a partir dos quais serão aferidas as concentrações inibitórias, bactericidas e fungicidas mínimas frente a microrganismos Gram-positivos, Gram-negativos e leveduras, bem como ensaios biológicos *in vitro* para atividade antioxidante, antiproliferativa, caracterização química por CG-EM e identificação fenotípica das espécies fúngicas. Os resultados obtidos até o presente momento constituem a primeira evidência de que a *D.ecastaphyllum* é colonizada por fungos endofíticos e que estes produzem compostos bioativos de interesse biotecnológico e farmacêutico.

Palavras-chave: *Dalbergia ecastaphyllum*, produtos naturais, endófitos, bioativos.

Auxílio financeiro: UNIFAL-MG.

Ação antimalárica do camu-camu (*Myrciaria dubia*) não envolve inibição da polimerização do heme

Mariana Araújo Vieira do Carmo¹, Marina Fidelis², Caroline Andolfato Sanchez¹, Carolina Giroto Pressete¹, Daniel Granato², Luciana Azevedo¹

¹ Universidade Federal de Alfenas; PPG Biociências Aplicadas à Saúde

² Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)

E-mail do(a) primeiro(a) autor(a): marianavieira06@hotmail.com

Apesar dos grandes investimentos de recursos e avanços científicos em pesquisa molecular, celular e clínica sobre malária, clinicamente vacinas eficazes ainda estão longe de estar disponíveis como ferramentas para o controle e erradicação da malária. Sendo assim, se torna necessária a descoberta de novos compostos alternativos que possam ser associados aos tratamentos convencionais. O vacúolo digestivo é a organela do *Plasmodium spp.* onde ocorre intensa degradação da hemoglobina eritrocitária. O heme, produto da digestão da hemoglobina, é tóxico para o parasita. Sendo assim, este é metabolizado pelo parasito em cristais de hemozoína (atóxico) para sua sobrevivência. A inibição da polimerização do heme em hemozoína é considerada um dos principais mecanismos de ação de vários antimaláricos em uso clínico, como por exemplo a cloroquina. O presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial antimalárico dos extratos de sementes de camu-camu e seu mecanismo de ação. Diferentes concentrações (10 - 500 µL/mL) de extratos de sementes de camu-camu foram incubadas a 37°C com as linhagens de *Plasmodium spp.* (3D7 e W2) (0,5% de parasitemia e 2% de hematócrito) em microplacas de 96 poços. Após 48h, o sobrenadante da cultura foi removido e substituído por 100 µL de tampão de lise [Tris (20 mM; pH 7,5), EDTA (5 mM), saponina (0,008%) e Triton X-100 (0,08%)] seguido pela adição de 0,2 µL / mL de Sybr Safe. As microplacas foram incubadas no escuro por 30 minutos e a fluorescência foi feita com excitação a 485 nm e emissão a 535 nm. Para o ensaio de polimerização do heme, extratos de sementes de camu-camu foram adicionados à placa (96 poços) (20 µL 10 -80 mg/mL) seguidos da adição de solução de hematina bovina (101 µl; 1,68 mM em hidróxido de sódio 0,1 M) e tampão acetato de sódio a pH 5 (12 M; 58 µl) com agitação constante a 60 °C. Após incubação a 60°C por 1h, a placa foi centrifugada a 1570 rpm durante 8 min. O sobrenadante foi descartado e os cristais de hemozoína foram redissolvidos em 200 µl. A leitura foi realizada a 405 nm. Todos os extratos de semente de camu-camu (100% H₂O; 100% EtOH, 50% H₂O + 50% EtOH; 25% H₂O + 75% EtOH; 75% H₂O + 25% EtOH) testados apresentaram ação antimalárica, no entanto foram classificados com baixa atividade antiparasitária, exceto pelo extrato 25% H₂O + 75% EtOH, que apresentou atividade promissora para a linhagem 3D7 (IC₅₀=10 µL/mL). No ensaio de inibição da polimerização do heme, a cloroquina inibiu em 60% a inibição da formação de hemozoína na sua concentração máxima usada (80 mg/mL). Em contrapartida, nenhum dos extratos foi capaz de inibir a polimerização do heme; indicando que a atividade antimalárica observada envolve outros mecanismos de ação. A fraca propriedade antiparasitária encontrada nos extratos de sementes de camu-camu não indica a ausência de atividade antimalárica; em vez disso, mostra que uma alta concentração seria necessária para alcançar o efeito terapêutico desejado. O mecanismo de ação antimalárica dos extratos não envolve a inibição da polimerização do heme.

Palavras-chave: *Plasmodium falciparum*; hemozoína, camu-camu.

Auxílio financeiro. CAPES; CNPq; UNIFAL-MG.

Avaliação de *Lavandula angustifolia* mill. e *Lavandula dentata* l. sobre células planctônicas e biofilmes de *Candida albicans* e espécies não-*albicans* de *Candida* spp.

Laís Stempniewski Nascimento, Tamires Rodrigues Ribeiro Roberto, Renan Gomes Bastos, Ana Flávia da Silva Amorim, Naiara Chaves Silva, Josidel Conceição Oliver, Marcelo Aparecido Silva, Amanda Latercia Tranches Dias

Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, Brasil. Departamento de Microbiologia e Imunologia. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas.
E-mail: laisnas@hotmail.com

A ocorrência de infecções fúngicas, especialmente aquelas causadas por *Candida* spp., tem aumentado nas últimas décadas e estão associadas a alta mortalidade, especialmente em indivíduos imunocomprometidos. *Candida albicans* é frequentemente encontrada em pacientes com infecções hospitalares e de comunidade, podendo causar infecções mucosas, superficiais e invasivas. Algumas espécies de *Candida* spp. apresentam importantes fatores associados à virulência, entre eles destaca-se a formação de biofilmes, que pode provocar mudanças no perfil de sensibilidade dos isolados aos antifúngicos disponíveis. Devido a esses fatores, faz-se necessária a pesquisa de novas opções terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por *Candida-albicans* e espécies não-*albicans* de *Candida* spp. O uso de fitoterápicos tem se intensificado e o Brasil possui uma grande biodiversidade, destacando-se, assim, a importância da busca de bioativos em fontes naturais. As plantas do gênero *Lavandula* pertencem à família *Lamiaceae* e são utilizadas em todo o mundo devido às suas propriedades terapêuticas, tais como relaxante, cicatrizante, atividade antimicrobiana e antioxidante. O objetivo deste trabalho é avaliar, *in vitro*, as atividades antifúngicas dos extratos e óleos de *Lavandula angustifolia* e *Lavandula dentata* sobre isolados de *Candida albicans* e espécies não-*albicans* de *Candida* spp. cultivados em estado planctônico e na forma de biofilme. Para tal, foi realizada a caracterização fitoquímica dos extratos hidroetanólicos de folhas e flores de *Lavandula* e dos seus óleos essenciais. Posteriormente, fez-se a avaliação da Concentração Inibitória de 50% e 90% (IC50 e IC90) do crescimento dos isolados, na qual os extratos hidroetanólicos e os óleos essenciais de *Lavandula* foram adicionados aos cultivos de *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida glabrata*. Não houve atividade significativa contra *C. albicans*, entretanto, *L. angustifolia* foi ativa em células planctônicas de *C. Krusei* e *C. glabrata*: flores frescas (IC90 500µg/mL e IC90 1000 µg/mL), folhas frescas (IC50 500 µg/mL), flores debulhadas (IC50 250 µg/mL e IC90 500µg/mL) em *C. krusei*, e folhas frescas (IC50 1000µg/mL) e flores debulhadas (IC50 1000 µg/mL) em *C. glabrata*. *L. dentata* foi ativa apenas em *C. krusei*: flores frescas e folhas frescas (IC50 1000 µg/mL). Em biofilmes, o extrato de folhas frescas foi menos ativo (IC50 5000 µg/mL) e flores debulhadas (IC50 312,5µg/mL) de *L. angustifolia* em *C. glabrata*. Estes resultados confirmam o que já está descrito na literatura, de que o biofilme é uma forma de resistência microbiana, sendo mais difícil de ser destruído e reforçam a importância de estudos de investigação do potencial antifúngico em materiais vegetais como esse.

Palavras-chave: *Lavandula angustifolia*; *Lavandula dentata*; *Candida* spp.; *Candida albicans*; atividade antifúngica.

Auxílio financeiro: FAPEMIG.

Avaliação do efeito do composto 4-nitrobenzoilcumarínico em monoterapia ou associado com o benznidazol na miocardite de camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*

Luana Sueli Silva¹, Diego Fernandes Vilas Boas¹, Raphaela da Rocha Gaban de Oliveira¹, Elda Gonçalves dos Santos¹, Diogo Teixeira Carvalho², Guilherme Andrade Brancaglioni², Livia de Figueiredo Diniz¹, Romulo Dias Novaes¹, Ivo Santana Caldas¹.

1. Departamento Patologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, Brasil.

2. Departamento de Alimentos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, Brasil.

E-mail: luana.falavinha@outlook.com

A doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, afeta cerca de 7 milhões de pessoas em todo o mundo. Mesmo atingindo considerável número de pessoas, permanece como sendo uma doença negligenciada devido ao reduzido investimento financeiro para desenvolvimento de novos fármacos. Desta forma, considerando as limitações dos fármacos existentes, a procura por novas alternativas para o tratamento da doença de Chagas continua sendo altamente relevante. Estudos têm mostrado que compostos cumarínicos apresentam atividade anticancerígena, antimicrobiana e antiparasitária. Estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa mostraram importante atividade *in vitro* do composto 4-nitrobenzoilcumarínico (4 NBC) e assim, o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito desta cumarina na capacidade de prevenir a miocardite de camundongos experimentalmente infectados pela cepa Y do *T. cruzi*. Para isso, foram utilizados 56 camundongos Swiss, divididos em 8 grupos com 7 camundongos cada. Um grupo não foi infectado, os demais foram infectados com o *T. cruzi*, tratados com benznidazol e cumarina por 20 dias consecutivos em diferentes dosagens e associados ou não. Para verificação do possível efeito tóxico do 4NBC, os camundongos foram pesados semanalmente e foi realizada a dosagem da Transaminase Oxalacética (AST) e da Transaminase Pirúvica (ALT) como marcadores de toxicidade hepática. Ao final do experimento os animais foram eutanasiados e o tecido cardíaco foi utilizado para preparação de lâminas coradas pela hematoxilina e eosina para posterior análise do infiltrado inflamatório. De forma geral o tratamento foi bem tolerado pelos animais, sem perda de peso significativa nas diferentes estratégias de tratamento. Em relação às enzimas AST e ALT, foi observado que nos animais infectados e não submetidos ao tratamento, houve o aumento de ambas as enzimas, sendo o único grupo a apresentar diferença estatística em relação aos animais não infectados por *T. cruzi*. A maior quantidade de núcleos inflamatórios foi observada no coração dos animais tratados com Bz (50 mg), enquanto no grupo tratado com a associação 4NBC (50 mg) + Bz (50 mg) quatro de sete camundongos não apresentaram acúmulo de células inflamatórias em seus tecidos cardíacos. A combinação 4NBC (100 mg) + Bz (50 mg), mostrou um resultado diferente, pois foi possível observar áreas inflamadas. Quatro animais do grupo tratado com Bz (100 mg) foram considerados curados e os mesmos não apresentaram focos inflamatórios em seus tecidos assemelhando-se ao que foi observado nos animais do controle negativo. Os resultados indicam que o composto 4NBC é bem tolerado pelo hospedeiro e que este pode interferir positivamente na prevenção da miocardite típica da doença de Chagas.

Palavras-chave: Tripanossomíase americana. Compostos cumarínicos. Miocardite.

Apoio Financeiro: CAPES; FAPEMIG e UNIFAL-MG

Avaliação da formação de biofilmes por isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus neoformans* e determinação da sensibilidade antifúngica de células sésseis e planctônicas

André Luís Gonçalves Mendes, Kevin Antônio Lealdini Madruga, Josidel Oliveira, Naiara Chaves Silva, Amanda Latercia Tranches Dias.

Universidade Federal de Alfenas, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Farmácia
andre.luis.mnds@gmail.com

Cryptococcus neoformans é considerada levedura oportunista e está associada à micose que, geralmente, apresenta quadro inicial pulmonar, com passagem para o sistema nervoso central e estabelecimento de meningite criptocócica. Entre as micoses sistêmicas em humanos, a criptococose é a que mais acomete o sistema nervoso central e tal fato pode ser explicado pela grande quantidade de substâncias, principalmente neurotransmissores como dopamina, que favorecem o tropismo do fungo para o local em questão. A espécie *C. neoformans* pode apresentar fatores que estão relacionados à sua virulência, tais como formação de biofilmes. Durante os últimos anos, estudos evidenciaram que *Cryptococcus* spp., sob a forma de biofilme, pode apresentar resistência antifúngica quando comparado às células em estado planctônico. Esse fenômeno pode explicar inúmeras falhas terapêuticas relacionadas ao tratamento da criptococose. A formação de biofilmes é considerada estratégia de resistência antimicrobiana e pode estar associada à refratariedade ao tratamento antifúngico em casos de criptococose e assim justifica-se a importância de se investigar a capacidade de formação de biofilmes e a sensibilidade antifúngica dos mesmos a antifúngicos convencionais e a bioativos de origem vegetal. O objetivo deste trabalho é avaliar a capacidade de formação de biofilmes por estes fungos e determinar a sensibilidade antifúngica dos mesmos. Isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans* foram selecionados para estudo e os primeiros ensaios de formação de biofilme foram realizados. A metodologia utilizada foi proposta inicialmente para *Candida* spp., entretanto, modificações têm sido feitas para que o ensaio de formação de biofilmes de *C. neoformans* seja padronizada e permita a comparação entre os isolados. Ensaios-piloto já foram conduzidos e a metodologia têm se mostrado adequada para tal estudo, entretanto, ainda há muito a ser feito.

Palavras-chave: *Cryptococcus* spp. Células planctônicas. Biofilmes. Sensibilidade.

Apoio Financeiro: FAPEMIG, Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq)

Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana contendo pregabalina para tratamento de dor neuropática

Rafaela Figueiredo Rodrigues^{1,2}, Flávia Chiva Carvalho², Giovane Galdino de Souza³, Vanessa Bergamin Boralli Marques¹

¹ Laboratório de Análise de Toxicantes e Fármacos, Departamento de Medicamentos e Alimentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Minas Gerais

² Laboratório de Sistema de Liberação Controlada de Fármacos, Departamento de Medicamentos e Alimentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais

³ Laboratório de Fisioterapia Experimental, Departamento de Fisioterapia, Escola de Enfermagem, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Minas Gerais

E-mail da autora correspondente: rafaelfigueiredor@gmail.com

A pregabalina (PRE) é o fármaco preconizado para o tratamento da dor neuropática, no entanto apresenta como desvantagens a sonolência e a rápida meia-vida de eliminação. O preparo de nanopartículas (NPs) de quitosana (QS) contendo PRE pode ser uma estratégia inovadora pois os sistemas nanoparticulados podem propiciar vantagens como o aumento da biodisponibilidade e redução dos efeitos colaterais, favorecendo a adesão do tratamento pelo paciente. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi desenvolver NPs de QS para liberação de PRE e avaliar o tamanho, a carga de superfície, o índice de polidispersão o pH e a morfologia, além de avaliar o efeito antinociceptivo da formulação. NPs foram desenvolvidas através do método de geleificação ionotrópica utilizando ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMCP) como agente reticulante, a partir de uma proporção fixa predeterminada de QS e HPMCP (3:1 v/v), contendo 80% de fármaco, em relação à soma da massa polimérica envolvida. As NPs foram caracterizadas quanto ao tamanho, morfologia, pH e potencial zeta. Para a avaliação dos perfis antinociceptivos, foram utilizados ratos Wistar machos (220-250g, n=12/grupo, 6 sham e 6 operados), aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal (57/2016) divididos em 4 grupos: PRE (10mg/Kg); NP PRE (10mg/Kg – contendo 80% de PRE); água (veículo – 10mg/Kg) e NP vazia (veículo – 10mg/Kg). Os animais operados foram anestesiados e submetidos à indução da dor neuropática pela constrição crônica do nervo ciático. Os animais *sham* passaram por falso procedimento. No 14º dia após a indução da dor neuropática, os animais receberam as substâncias por via oral, em dose única. A avaliação antinociceptiva foi realizada pelo teste de von Frey de filamentos imediatamente antes da indução da dor neuropática, no 14º dia: antes da administração das substâncias, 1h, 2:15h, 4h e 8h após a administração das substâncias e de 24h a 72h após a administração das substâncias. Os resultados obtidos foram comparados entre si pelo teste de ANOVA de medidas repetidas. As amostras apresentaram diâmetro médio de 192,57nm, PDI médio de 0,214, potencial zeta médio de 19,4mV, pH médio de 5,73 e morfologia esférica. Sobre o perfil antinociceptivo, ao se comparar os grupos PRE e NP PREG, o perfil antinociceptivo foi semelhante em todos os tempos de avaliação, por não haver diferenças significativas ($p > 0,05$), exceto 48h após a administração das substâncias, no qual o grupo NP PRE apresentou efeito antinociceptivo significativamente maior ($p < 0,01$). Além disso, foi possível observar que o grupo NP PRE não apresentou sonolência após a administração da substância. Estes resultados indicam que foi possível produzir NPs contendo pregabalina, com características físico-químicas e morfológicas ótimas e adequadas para manutenção da sua estabilidade, confirmando a viabilidade do método empregado, além de mostrar que o emprego da NP prolongou a liberação de PRE e reduziu efeitos colaterais. Ainda serão realizados testes farmacocinéticos para verificar a biodisponibilidade do medicamento neste nanocarreador. Sendo assim, as NPs se apresentam como uma alternativa inovadora, vantajosa e benéfica ao tratamento convencional da dor neuropática, contribuindo para o bem-estar dos pacientes.

Palavras-chave: Nanopartícula polimérica; tratamento alternativo; dor neuropática; pregabalina

Apoio financeiro: FAPEMIG; CAPES; UNIFAL

Avaliação do potencial insulínico do óleo de baru *in vitro* e *in vivo*

Júlia Rosental de Souza Cruz¹, Fernanda Borges de Araújo Paula²

1- Universidade Federal de Alfenas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Doutorado em Ciências Farmacêuticas

2- Universidade Federal de Alfenas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Professora Associada da Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Email: jrosentalcruz@hotmail.com

Foi descoberto que o óleo extraído da semente de baru (*Dipteryx alata* Vog) apresenta propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, e é rico em ácidos oleico, que segundo estudos recentes tem função hipoglicemiante, sendo capaz de estimular a secreção de insulina, por meio do aumento da liberação do peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP-1). Apesar de relatos de alguns estudos envolvendo respostas metabólicas frente a ingestão de amêndoas torradas de barueiros em modelo animal e em seres humanos, ainda há poucas informações científicas a respeito dos efeitos do óleo extraído destas sementes sobre o controle glicêmico. Portanto, o estudo dos efeitos do óleo de baru sobre a saúde se faz necessário possibilita a descoberta de novas propriedades e usos terapêuticos do óleo além de ser relevante para a segurança alimentar, já que este é consumido pela população do cerrado brasileiro, como produto da culinária local. Sendo assim, este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial insulínico do óleo de baru em ensaios de cultura celular e *in vivo*. Para a cultura de células serão usadas células produtoras de insulina (RINm5F) que serão cultivadas em meio RPMI 1640. As células serão plaqueadas, cultivadas e expostas a diferentes concentrações de glicose e do óleo de baru. Como controle serão utilizados fármacos indutores da liberação de insulina. O sobrenadante da cultura celular será utilizado para a determinação da concentração de insulina e expressão de PKC e GPR40. Para o estudo *in vivo*, os ratos serão divididos em 9 grupos diferentes, o diabetes mellitus tipo 2 será induzido por meio de dieta hiperlipídica e injeção de estreptozotocina em baixa dosagem. Os animais receberão óleo de baru em concentrações variadas por meio de gavagem. Serão dosados: glicemia de jejum, insulina, glucagon, frutossaminas, marcadores do perfil lipídico, marcadores do perfil hepático. Serão calculados os fatores de HOMA-IR e HOMA β . Será realizada análise histopatológica do fígado para avaliação do glicogênio hepático. O pâncreas será homogeneizado em tampão Tris-HCL a 4°C e centrifugado para análise da expressão de GPR40 por Western blotting. As concentrações de insulina e GLP-1 serão determinados por Elisa.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus Tipo 2. *Dipteryx alata*. Hipoglicemiantes. Alimento Funcional.

Auxílio financeiro: Fapemig (Processo APQ 00637-16), CAPES (Código de Financiamento 01).

Efeitos do hipotireoidismo induzido experimentalmente sobre o comportamento depressivo e na farmacocinética da venlafaxina em ratos *Wistar* adultos

Milton Kennedy Aquino Júnior¹, Silvia Graciela Ruginsk Leitão², Vanessa Bergamin Boralli Marques³.

¹ Mestrando em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas

² Docente do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas

³ Docente da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas
miljunior1@hotmail.com

O hipotireoidismo é um distúrbio com alta incidência mundial, sendo sua maior causa relacionada à deficiência de iodo na dieta. Geralmente o aparecimento é gradual, levando vários anos para desenvolver sintomas e sinais notáveis. A doença é caracterizada pela baixa ou falta de produção dos hormônios tireoidianos (HT) pela glândula da tireoide, ocorrendo por diversos fatores, como autoimunes, deficiência de iodo, doenças infiltrativas ou desenvolvimento anormal da glândula. Indivíduos com hipotireoidismo geralmente desenvolvem comorbidades relacionadas à falta dos HT, como exemplo de uma dessas doenças está a depressão. Em alguns casos, pacientes com depressão não respondem bem ao tratamento com fármacos antidepressivos, sendo uma possível causa para este fato, a falta de reposição hormonal de tiroxina (T4). Por este motivo, este trabalho busca avaliar se o hipotireoidismo induzido experimentalmente, com reposição ou não de T4, altera a farmacocinética da venlafaxina, buscando correlacionar o hipotireoidismo a um comportamento depressivo em ratos *Wistar* machos. A avaliação foi feita comparando-se ratos com indução experimental ao hipotireoidismo por duas formas diferentes, através da tireoidectomia e tratamento com metimazol (MMI), com reposição e sem a reposição hormonal de T4 (20µg/kg/dia v.o). Foram considerados animais controles do procedimento cirúrgico aqueles submetidos à cirurgia simulada (Sham). Para caracterização do quadro de hipotireoidismo foram realizadas dosagens hormonais de T4 livre, hormônio estimulador de tireócitos (TSH), bem como a medida das massas de tecidos relacionados à função do eixo tireoidiano [hipófise, adeno-hipófise, tecido adiposo marrom (TAM), tecido adiposo branco (TAB) perigonadal e a tireoide]. Para avaliação do comportamento depressivo foram realizados os testes de nado forçado e de preferência à sacarose. Em relação a farmacocinética, foram realizadas as coletas de sangue com volume de 0,3mL em tubos com heparina nos tempos: 0,16; 0,33; 0,5; 1,0; 1,5; 2,5; 3,5; 5,0; 8,0 e 12,0h, sendo separado o plasma e armazenado em -70°C para posterior análises. De acordo com os resultados obtidos até o presente momento, os grupos Tireoidectomizado (Tx) e MMI sem reposição hormonal apresentaram concentrações plasmáticas significativamente menores de T4 livre ($p < 0,0001$), em relação ao grupo SHAM e os grupos com reposição hormonal. Estes resultados foram corroborados pela análise de massa da adeno-hipófise, tireoide e TAM, nas quais se mostraram reduzidas nos grupos sem reposição para o TAM ($p < 0,05$) e aumentadas para a adeno-hipófise ($p < 0,001$) e a tireoide ($p < 0,0001$), efeitos estes trazidos para os níveis basais (grupo SHAM). Em conjunto, esses resultados apontam o correto funcionamento do mecanismo de retroalimentação negativa no eixo hipotálamo-hipófise-tireoide. Em relação à avaliação do comportamento depressivo, somente o grupo MMI sem reposição demonstrou valores significantes nos testes comportamentais, apresentando maior tempo de imobilidade ($p < 0,0001$) e menor preferência por sacarose ($p < 0,05$) em relação ao grupo SHAM. As análises farmacocinéticas ainda deverão ser realizadas. Diante dos resultados obtidos até o presente momento é possível concluir que o modelo de hipotireoidismo clínico foi reproduzido com sucesso e que o comportamento depressivo foi caracterizado para o grupo MMI sem reposição hormonal.

Palavras-chave: Hipotireoidismo, depressão, farmacocinética

Auxílio financeiro: FAPEMIG, CAPES, CNPq.

Avaliação da expressão do gene *CAP1* em *Candida albicans* tratada com concentrações subinibitórias de antifúngicos

Carla Benedini Ribeiro Jorge Ferreira, Josidel Conceição Oliver, Amanda Latercia Tranches Dias.

Universidade Federal de Alfenas

e-mail: carlabrjf@gmail.com

Ao longo dos anos, estudos têm demonstrado o aumento significativo de infecções fúngicas. Dentre essas infecções destacam-se aquelas causadas por espécies do gênero *Candida* spp., principalmente *Candida albicans*. As espécies apresentam inúmeros fatores associados à virulência e habilidade em evadir o sistema imune do hospedeiro, fazendo com que haja predominância de infecções em âmbito hospitalar e na comunidade, principalmente em indivíduos imunocomprometidos. No hospedeiro, as células fagocíticas respondem a diversos estímulos microbianos com produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), responsável, em parte, pela atividade microbicida dessas células, que atuam a nível proteico, lipídico e genético. Na resposta central frente ao ambiente oxidante encontra-se o gene *CAP1*, do inglês “adenylate cyclase-associated protein”, responsável pela ativação de diversos outros genes associados ao estresse oxidativo, e, cuja requisição à tolerância ao ambiente oxidante por *C. albicans* é conhecida. Os antifúngicos utilizados na clínica, tanto com finalidade profilática ou de tratamento, incluem anfotericina B, fluconazol e caspofungina. Vem sido atribuído a estes, como mecanismo de ação adicional, o aumento da produção de ERO, o que pode contribuir com o efeito positivo do tratamento, mas, em contrapartida, pode colaborar com o aumento da resistência do fungo à essas espécies. O trabalho visou análise da expressão do gene *CAP1*, mediante RT-qPCR, de *C. albicans* SC5314 tratadas com concentrações subinibitórias de anfotericina B, $\frac{1}{4}$ IC 0,03125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, fluconazol $\frac{1}{4}$ IC 0,03125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e caspofungina $\frac{1}{8}$ IC 0,008 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Foi constatado que o subtratamento com o fluconazol aumentou em 5x a expressão de *CAP1*, enquanto a caspofungina modulou positivamente em 11x a expressão do gene. Doses ditas subterapêuticas ou subinibitórias, são administradas em pacientes com finalidade profilática, como aqueles portadores do vírus da imunodeficiência humana. Diversos estudos relacionam essas subdoses sendo benéficas para espécies desse gênero, contribuindo para a invasão, aderência e colonização efetiva de tecidos. Nesse caso, a superexpressão do gene *CAP1*, pode induzir a expressão de outros genes antioxidantes, como os da família das superóxido dismutases e catalase, e colaborar na defesa e sobrevivência do fungo frente a ERO produzida durante o processo fagocítico.

Palavras-chave: Candidíase; Expressão gênica; Espécies reativas de oxigênio.

Auxílio financeiro: FAPEMIG; CAPES.

Impacto do tratamento com ravuconazol e anlodipino no perfil de citocinas de camundongos experimentalmente infectados por *Trypanosoma cruzi*.

Victor Lima de Sousa Machado¹, Yara Almeida Machado¹, Ivo Santana Caldas¹, Caroline Vicente Oliveira¹, Breno Vilas Boas Raimundo¹, Maria Terezinha Bahia, Livia Figueiredo Diniz Castro¹.

¹Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL/MG - Departamento de Patologia e Parasitologia. victor.lima1997@hotmail.com

A doença de Chagas constitui um importante problema médico e social, sendo responsável por relevante morbidade e mortalidade em diversos países da América Latina, incluindo o Brasil. Na ausência de tratamento etiológico eficaz, o parasitismo por *T. cruzi* pode induzir o desenvolvimento de um processo inflamatório crônico, seguido de fibrose, que ocasiona arritmias, fenômenos tromboembólicos e insuficiência cardíaca. Dados obtidos por meio de estudos pré-clínicos e clínicos demonstram que a evolução para formas clínicas cardíacas está relacionada ao desequilíbrio da relação parasito-hospedeiro, especialmente no que tange à polarização da resposta imune celular para o perfil Th1. Deste modo, na busca de novas terapias contra a doença de Chagas deve ser considerado, além do potencial tripanossomicida dos fármacos, a influência do tratamento na resposta imune do hospedeiro. Recentemente nosso grupo de pesquisa identificou que a associação de ravuconazol e anlodipino tem efeito sinérgico na eliminação da infecção por *T. cruzi*. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar o impacto do tratamento com esta associação de fármacos no perfil de citocinas de camundongos experimentalmente infectados pela cepa Y de *T. cruzi*. Camundongos *Swiss* infectados por formas tripomastigotas, foram tratados por via oral durante 20 dias consecutivos com uma subdose de ravuconazol (5 mg/Kg) isoladamente e em associação com 10 mg/Kg de anlodipino. Grupos controle constituídos de animais infectados e não infectados e tratados ou não foram incluídos. Como terapia de referência foi utilizado o benznidazol, a 100 mg/Kg. A parasitemia foi avaliada diariamente até 30 dias após o tratamento. Neste mesmo ponto, foram coletadas amostras de sangue para obtenção de plasma, utilizado para quantificação das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6, IL-17, IL-10 e IL-4 por citometria de fluxo utilizando o kit BD-CBA (*Cytometric Beads Array*) Th1/Th2/Th17. Os resultados mostraram que o tratamento com anlodipino não foi capaz de interferir significativamente no parasitismo, enquanto o ravuconazol isolado e em combinação com o anlodipino levou à supressão completa da parasitemia durante o tratamento. A administração dos fármacos aos animais não infectados não levou a alterações nos níveis de citocinas, independentemente do esquema terapêutico. Já na presença da infecção, como esperado, foi observada intensa produção de citocinas dos diferentes perfis, com níveis similares detectados entre camundongos não tratados e tratados com anlodipino isoladamente. Por outro lado, o ravuconazol em monoterapia induziu redução significativa nos níveis de todas as citocinas avaliadas, o que corrobora com a redução da carga parasitária. De maneira interessante, nos animais tratados com a combinação, os níveis das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , TNF- α foram inferiores aos observados com a administração isolada de ravuconazol e anlodipino e similares aos detectados nos animais tratados com o fármaco de referência. Estes resultados mostram que a administração concomitante de ravuconazol e anlodipino interfere positivamente na fase aguda da infecção experimental pela cepa Y de *T. cruzi*, induzindo equilíbrio na resposta inflamatória resultante do parasitismo.

Palavras-chave: doença de Chagas, combinação de fármacos, citocinas.

Auxílio financeiro: Fapemig; CNPq; Unifal-MG.

Desenvolvimento e validação de métodos físico-químico e microbiológico para diferentes formulações de cápsulas de sulfato de neomicina 500mg

Rayssa Araújo dos Santos, Thulio Wliandon Lemos Barbosa, Lilian Pereira Franco, Marcus Vinícius Martins Rubatino, Rudy Bonfilio, Magali Benjamim de Araújo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).
Email: rayssa.arast@gmail.com

O sulfato de neomicina é um antibiótico aminoglicosídeo utilizado para inibir o crescimento de bactérias gram-positivas, gram-negativas e micobactérias. Além disso, este fármaco é utilizado em diversas preparações farmacêuticas, como oftálmicas, tópicas, orais e administração intravenosa, devido à sua alta solubilidade em água. Em estudos de formulações é necessário que o método utilizado para quantificar o fármaco seja adequado para a finalidade pretendida. Os objetivos deste projeto consistiram na validação de métodos analíticos físico-químicos e microbiológico de acordo com a RDC nº166/2017 da ANVISA para determinação quantitativa de sulfato de neomicina cápsulas além da análise estatística dos métodos para as diferentes formulações. A validação do método foi conduzida segundo os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação, limite de detecção e robustez. O método espectrofotométrico foi realizado a partir de uma reação de complexação de sulfato de neomicina com cobre em tampão Tris pH 6,8. O método microbiológico foi validado a partir do ensaio por difusão em ágar descrito na farmacopeia Brasileira 2010 utilizando como microrganismo cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, e a potência foi calculada a partir da equação de Hewitt. Foram realizados dois planejamentos fatoriais completos 2^3 para escolha das formulações tendo como parâmetros os excipientes lactose e manitol para um planejamento, e amido e celulose para o outro, tempo de mistura (2 e 5 minutos) como segundo fator e a quantidade de aerosil como terceiro fator. Os resultados de comparação das formulações escolhidas foram analisados pela estatística *T-student* no software BioStat 5.0. A reação de complexação no método espectrofotométrico se mostrou seletiva e linear na faixa de concentração de 525, 750 e 975 $\mu\text{g mL}^{-1}$, apresentando equação de $y=0,0007x+0,3407$ ($r=0,9958$), DRP entre 1,11 – 3,79% e robustez. No método microbiológico, o intervalo de concentração foi de 0,5 – 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, apresentando seletividade com equação de $y=6,2268x+2,9858$ ($r=0,9968$), precisão DPR = 5,47%, e robustez para o período de 24h com a utilização de templates. As formulações propostas para sulfato de neomicina atenderam aos requisitos e especificações farmacêuticas estabelecidas pelos códigos oficiais, com valores de potência entre 90 a 125%. Embora a análise estatística de comparação entre os dois métodos se demonstraram diferentes ($p < 0,05$), ambos apresentam vantagens na sua utilização na rotina do controle de qualidade.

Palavras-chave: Sulfato de neomicina, formulações farmacêuticas; físico-químico, microbiológico; RDC 166/2017.

Auxílio financeiro: Chamada CNPq/ANVISA nº 12/2015.

Estudos de liberação da donepezila a partir de um sistema precursor de cristal líquido de fase hexagonal

Isabelly Fernanda Ferraz de Souza, Thaís Queiroz, Cíntia Alves, Flávia Chiva Carvalho, Gislaine Ribeiro Pereira

Universidade Federal de Alfenas/ Departamento de alimentos e medicamentos, Ciências Farmacêuticas
isabellyfernanda2010@hotmail.com

A doença de Alzheimer é uma desordem neurodegenerativa que atinge cerca de 50 milhões de pessoas mundialmente. Uma das terapias mais utilizadas no tratamento dessa patologia é por meio da administração de fármacos inibidores reversíveis da enzima acetilcolinesterase, como a donepezila, que se encontra disponível comercialmente como comprimido para administração oral. A administração oral desse fármaco apresenta inúmeros efeitos adversos como diarreia e náusea, por essa razão, tem-se estudado novos sistemas de liberação para vias de administração alternativas. A via de administração nasal supera os efeitos adversos gástricos e a barreira hematoencefálica, porém pode acarretar baixa disponibilidade dos fármacos em decorrência do curto tempo de contato das formulações com a cavidade nasal, devido a depuração mucociliar. Diante do exposto, o presente trabalho se propôs a desenvolver um sistema para administração nasal de donepezila, que apresentasse características de gelificação *in situ* e bioadesividade, e com isso fosse capaz de aumentar a biodisponibilidade nasal do fármaco. Para tanto, construiu-se um diagrama de fases ternário combinando diferentes proporções de CETEH-10, ácido oleico e água, caracterizou-se os sistemas obtidos macroscopicamente e por microscopia de luz polarizada e aqueles considerados possíveis precursores de cristais líquidos foram avaliados quanto a capacidade de gelificação *in situ*. Os sistemas constituídos CETETH – 10:ácido oleico:água nas proporções (50:45:5) e (40:45:15) gelificaram com a menor proporção de água (11,7 %) e formaram fase hexagonal. Esses sistemas foram avaliados segundo suas capacidades de carregamento, sendo capazes de incorporar 5 e 25mg de DNP/ml de sistema, respectivamente. Também foram verificadas suas propriedades mecânicas, sendo consideradas satisfatórias. Posteriormente, foram realizados estudos de liberação *in vitro* da donepezila a partir dos dois sistemas já citados anteriormente, nas concentrações de 5 e 25mg/ml, respectivamente e de uma solução de DNP em água na concentração de 5mg/ml, utilizada como controle comparativo. O estudo de liberação foi realizado empregando-se células de difusão vertical tipo “Franz” (Hanson Research Corporation, modelo sistema Microette Plus®) e membrana sintética de acetato de celulose Spectra/Por® com poros de 12 – 14 KDa. A solução receptora utilizada foi tampão fosfato 20 mM, pH 6,8, mantida sob agitação de 300 rpm/min e à temperatura de 32 °C, com o intuito de simular o ambiente nasal. 200µl dos sistemas em análise e da solução do fármaco em água foram colocados sobre a membrana, alíquotas de 1mL da solução foram coletadas nos intervalos de 0,5; 1; 1,5; 3; 4; 6 e 8 horas e a concentração de DNP liberada foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência. Os resultados obtidos nos estudos de liberação *in vitro* foram plotados graficamente como concentração cumulativa liberada por área de difusão (µg/cm²) em função do tempo em horas e diferentes modelos cinéticos foram aplicados. Os resultados do teste de liberação demonstraram que os sistemas foram capazes de controlar a liberação de DNP, sugerindo obedecer a cinética de liberação de Higuch. Os resultados apontaram o sistema precursor de cristal líquidos de fase hexagonal desenvolvido como promissor para administração nasal de donepezila no tratamento do Alzheimer e estudos da farmacocinética plasmática e cerebral da donepezila em ratos estão sendo conduzidos.

Palavras-chave: Alzheimer. Donepezila. Nasal. Cristal líquido. Liberação.

Auxílio financeiro: Capes

Estudo estrutural e físico-químico de formas sólidas da buclizina

Monalisa Bitencourt, Olimpia Maria Martins Santos Viana, Cristiane Cabral Melo, Jennifer Tavares Jacon Freitas e Antonio Carlos Doriguetto.

Universidade Federal de Alfenas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Instituto de Química, mestrado em Ciências Farmacêuticas.
monabitencourt@yahoo.com.br

No cenário atual, grande parte dos medicamentos comercializados, apresenta baixa solubilidade aquosa. Aproximadamente metade das formulações sólidas possuem o IFA (do inglês Active Pharmaceutical Ingredients) em forma de sal devido à baixa solubilidade normalmente apresentada pelos ácidos e bases livres. Sabe-se que para um medicamento ser eficiente, seu IFA deve possuir solubilidade adequada nos meios fisiológicos para conseguir chegar no seu local de ação. O fármaco de estudo deste trabalho é o Dicloridrato de Buclizina, IFA de baixa solubilidade, derivado piperazínico que apresenta atividades anti-histamínicas, antimuscarínicas, orexígenas e antieméticas. Apesar de ter sido lançado no mercado há mais de 60 anos, não há estrutura determinada para nenhuma forma sólida da buclizina e nem classificação no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB). Objetivos: elucidar as estruturas cristalinas da buclizina, obter novas formas e correlacionar com as propriedades de interesse farmacêutico como solubilidade, perfil de dissolução e estabilidade. Para a obtenção das novas formas, foram realizadas diversas recristalizações com diferentes solventes e o produto final foi caracterizado por difração de raios X por policristais (DRXP), espectrofotometria na região do infravermelho (IV) e análises térmicas (calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG)). Comprimidos contendo a buclizina base livre, o dicloridrato e o monoclórídrico foram produzidos individualmente e sua qualidade foi verificada pelos testes de dureza, friabilidade, peso médio. Para a quantificação da buclizina nos ensaios solubilidade, teor e perfil de dissolução dos comprimidos um método previamente desenvolvido por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi parcialmente validado para aplicação. Duas estruturas anídras inéditas foram obtidas e elucidadas mediante a técnica de difração de raios X por monocristais: o monoclórídrico, o dicloridrato de buclizina. As formas monoclórídrico, dicloridrato e buclizina base livre foram caracterizadas pelas técnicas de DRXP, IV, TG/DSC e HPLC. O ensaio de solubilidade em equilíbrio, na faixa de pH fisiológico demonstrou que o dicloridrato é a forma mais solúvel ($16,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$), seguida pelo monoclórídrico ($3,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e base livre (não determinado), em pH 4,5. Acima desse pH, todas as formas são insolúveis. O perfil de dissolução realizado em tampão pH 4,5 + 1,0 % lauril sulfato de sódio, demonstrou diferenças entre as formulações. A estabilidade realizada a 40 °C e 75% de umidade relativa demonstrou que o IFA nos comprimidos se mantiveram estáveis. Com a realização deste trabalho foi possível criar parâmetros para o controle de qualidade da forma comercial dicloridrato de buclizina, buclizina base livre e monoclórídrico de buclizina contribuindo com a segurança e eficácia deste medicamento.

Palavras-chave: Buclizina. Determinação estrutural. Caracterização. Solubilidade. Estabilidade. Perfil de dissolução.

Auxílio financeiro: CAPES.

Determinação de ácidos biliares empregando fase sólida molecularmente impressa no preparo de amostras de soro

Gabriela Berti Colombo, Alberto Silveira, Isarita Martins.

Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL - MG
gabrielabertic@gmail.com

Solventes orgânicos voláteis como o benzeno, tolueno e xilenos (BTX) formam uma perigosa mistura presente em atividades relacionadas ao processamento do petróleo, nas refinarias, oferecendo grande risco aos trabalhadores expostos. Absorvidos principalmente na forma de vapor, são rapidamente levados à corrente sanguínea e são metabolizados pelas enzimas microsossomais hepáticas do sistema citocromo P450 (CYP). A ocupação dessa via metabólica promove mudanças na concentração de ácidos biliares no sangue (são produzidos a partir do metabolismo hepático do colesterol e são armazenados na vesícula biliar) em níveis milimolares. Como se trata de analitos com concentrações muito baixas, se torna necessário um preparo de amostra mais sofisticado. A extração em fase sólida é uma técnica tradicional no preparo de amostras que contorna questões relacionadas ao efeito matriz e detectabilidade através da pré concentração e remoção de interferentes, porém, em busca de maior sensibilidade, seletividade, recuperação e precisão nas determinações bioanalíticas, novos processos de tratamentos de amostras foram desenvolvidos como por exemplo os polímeros de impressão molecular (Molecularly Imprinted Polymer - MIP). Na análise em cromatografia líquida, foi usado um sistema column switching onde alguns microlitros da amostra passavam pelo material, e após a pré concentração, seguiam em direção à uma segunda coluna de separação onde os ácidos biliares de fato eram separados e então seguiam ao detector UV e de massas para a análise. Dessa forma, o objetivo do estudo foi sintetizar e caracterizar os RAMIP-BSA e otimizar um método analítico, usando polímeros impressos molecularmente de acesso restrito revestidos com albumina sérica bovina (RAMIP-BSA), para posterior detecção/quantificação de ácidos biliares por Cromatografia Líquida acoplada ao Espectrômetro de Massas (LC-MS/MS), visando o desenvolvimento de um método que poderá ser aplicado no biomonitoramento de indivíduos expostos ao BTX. O material foi sintetizado e revestido, com controle e aplicação de testes, tais como: espectroscopia no infravermelho, testes de cinética e isoterma e pH ótimo de adsorção. Assim, foram estabelecidas as condições otimizadas de análise no Ultra High Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometer (UHPLC-MS/MS), utilizando eletrospray como fonte de ionização no modo negativo (ESI -), com voltagem de ionização de -3,5kV, com monitoramento da análise de 0 a 35 minutos no sistema. A razão m/z monitorada para o ácido cólico foi 407,20 e para o ácido ursodeoxicólico foi 391,35. Vazão de gás de nebulização de 2 L min⁻¹, fluxo do gás de secagem de 15 L min⁻¹, sob a temperatura de 250°C na linha de dessolvatação e 400°C no Heatblock. O RAMIP-BSA foi previamente empacotado em uma coluna de extração que, durante a análise fica disposta anterior à coluna analítica de separação no equipamento. Através da síntese, foi possível obter um material com características adequadas para o processo de separação e a partir do método descrito, foi possível analisar parâmetros de linearidade, precisão e exatidão de curvas analíticas de amostras diluídas 3 e 4 vezes. Tais resultados nos mostram que o RAMIP-BSA sintetizado é um material com capacidade de reter os ácidos biliares no soro sanguíneo de forma expressiva. Com os dados obtidos experimentalmente, foi possível concluir que os RAMIP-BSA são polímeros capazes de reter significativamente os AB em amostras de soro, nas condições e no sistema em questão podendo assim ser usados, após otimização e validação, no biomonitoramento da exposição ao BTX, de forma efetiva e prática, demonstrando ter potencial para ser aplicada de forma rotineira nas análises desses bioindicadores de efeito.

Palavras-chave: toxicologia ocupacional, LC-MS/MS, biomonitoramento, RAMIP-BSA.

Auxílio financeiro: CNPq.

Uso de nanopartículas de albumina sérica bovina para o preparo de amostras complexas

Mariana Azevedo Rosa, Henrique Dipe de Faria, Dialison Teixeira de Carvalho, Eduardo Costa de Figueiredo

Universidade Federal de Alfenas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Análises de Toxicantes e Fármacos
mariana-azevedo@hotmail.com.br

O preparo de amostras é fundamental para o procedimento analítico e é a etapa que apresenta maiores possibilidades de erros e contaminações, e na qual geralmente é dispendido o maior tempo. Os materiais de acesso restrito (RAMs) são desenvolvidos e aplicados para minimizar as dificuldades presentes no preparo de matrizes complexas (como as biológicas, as alimentares e as ambientais) e para serem uma alternativa viável às técnicas clássicas como a precipitação de proteínas (que apresenta limitações como diluição e a variação do pH das amostras, além de baixa seletividade). Uma das estratégias empregadas para a obtenção de RAMs é o uso da albumina sérica bovina (BSA) como uma camada externa em materiais já utilizados em preparo de amostras (sílica, polímeros e nanotubos de carbono, por exemplo). Assim, o material passa a apresentar a capacidade de excluir macromoléculas interferentes (principalmente proteínas) por mecanismos físicos e químicos, e, concomitantemente, extrair os compostos de interesse de baixo peso molecular (como fármacos e seus metabólitos) e metais. No entanto, uma pergunta ainda não respondida é se a BSA também apresenta a capacidade de se ligar aos analitos, uma vez que a albumina é frequentemente utilizada em sistemas de *drug delivery*, nos quais a proteína pode ser conjugada com diversos fármacos. Nesse contexto, tem-se o objetivo principal do trabalho: a síntese de nanopartículas de BSA (sem materiais suporte) e o seu uso como RAM em sistemas de extração em fase sólida (uso inédito desse material) para a determinação de β -bloqueadores em plasma humano não tratado. As novas nanopartículas de acesso restrito (RANPs) foram sintetizadas por processo de coacervação (usando-se BSA, tampão fosfato 0,2 mmol L⁻¹ pH=5,00, etanol, glutaraldeído 25% e borohidreto de sódio 1% como reagentes de síntese) e caracterizadas por técnicas diversas (infravermelho, análises termogravimétricas, potencial zeta e microscopias). A exclusão de proteínas foi avaliada tanto para uma solução de BSA (44 g L⁻¹) quanto para plasma branco não tratado. Moléculas com alta (propranolol) e baixa (atenolol) taxa de ligação a proteínas plasmáticas foram utilizadas para avaliar a capacidade extrativa do material sintetizado. Bandas características da estrutura secundária da albumina, estabilidade térmica até aproximadamente 215°C, cargas de superfície de ± 35 mV, ponto isoelétrico de 4,06 e tamanho de 311 ± 96 nm foram resultados obtidos durante a caracterização. Atenolol e propranolol foram rapidamente e eficientemente extraídos das amostras, de acordo com os testes de cinética e isoterma de adsorção. Aproximadamente 100% das proteínas percoladas pelas nanopartículas foram excluídas para ambos os testes realizados, mostrando a eficiência do material como um meio de acesso restrito. O procedimento de preparo de amostras consistiu em uma microextração em fase sólida usando uma fibra preparada a partir da fixação das RANPs em um capilar de vidro. Três etapas distintas foram realizadas i) fibra foi mergulhada por 10 min em 200 μ L de plasma diluído em NaCl (4:1 v:v), para a extração dos analitos ; ii) limpeza da fibra em água ultrapura por 5 s, para se retirar o excesso de matriz da superfície extratora; iii) fibra foi mergulhada em 200 μ L de fase de eluição - metanolol:água (70:30 v:v) por 2 min, para a dessorção dos fármacos retidos. Atenolol, metoprolol e propranolol foram extraídos de plasma humano não tratado e analisados por LC-MS/MS. O método foi otimizado e validado apresentando coeficientes de correlação superiores à 0,99 para as faixas de trabalho analisadas (100-1200, 80-1000 e 15-200 μ g L⁻¹, para atenolol, metoprolol e propranolol, respectivamente), precisão e exatidão adequadas (segundo guias de validação) e robustez para sete parâmetros avaliados. Dez amostras puderam ser simultaneamente extraídas em aproximadamente 15 min e a análise por LC-MS/MS permitiu

uma frequência analítica de 20 amostras/h. Plasma de pacientes em tratamento com os β -bloqueadores em estudo foram eficientemente analisadas com o método proposto, tornando possível o uso do mesmo para monitoramento terapêutico e ajustes de doses. As fibras provarem ser úteis, simples, reproduzíveis, resistentes e de baixo custo, sendo uma alternativa viável para o preparo de amostras biológicas com diversas possibilidades de aplicação.

Palavras-chave: preparo de amostras, albumina sérica bovina, nanopartículas, microextração em fase sólida

Auxílio financeiro: Capes ; CNPq; Fapemig.

Prevalência de *Helicobacter pylori* em pacientes na região do Vale do Paraíba – SP

Fabiana Moreira Cascardo, Adriano Moraes da Silva, Simone Aparecida Biazzi de Lapena, Aline Neves Araújo, Viviane Gadret Bório Conceição, Wendel Simões Fernandes.

Universidade Paulista, Campus Dutra São José dos Campos/ Instituto de Ciência da Saúde, Curso de Farmácia e Biomedicina.

E-mail: fabimoreira_cascardo@hotmail.com

As infecções pela bactéria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) podem afetar a estabilidade da mucosa do estômago, modificando o muco gástrico e comprometendo sua função de proteção, podendo ocasionar doenças gástricas como, gastrite crônica, úlceras ou até mesmo o câncer de estômago. A morfologia da bactéria facilita sua vivência e adaptação no local considerado ideal para seu crescimento. Tendo em vista, a importância clínica de um diagnóstico preciso, para dar início ao tratamento adequado, se faz necessário obter maiores informações sobre a prevalência e incidência, causas e transmissão dessa bactéria. O exame mais comum utilizado para auxiliar no diagnóstico de infecção é a endoscopia, seguido de uma biópsia, retirando pequenos fragmentos da mucosa gástrica, que são depositados em formol e encaminhados para os laboratórios de análises patológicas. Para esse trabalho, foram selecionados no banco de dados de um laboratório situado no município de São José dos Campos, que atende alguns municípios do Vale do Paraíba, pacientes que realizaram biópsia por exame de endoscopia, no período de setembro a novembro de 2018, buscando-se apontar o número de casos positivos nas cidades atendidas pelo laboratório, bem como a idade e sexo prevalente dos pacientes. Sendo assim, o projeto tem como objetivo principal o levantamento da prevalência de positividade bacteriana para *Helicobacter pylori* nas principais cidades do Vale do Paraíba, bem como debater as possíveis causas desses dados. A coleta de dados foi realizada em um intervalo de tempo de três meses, captando todos os pacientes que deram entrada com exames para pesquisa da bactéria *H. pylori* nesse período, resultando em um total de 372 pacientes (n=372). No laboratório em questão, o processo para a análise do exame se inicia com o recebimento das amostras de biópsias gástricas vinda de hospitais e clínicas da região. O material é submetido por uma análise macroscópica, onde se especifica suas características visíveis a olho nú. Logo após, é encaminhado para o setor de histotécnica, no qual será processado até ser transformado em blocos de parafina. Os blocos de parafina são cortados em seções extremamente finas, utilizando o equipamento micrótomo e essas finas camadas contendo o tecido em análise são depositadas em lâminas e coradas, para por fim, serem encaminhadas para a análise microscópica. Sendo assim, foram avaliadas as prevalências de positividade de colonização bacteriana, e posteriormente foi realizada a distribuição dos dados, relacionando a presença da bactéria em pacientes residentes das cidades da região do Vale do Paraíba. Dos pacientes avaliados 20,69% apresentam positividade para a presença da bactéria *H. pylori*, número esse considerado relativamente alarmante, quando comparado a outros trabalhos com o mesmo objetivo, vale ressaltar a relação da presença da bactéria com o desenvolvimento de várias patologias gástricas, incluindo possível desenvolvimento de câncer estomacal, uma possibilidade a ser discutida é presença de um número ainda maior do que o obtido no presente estudo, já que muitos pacientes sintomáticos não procuram atendimento médico e acabam buscando o recurso da automedicação, e portanto acabam não realizando o exame. Dos casos positivos encontrados 53,25% são homens e 46,75% são mulheres, achado este que demonstra uma distribuição muito semelhante entre as duas classes, reforçando assim que o alerta sobre o possível diagnóstico de *H. pylori* deve ser realizado de maneira ampla, corroborando assim com outros trabalhos já publicados. Entre as faixas etárias a presença da bactéria se revelou maior na faixa entre 41-50 anos (31,17%) seguida da população entre 31-40 anos (23,38%), reforçando assim a necessidade de conscientizar os mais idosos e os mais jovens sobre a importância da investigação de sintomas referentes ao problema. É possível perceber um número relativamente alto de casos de *H. pylori* na região do Vale do Paraíba, quando comparados a outros estudos

publicados com o mesmo objetivo, desta forma se torna importante o desenvolvimento de novos trabalhos que reforcem esses dados e busquem evidenciar a relação entre as características da região, o estilo de vida da população nela inserida e o aumento dos casos de infecção pela bactéria *H. pylori*.

Este trabalho contou com auxílio financeiro próprio.

Síntese de derivados da licarina A como agentes tripanocidas potenciais

Dalila Junqueira Alvarenga; Laira Maria Faria Matias; Lucas Martins de Oliveira; Diogo Teixeira Carvalho

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG.
dalila.j.alvarenga@gmail.com

A Doença de Chagas ou Tripanossomíase americana é uma doença infecciosa que afeta principalmente a América Latina. É causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), que vive e se reproduz em diversas células e tecidos. Classificada como uma antroponose, a Doença de Chagas é transmitida ao homem pelas fezes contaminadas do inseto vetor, denominado de Triatomíneo ou barbeiro. Os sinais e sintomas da doença são bastante variáveis, podendo passar por uma fase aguda (surgimento de chagomas), uma fase assintomática ou indeterminada e, por fim, uma fase crônica, relacionada aos efeitos mais graves da doença nos órgãos atingidos, geralmente coração e intestino, levando a diversas complicações e mesmo ao óbito. O tratamento disponível é ineficaz para todas as fases da doença, atuando principalmente da fase aguda, além de existirem poucos medicamentos para o combate a esta infecção, sendo o benznidazol o tratamento de escolha. As neolignanais são metabólitos secundários encontradas em determinadas espécies vegetais e são formados pelo acoplamento de unidades alil e propenilfenólicas, sendo a licarina A um de seus representantes que exerce diversas atividades biológicas já bem relatadas, como a tripanocida. Ainda não há descrito o alvo de ação molecular da licarina A, porém há evidências de que a mesma se envolve em processos relacionados a danos oxidativos, o que levanta a possibilidade de envolvimento com a tripanotona-redutase. Dessa forma, a licarina A mostra-se uma substância promissora como ponto de partida para o desenvolvimento de agentes tripanocidas otimizados. Tendo em vista a atividade tripanocida descrita da licarina A, tem-se por objetivo sintetizar derivados da mesma, a fim de obterem-se substâncias mais ativas e avaliar as relações estrutura-atividade envolvidas. Primeiramente, foi avaliada a obtenção da licarina A por três métodos diferentes já descritos (com reagentes químicos oxidantes ou com auxílio de oxidantes biológicos, i.e. água de coco verde (*Cocos nucifera*), fonte de oxidases, e peróxido de hidrogênio). A partir da licarina A foram inicialmente sintetizados derivados por modificação na hidroxila fenólica, por meio de éteres sintetizados por reações clássicas de eterificação empregando dimetilformamida, carbonato de potássio e o haleto de interesse. A obtenção da licarina A mostrou-se mais efetiva pelo método biossintético do que pelos métodos oxidativos tradicionais, com rendimento líquido de 40% após purificação por cromatografia em coluna de sílica - CCS. Ao realizar o ensaio de desvio da luz polarizada foi observada a obtenção da mistura racêmica da substância, ao contrário do descrito na metodologia empregada, na qual consta a obtenção apenas do derivado levógiro. As reações para obtenção dos derivados eterificados tiveram rendimentos médios de 75% e foram inseridos à hidroxila fenólica da licarina A os grupos metila, alila, prenila, n-octila, benzila, 4-nitro-benzila, 4-metóxi-benzila e 4-flúor-benzila. Os produtos obtidos tiveram suas estruturas confirmadas por espectrometria de ressonância magnética nuclear. Foram obtidos com sucesso oito derivados da licarina A, os quais se encontram em fase de avaliação da atividade tripanocida *in vitro* e estudos de citotoxicidade.

Auxílio financeiro: Agradecemos à CAPES pela concessão de auxílio financeiro para a execução desse projeto.

Análise do crescimento bacteriano de fígado de camundongos infectados e não infectados com *Schistosoma mansoni*.

Matheus Pereira de Araújo, Micaella Sales Pereira, Gabriel Augusto Pires de Souza, Luiz Felipe Leomil Coelho, Raquel Lopes Martins Souza, Marcos José Marques.

Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) - Instituto de Ciências Biomédicas - Alfenas - MG - Brasil.

matheus_araujo88@hotmail.com

A esquistossomose, doença crônica causada pelo *Schistosoma mansoni*, afeta milhões de pessoas ao redor do mundo. Na evolução da doença, há um comprometimento da estrutura morfológica e funcional do trato gastrointestinal, e nestas condições, as bactérias da própria microbiota podem atingir outros órgãos e até mesmo levar à septicemia. Sendo o fígado o principal órgão afetado durante o desenvolvimento da doença, seu comprometimento pode não estar somente relacionado à formação de granulomas - devido a presença do ovo do parasito - mas também, bactérias advindas do intestino ou podem ser carregadas pelos vermes adultos. Desta forma, este trabalho teve como objetivo identificar se há ou não crescimento bacteriano à partir da análise do fígado de camundongos infectados por *S. mansoni* (Sm) e camundongos não infectados. Camundongos BALB/c não infectados (n=3) e infectados (n=3) foram eutanasiados; uma porção do fígado foi retirada, macerada e plaqueada em ágar BHI (Brain Heart Infusion), Bile Esculina, EMB (Eosin Methylene Blue) e MRS (deMan, Rogosa e Sharpe). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Alfenas com número de registro 04/2018 (Nº Protocolo: 23087.000912/2018-10). Não foi observado crescimento bacteriano nas placas do grupo controle; no Animal 3 da placa contendo BHI; e nos três animais das placas contendo MRS. Porém, foi observado crescimento no grupo Sm nas placas contendo BHI - Animais 1 ($1,63 \cdot 10^3$ UFC/mg) e 2 ($1,6 \cdot 10^2$ UFC/mg); EMB - Animais 1 - ($0,5 \cdot 10^2$ UFC/mg), 2 e 3 ($0,58 \cdot 10^2$ UFC/mg cada); Bile esculina - Animais 1 ($3,8 \cdot 10^2$ UFC/mg), 2 ($0,35 \cdot 10^2$ UFC/mg) e 3 ($0,14 \cdot 10^2$ UFC/mg). A associação das bactérias ao *S. mansoni* possibilita infecções bacterianas mais prolongadas, o desenvolvimento de resistência a antibióticos e a ineficácia de tratamento de ambas as infecções. Há trabalhos que relatam a associação de bactérias ao *S. mansoni*, e demonstraram dificuldades no tratamento das infecções bacterianas quando associadas a esquistossomose devido a uma possível resistência aos antibióticos. Em nosso trabalho, também encontramos bactérias no fígado, e a presença destas em outros órgãos é preocupante devido a própria evolução da esquistossomose, que em casos graves, pode levar até mesmo a sepse. A presença de crescimento bacteriano no fígado é um indicativo de que está havendo uma possível translocação bacteriana do intestino para o fígado. Em etapas posteriores, as bactérias serão identificadas e comparadas a microbiota intestinal para entendimento da origem destas bactérias.

Palavras chaves: *Schistosoma mansoni*; Microbiota intestinal; Fígado.

Auxílio financeiro: O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de pregabalina aplicado ao teste de liberação *in vitro* da nanopartícula

Tainara Alves Vendreschi¹, Rafaela Figueiredo Rodrigues¹, Vanessa Bergamin Boralli Marques¹

¹ Laboratório de Análise de Toxicantes e Fármacos, Universidade Federal de Alfenas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alfenas, Minas Gerais, Brasil.
tainalvendreschi@hotmail.com

A pregabalina é um fármaco anticonvulsivante amplamente utilizado para o tratamento da dor neuropática. Entretanto, uma proporção significativa dos pacientes abandona o tratamento devido à efeitos colaterais ocasionado pelo uso do medicamento, incluindo principalmente tonturas, sonolência e problemas cognitivos, o que impacta negativamente na qualidade de vida dos pacientes. Na tentativa de diminuir os efeitos colaterais causados pelo uso de pregabalina, foram desenvolvidas nanopartículas poliméricas (NP's) como carreadoras deste fármaco. Como é uma formulação inédita, alguns testes de caracterização físico-química devem ser realizados, incluindo o perfil de liberação *in vitro* da pregabalina. Para isso, faz-se necessário desenvolver e validar um método analítico para quantificar a pregabalina liberada das NP's, garantindo assim a confiabilidade das análises. A validação analítica foi realizada com base nos critérios estabelecidos pela Resolução 166, de 24 de julho de 2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e os parâmetros avaliados foram linearidade, seletividade, exatidão, precisão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez. Para isso, a curva analítica foi construída utilizando soluções de pregabalina nas concentrações de 0,06, 0,08, 0,1, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 mg/mL diluídas em tampão fosfato de potássio pH 7,4 e derivatizada com solução de ninidrina 0,2% diluída em álcool etílico. Posteriormente, os tubos foram agitados por 1 minuto a 1500rpm, levados a banho-maria a 70°C por 30 minutos e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV/Vis, no comprimento de onda de 403nm. A metodologia desenvolvida demonstrou-se linear na faixa de 0,06 a 0,6 mg/mL, obtendo um coeficiente de correlação (r) de 0,99015, superior ao especificado na RDC 166/2017 (0,99). A precisão e exatidão intercorridas e intracorridas foram comprovadas e os valores obtidos atendem as especificações, sendo menores que 20% para o limite inferior de quantificação (0,06 mg/mL) e menores que 15% para os outros calibradores testados (0,1; 0,3 e 0,5mg/mL). Além disso, o método demonstrou-se seletivo para compostos que apresentam grupamento amina em sua estrutura, como é o caso da molécula de interesse e, por se tratar de um estudo controlado, a pregabalina é o único composto presente no meio reacional com o grupamento amina, portanto, outros compostos não influenciam nesta análise. Ainda, o método mostrou-se robusto à pequenas variações no comprimento de onda e no tempo de agitação mas, não foi robusto para temperatura e tempo de permanência no banho maria, o que é justificável já que a reação de derivatização pela ninidrina é dependente da temperatura, por isso o método foi otimizado, garantindo as melhores condições de preparo. Além do mais, o método apresentou LD e LQ de 0,068mg/mL, mostrando-se adequado para o estudo em questão. Sendo assim, a metodologia desenvolvida e validada demonstrou-se linear, seletiva, precisa, exata e robusta, garantindo a adequação e eficácia para o objetivo proposto.

Palavras-chave: Pregabalina. Nanopartículas. Ninidrina. Validação

Características sociodemográficas da paracoccidioidomicose no sul do estado de Minas Gerais no período de 2007 à 2017.

Andre Luiz Augusto Brainer¹, Carine Ervolino de Oliveira²

Universidade Federal de Alfenas, Departamento de Patologia, 1. discente do curso de Farmácia;
2. Orientadora.
andreaugustobrainer@hotmail.com

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose granulomatosa sistêmica, causada pelos fungos termodimórficos *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii* e constitui-se uma das principais causas de mortalidade entre as doenças endêmicas parasitárias do Brasil. Estima-se que 50% da população residente em áreas endêmicas á tenha tido contato com o fungo, porém apenas uma pequena parcela desenvolve as manifestações clínicas da doença (SHIKANAY-YASUDA, *et al* 2006.) A doença manifesta-se principalmente em indivíduos do sexo masculino, entre faixa etária de 30 à 60 anos. As mulheres possuem menor suscetibilidade de desenvolvimento da doença devido a proteção desempenhada pelo estrogênio, que impede a transformação dos micélios infectantes em leveduras patogênicas. As desigualdades sociais se configuram como condições de risco para manifestação clínica da PCM, evidenciada pela polarização da doença em áreas desprivilegiadas, o que pode estar ligado ao fato da ausência de notificação compulsória ou pelo declínio das taxas de óbito por PCM em áreas com melhor condição social. Neste contexto, o objetivo do trabalho é fazer uma análise espacial de dados obtidos nos laudos de biópsia pelo Laboratório de Anatomopatologia Bucal do departamento de Patologia da Universidade Federal de Alfenas, possibilitando conhecer a distribuição dos casos de PCM em determinada área geográfica. Partindo da construção social do espaço como um processo histórico, a descrição dos casos de PCM pode trazer contribuições importantes aos estudos epidemiológicos baseados em construtos que utilizam a tríade de pessoas-espaço-tempo (OLIVEIRA, *et al.* 2008.) Sendo assim, torna-se essencial a realização de levantamentos epidemiológicos de boa qualidade que possibilitem o reconhecimento do padrão de distribuição dos casos de PCM, conseqüentemente, a viabilização de estratégias de prevenção e controle mais eficazes, uma política de notificação compulsória como acontece com outras doenças endêmicas além de conhecer mais sobre os aspectos da doença já que apesar de ser considerada uma das micoses sistêmicas mais frequentes no Brasil, possui dados de prevalência desconhecidos ou mal apurados. Essa falta de conhecimento acerca de sua ocorrência, associada a falta de notificação compulsória da PCM categorizam-na como doença negligenciada. Neste contexto, parte-se da casuística e metodologia de estudo retrospectivo dos laudos histopatológicos obtidos no laboratório de Patologia da Unifal-mg, no período de 2007 à 2017, sendo empregado na análise além de idade, gênero e características clínicas e histológicas da lesão, será coletado também o endereço para posterior cruzamento de dados em ferramenta de geoprocessamento, esperando como resultado, determinar a real taxa de prevalência da PCM no Sul de Minas Gerais no período de 2007 à 2017, verificar se os dados obtidos condizem com a literatura atualmente disponível e também posterior divulgação dos resultados por meio de publicação em futuros eventos científicos.

Palavras-chave: paracoccidioidomicose, pcm, granulomatosa, micose sistêmica.

Síntese e avaliação biológica *in vitro* de sulfonamidas potencialmente antiproliferativas, obtidas por hibridação molecular a partir de fenilpropanoides

Helloana Azevedo Barbosa¹; Guilherme Álvaro Ferreira da Silva²; Carolina Faria Silva¹; Bianca Pereira do Vale¹; Thiago Belarmino de Souza³; Danielle Ferreira Dias⁴; Ana Claudia Chagas de Paula⁵; Marisa Ionta²; Diogo Teixeira Carvalho¹.

¹ LQFar, Universidade Federal de Alfenas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas

² LabaInt, Universidade Federal de Alfenas, Instituto de Ciências Biomédicas

³ Universidade Federal de Ouro Preto, Escola de Farmácia

⁴ LFQM, Universidade Federal de Alfenas, Instituto de Química

⁵ Universidade Federal de Juiz de Fora, Escola de Farmácia

azevedohb@gmail.com

O câncer corresponde a segunda principal causa de mortes no mundo, sendo o câncer de mama o principal tipo que acomete mulheres. Vários países têm conseguido reduzir as altas taxas de mortalidade do câncer de mama por meio do diagnóstico precoce e tratamento mais efetivo, contudo, ainda são elevadas as taxas de resistência tumoral e recidiva, que comprometem a sobrevida e principalmente, a qualidade de vida das pacientes durante o tratamento. Neste contexto, a identificação de substâncias com atividade antiproliferativa e pró-apoptótica capazes de controlar o crescimento tumoral e que sejam mais seletivas, diminuindo os efeitos adversos, é de extrema relevância na pesquisa contra o câncer. A maioria dos fármacos atualmente em uso terapêutico teve sua origem nos produtos naturais ou foram planejados quimicamente a partir destes. Produtos naturais bioativos, como os fenilpropanoides, representam moléculas potenciais no tratamento de diversas doenças com altos índices de mortalidade como, por exemplo, os cânceres. O eugenol, pertencente a essa classe, têm demonstrado atividades antiproliferativas de interesse frente a linhagens tumorais distintas. Da mesma forma, substâncias contendo o grupo funcional sulfonamida exibem diversas atividades biológicas, inclusive a antiproliferativa. Buscando a obtenção de novos produtos bioativos e em vista das ações biológicas relacionadas ao uso do eugenol e de sulfonamidas, empregou-se nesse trabalho a estratégia de hibridação molecular para o planejamento de substâncias inéditas que contemplassem resíduos estruturais de fenilpropanoides e uma subunidade sulfonamídica. Deste modo, objetivou-se mais especificamente com este trabalho: a) Sintetizar substâncias inéditas que contemplem resíduos estruturais do eugenol (4a, 4a', 5a e 5a') ou di-hidroeugenol (4b, 4b', 5b e 5b') e uma subunidade sulfonamídica; b) Avaliar a citotoxicidade desses híbridos frente a quatro linhagens celulares derivadas de cânceres humanos (A549 – adenocarcinoma de pulmão, HepG2 – carcinoma hepatocelular, HT-144 – melanoma metastático e MCF-7 – carcinoma de mama); c) Investigar o mecanismo de ação antiproliferativa do híbrido mais promissor; d) Investigar o potencial pró-apoptótico do híbrido mais promissor. Os híbridos propostos foram obtidos a partir da condensação de cloretos de benzenossulfonila com aminas derivadas de eugenol ou di-hidroeugenol. No que concerne à investigação do potencial antiproliferativo, a viabilidade celular foi avaliada por ensaio colorimétrico (MTS) e ensaio de exclusão com azul de Trypano, assim como, foram realizados os ensaios de capacidade clonogênica, índice mitótico, análise de progressão do ciclo celular e a expressão proteica de importantes reguladores do ciclo celular (ciclina D1 e E) através de “immunoblot”. O potencial pró-apoptótico foi avaliado por meio dos ensaios de AnexinaV/PE e MitoTracker Red Fluorescence, ambos por citometria de fluxo. Também foram obtidas imagens de eventos de apoptose inicial através de microscopia confocal. Os híbridos planejados foram obtidos com sucesso e suas identidades estruturais confirmadas por meio de análises na região de absorção do IV, de RMN e de EM. Os resultados da avaliação biológica *in vitro* mostram que a viabilidade celular da linhagem MCF-7 foi eficientemente reduzida pelos derivados 4b, 4b' e 5a. Vale ressaltar que os derivados 4b, 4b' e 5a foram cerca de

10 vezes mais ativos que os seus precursores (eugenol, di-hidroeugenol e sulfanilamida). O perfil citotóxico de 4b, 4b' e 5a frente duas linhagens celulares normais humanas (CCD-1059Sk - fibroblastos de pele e MCF 10A - células epiteliais de mama) também foi investigado e os resultados demonstraram menor citotoxicidade destes híbridos frente às células normais quando comparadas às células tumorais, indicando seletividade dos derivados para células MCF-7. 4b também foi efetivo em reduzir a capacidade clonogênica e índice mitótico de culturas de MCF-7. Observou-se também que 4b induziu parada do ciclo celular na transição G1/S, provavelmente devido à sua capacidade de reduzir a expressão de ciclinas D1 e E. Além disso, 4b exibiu potencial pró-apoptótico frente células MCF-7, considerando o aumento de células positivas para anexina V, diminuição da frequência de células com integridade mitocondrial e presença de eventos condizentes com apoptose inicial. Desta forma, o híbrido de fenilpropanoide-sulfonamida 4b possui uma estrutura química inovadora e exibiu perfil de atividade antiproliferativa e pró-apoptótica promissora frente células MCF-7. Tomados em conjunto, esses resultados demonstram que 4b pode ser considerado para otimização estrutural e farmacológica, além de estudos *in vivo*, em busca de potencializar a atividade antitumoral previamente observada e validar essa atividade frente ao câncer de mama positivo para receptor de estrógeno.

Palavras-chave: Fenilpropanoides; Sulfonamidas; Hibridação molecular; Atividade antiproliferativa; Câncer de mama.

Auxílio financeiro: Agradecimentos pela concessão de auxílio financeiro à CAPES; CNPq; FAPEMIG.

Aumento da atividade de NOX 2 por aminoguanidina e as implicações no sistema redox de ratos diabéticos tipo 2

Carla Miguel de Oliveira¹, Karina Cristina de Lima¹, Eduardo dos Santos Pacífico¹, Maria Rita Rodrigues¹

¹UNIFAL-MG, Faculdade de Ciências Farmacêuticas
carla_oliveira03@hotmail.com

O diabetes mellitus (DM) é uma desordem metabólica de múltipla etiologia caracterizada por níveis elevados de glicose sanguínea que tem o estresse oxidativo como um ponto chave no desenvolvimento de suas complicações crônicas (BERTOLUCI et al., 2008; ADA, 2006). A incapacidade do corpo em produzir ou utilizar a insulina, caracteriza dois tipos clássicos de diabetes, o diabetes mellitus tipo 1 (DM1) e o diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (IROBEKHIAN et al., 2017), sendo o DM2 observado em cerca de 90% do total de diabéticos. A metformina (MET) é utilizada como tratamento de primeira linha para controlar a hiperglicemia do DM2, sendo também prescrita no diabetes gestacional e para retardar o início desta patologia (TAN et al., 2016). A aminoguanidina (AG) possui alta semelhança molecular com a MET e vem se destacando em estudos do nosso grupo de pesquisa, onde foi observado um aumento da atividade de NOX2 em neutrófilos de ratos tratados com AG. Este papel imunomodulador foi observado tanto em ratos diabéticos, quanto não diabéticos. Há necessidade de mais estudos com relação ao aumento da atividade de NOX2 e também suas implicações no sistema redox. Sendo assim, nosso objetivo é avaliar o efeito de AG e MET sobre a modulação da NOX2 de neutrófilos peritoneais e as implicações no sistema redox de ratos “Wistar” em modelo experimental de DM2. Adicionalmente, avaliar os efeitos de ambos compostos nos marcadores bioquímicos em ratos “Wistar” e realizar análises histológicas em rim, fígado e pâncreas. Ratos wistar de 7 semanas foram induzidos ao DM2 com dieta hiperlipídica e injeção i.p. de estreptozotocina 45mg/kg. Após confirmação do diabetes (glicemia > 200mg/dL), os animais foram tratados com 200mg/kg de metformina e/ou 200mg/kg de Aminoguanidina. No 31º dia, realizou-se administração intraperitoneal de 2 mL de caseinato de sódio 12%, sendo possível coletar os neutrófilos peritoneais. A produção de espécies oxidantes pelos neutrófilos peritoneais foi avaliada por quimioluminescência (NOX2) e por espectrofotometria (MPO). Além disso, coletou-se sangue e órgãos (rim, fígado e pâncreas) para análise dos marcadores bioquímicos, estresse oxidativo e análises histológicas. Iniciou-se a padronização do DM2 em ratos wistar com protocolos de frutose 10 e 30% associados com injeção de estreptozotocina, mas não foi possível obter um quadro de hiperglicemia. Posteriormente, trabalhou-se com dietas de cafeteria e hiperlipídica (incrementada com banha de porco), sendo possível induzir ao diabetes mellitus e escolher o protocolo mais viável para o projeto. O monitoramento da produção de espécies oxidantes pelos neutrófilos peritoneais, por feito por quimioluminescência dependente de luminol e lucigenina, na presença e na ausência de PMA. Podendo-se notar que a atividade de NOX2 não foi diferente nos grupos controle e diabético, e nem nos grupos tratados com AG ou Met. No entanto, houve aumento na atividade de NOX2 (produção de ERO), em ambos os grupos de animais tratados simultaneamente com a AG e Met. Quanto à atividade de mieloperoxidase, pode-se notar quando o animal diabético foi tratado com metformina, houve diminuição na produção de HOCl. No entanto, os demais grupos de tratamento não apresentaram diferença na produção de HOCl. Foi possível estabelecer um modelo de diabetes mellitus tipo 2 através de dieta hipercalórica (incrementada com banha de porco) e associada à injeção de estreptozotocina. Após a padronização, realizaram-se os tratamentos dos diferentes grupos experimentais. Houve aumento da atividade de NOX 2 no grupo tratado com AG associada a MET. Houve diminuição na produção de HOCl somente nos animais diabéticos tratados com MET. A análise dos parâmetros bioquímicos (glicemia, colesterol total, colesterol HDL, triglicérides, ureia, creatinina, creatina quinase, AST e ALT) e histológicos (rins, fígado e coração) já estão em andamento.

Palavras-chave: NOX 2, Aminoguanidina, Diabetes Mellitus tipo 2.

Avaliação da influência da glicoproteína-P na farmacocinética da carbamazepina em ratos epiléticos

Rodrigo Vicentino Placido¹, Joyce Bernardes Sales², Mariana Thalia Reverte Hummel², Marília Gabriella Alves Goulart Pereira³, Vanessa Bergamin Boralli Marques⁴.

¹ Doutorando em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas

² Discentes do curso de Biomedicina, Universidade Federal de Alfenas

³ Docente do departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Alfenas

⁴ Docente da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas

rodrigov_placido@hotmail.com

A epilepsia é uma patologia caracterizada por crises convulsivas recorrentes, que ocorrem em decorrência de descargas elétricas excessivas que acometem as células cerebrais. A doença é de incidência mundial, acometendo cerca de cinquenta milhões de pessoas, sendo de maior prevalência em países em desenvolvimento. Cerca de 30% desses pacientes não respondem ao tratamento, devido à influência dos transportadores na farmacocinética dos fármacos antiepiléticos. O principal transportador de efluxo responsável por essa resistência é a glicoproteína-P (Pg-P), presente especialmente na barreira hematoencefálica. Uma vez que os fármacos antiepiléticos são substratos da Pg-P, esses sofrem sua ação de efluxo, ocasionando alterações farmacocinéticas, como concentrações subterapêuticas no sistema nervoso central, já que esse é o seu principal sítio de ação farmacológica. Diante do exposto, o presente trabalho se propôs a avaliar a farmacocinética da carbamazepina, comparando-se ratos saudáveis e epiléticos, e o uso de inibidores da Pg-P, como possível alternativa terapêutica. O protocolo experimental foi aprovado pelo comitê de ética animal da UNIFAL-MG sob o nº 32/2017. Para a realização da avaliação farmacocinética, administraram-se 25mg/kg de carbamazepina, fármaco antiepilético e substrato da Pg-P, em animais saudáveis e epiléticos induzidos pelo modelo químico de indução de epilepsia por pilocarpina (280mg/kg, por via intraperitoneal), sendo que os animais epiléticos ficaram uma semana em recuperação após a indução da epilepsia, para então serem submetidos à canulação. Também foi avaliada a farmacocinética da carbamazepina, frente ao inibidor da Pg-P, verapamil na dose de 10mg/kg, administrado 2 horas antes da carbamazepina. As coletas de sangue foram realizadas através de cânula, nos tempos: 0,08; 0,33; 0,66; 1; 1,5; 2; 3; 4; 6; 8 horas. O volume de sangue coletado foi de 0,5mL, sendo esse mesmo volume repostado por salina. O plasma foi separado e congelado a -80°C até o momento da análise. A análise foi feita em UHPLC-MS/MS, por meio de um método bioanalítico previamente validado, que utilizou-se de um preparo de amostras por meio de uma extração líquido-líquido com solução éter dietílico:acetato de etila (6:4, v/v). A fase móvel utilizada foi solução de acetonitrila: tampão formiato de amônio 2mM, 75:25v/v bombeados em fluxo de 0,2mL/min e a coluna analítica utilizada na separação foi *Shim-pack ODSPhenyl*®, Shimadzu, de dimensões 3mm x 100mm x 2,2µm. Os íons monitorados foram na transição m/z de 236,80>193,90; 236,80>193,00; 236,80>191,85 para a carbamazepina. Após a obtenção das concentrações experimentais de carbamazepina, o software WinNonlin® versão 4.0, foi utilizado para a obtenção dos parâmetros AUC, t_{1/2}, C_{max}, t_{max} e *clearance*. Também foram realizadas comparações estatísticas entre os grupos (teste de Mann-Whitney, nível de confiança fixado em p≤0,05). O grupo controle apresentou AUC de 20222h.ng/mL, t_{1/2} de 3,42h, C_{max} de 2731ng/mL, t_{max} de 0,96h e Cl de 1236mL/h/Kg; o grupo controle com inibidor apresentou AUC de 12840h.ng/mL, t_{1/2} de 4,71h, C_{max} de 1584ng/mL, t_{max} de 0,62h e Cl de 1947mL/h/Kg. O grupo epilético apresentou AUC de 10647h.ng/mL, t_{1/2} de 4,69h, C_{max} de 1631ng/mL, t_{max} de 0,84h e Cl de 1694mL/h/Kg. O grupo epilético com inibidor apresentou AUC de 16712h.ng/mL, t_{1/2} de 7,22h, C_{max} de 1294ng/mL, t_{max} de 1,25h e Cl de 2850mL/h/Kg. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos controle e epilético, tampouco no uso do inibidor da Pg-P. Esses resultados podem ser explicados pelo fato da carbamazepina não ser um substrato ideal da Pg-P em ratos, uma vez que trabalhos semelhantes

na literatura também não notaram diferenças, enquanto que trabalhos em humanos mostraram que a epilepsia altera a farmacocinética da carbamazepina.

Palavras-chave: Epilepsia. Transportadores. Carbamazepina. Farmacocinética.

Auxílio financeiro: CAPES, CNPQ, FAPEMIG.

Desenvolvimento de protótipos de fármacos Leishmanicidas: estudos computacionais por modelagem molecular, síntese química e avaliação farmacológica de derivados oxímicos a partir do Safrol.

Mariana Gabriela Risola da Silva, ¹Poliany Graziella de Freitas, ¹Levy Bueno Alves, ^{1,2}Marcia Paranho Veloso.

Universidade Federal de Alfenas

¹Laboratório de Modelagem Molecular e Simulação Computacional (MolModCS)

²Laboratório de Pesquisa em Química Farmacêutica (LQFar)

Departamento de Ciências Farmacêuticas.

marigrisola@gmail.com

Doença parasitária negligenciada, a Leishmaniose possui diferentes formas clínicas. Com cerca de cinco milhões de casos relatados nos últimos cinco anos pela Organização Mundial de Saúde, está diretamente associada a pobreza e apontada como uma das seis doenças parasitárias que mais matam atualmente. A maior parte dos casos provém de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, com cerca de 1 milhão de novos casos por ano. A busca por fármacos leishmanicidas menos tóxicos, mais eficazes e que causem o mínimo de efeitos colaterais é essencial diante de um cenário no qual os fármacos disponíveis possuem elevada toxicidade, alto custo e são de difícil acesso. A CRK3, uma proteína serina/treonina quinase da família das CDK isolada em *Leishmania*, e a rCPB 2.8, cisteína protease do tipo B, são essenciais para a regulação do ciclo celular e diferenciação do parasita, respectivamente. Diante deste fato, inibidores das enzimas CRK3 e rCPB 2.8 se mostram alvos potenciais para o desenvolvimento de novos fármacos leishmanicidas. Este projeto apresenta como objetivo obter protótipos de fármacos leishmanicidas por meio do estudo computacional, utilizando como ferramenta a Modelagem Molecular de uma série de derivados oxímicos inéditos obtidos a partir do safrol. Os resultados dos estudos computacionais anteciparão o perfil de afinidade frente aos alvos moleculares propostos, as enzimas CRK3 e rCPB 2.8, levando a proposição de um aumento no número de compostos da série de derivados oxímicos, que serão sintetizados utilizando as estratégias da Síntese Orgânica Medicinal. Após a síntese e a caracterização estrutural, a série deverá ser submetida a ensaios farmacológicos visando avaliar o seu potencial leishmanicida, a fim de se verificar a inter-relação com os resultados obtidos in silico. Os novos derivados poderão se tornar protótipos de candidatos a fármacos para o combate da Leishmaniose, que vêm apresentando ainda elevado índice de incidência no Estado de Minas Gerais e no Brasil. Os estudos computacionais das moléculas da série de derivados oxímicos foram realizados no Laboratório de Modelagem Molecular e Simulação Computacional - MolModCS da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG, através de softwares e, considerando a estrutura tridimensional da proteína CRK3 e rCPB 2.8 da *Leishmania sp.*. A síntese de derivados oxímicos a partir do Safrol está sendo realizada no Laboratório de Pesquisa em Síntese Farmacêutica a fim de se obter produtos para posteriores estudos de atividade biológica frente ao parasita, através de rota sintética planejada e baseada em dados já descritos na literatura. Os estudos de Modelagem Computacional com as enzimas e ligantes desenhados provenientes do Safrol ainda está em processo de interpretação de resultados, uma vez que foram obtidos recentemente. No entanto, foi possível perceber que as estruturas propostas obtiveram resultados de docking molecular (ancoramento) com as proteínas sugeridas, promissoras, uma vez que seus valores de energia foram menores que o ligante cristalografado e fármacos leishmanicidas já conhecidos. A etapa de síntese foi iniciada também recentemente, sem resultados para discussão; a atividade biológica não começou a ser testada. Com os resultados obtidos através do docking molecular entre as proteínas do parasita e dos ligantes propostos derivados do Safrol, acredita-se ser possível que, através de um produto natural, seja possível a descoberta de uma nova série de candidatos a

fármaco leishmanicidas, com contribuição intimamente relacionada com o planejamento racional de fármacos; correlação entre modelagem computacional, síntese e atividade biológica.

Palavras-chave: Leishmaniose, Safrol, Fármaco, Modelagem Molecular, Síntese Química. CAPES.

***Candida albicans* expostas a antifúngicos e fagócitos aumentam a expressão gênica de aspartato proteases secretadas**

Josidel Conceição Oliver¹, Michelle de Jesus Coimbra¹, Carla Benedini Ribeiro Jorge Ferreira¹, Amanda Latercia Tranches Dias¹.

¹Universidade Federal de Alfenas, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Alfenas, Minas Gerais, Brasil.

E-mail: jsdl.oliver@gmail.com

Candida albicans está entre os principais patógenos em infecções fúngicas invasivas de ambiente hospitalar. Entre os fatores associados à sua virulência está a expressão gênica de aspartato proteases secretadas (Sap). Sap2p e Sap4p são enzimas secretadas extracelularmente, Sap2p é comumente expressa em *C. albicans* enquanto Sap4p está associado à formação de hifas que podem contribuir para a invasão de tecidos hospedeiros e destruição de macrófagos (Mφ). Sap9p e Sap10p estão ligadas à superfície celular fúngica pelo glicosilfosfatidilinositol, podendo ter função na interação patógeno-hospedeiro. Nesse estudo, avaliou-se a expressão dos genes *SAP2*, *SAP4*, *SAP9* e *SAP10* em *C. albicans* SC5314 cultivadas na presença ou ausência de anfotericina B, caspofungina e fluconazol e em interação com Mφ. A linhagem celular monocítica humana de origem leucêmica (THP1) foi cultivada em meio RPMI-1640 suplementado com soro fetal bovino e antibióticos a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂. Para diferenciação das células, 10⁶ monócitos foram cultivados em meio RPMI-1640 suplementado e forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) 100 nM por 48h. Em garrafas de cultura celular, foram cultivadas amostras de 10⁷ *C. albicans*/mL na presença ou ausência de 10⁶ macrófagos/mL pré-expostas ou não a concentrações inibitórias e subinibitórias de antifúngicos, a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂ por 1h. O RNA total das amostras foi extraído utilizando TRIzol®, após a purificação do RNA com DNase I e conversão em cDNA, os genes pesquisados foram quantificados por Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa (qPCR) utilizando *ACT1* como gene normalizador. *C. albicans* cultivada na presença de concentrações subinibitórias de anfotericina B, caspofungina e fluconazol apresentou regulação positiva na expressão dos *SAP2*, *SAP4*, *SAP9* e *SAP10*, a expressão gênica foi ainda maior em leveduras cultivadas em contato com os Mφ. A exposição de *C. albicans* à concentrações inibitórias (IC) dos antifúngicos mostrou um leve aumento na expressão dos genes pesquisados, entretanto, a exposição à concentrações subinibitórias induziram maior expressão desses genes, principalmente após interação com Mφ. A amostra *C. albicans* pré-cultivada em 1/4 da IC para anfotericina B e em contato com Mφ apresentou um aumento médio 235,8 vezes maior na expressão de *SAP9*, se comparada com amostras da levedura cultivada na ausência de macrófagos e antifúngicos. *C. albicans* expostas a 1/8 da IC para caspofungina e em contato com Mφ apresentou um aumento médio de 835,9 e 393,4 vezes maior na expressão de *SAP2* e *SAP4*, respectivamente, se comparada com amostras da levedura cultivada na ausência de macrófagos e antifúngicos. Esses resultados são preocupantes porque mostram que concentrações subinibitórias de antifúngicos podem aumentar a virulência de *C. albicans*. Estas concentrações têm sido utilizadas como tratamento sistêmico empírico para pacientes com fatores de risco para candidíase invasiva, bem como, pode ocorrer em falha terapêutica devido a parâmetros farmacocinéticos / farmacodinâmicos ou a não adesão ao tratamento corretamente com erros de dosagem ou tempo entre as doses. Além disso, compreender a expressão desses genes na patogênese fúngica pode auxiliar na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos para candidíase.

Palavras-chave: Proteases aspárticas secretadas; Caspofungina; Fluconazol; Anfotericina B; Macrófagos; Fagócitos.

Auxílio financeiro: FAPEMIG (CBB -APQ -00507 -14); CAPES.

Avaliação do potencial de membrana mitocondrial e de geração de peróxido de hidrogênio em promastigotas de *Leishmania* tratadas com compostos cumarínicos

Rafaella Junqueira Merli¹, Patrícia Ferreira Espuri Sepini¹, Diogo Teixeira de Carvalho², Marcos José Marques¹ e Eduardo de Figueiredo Peloso³.

¹ Instituto de Ciências Biomédicas - Laboratório de Parasitologia/Biologia Molecular-Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG.

² Departamento de Alimentos e Medicamentos - Laboratório de Pesquisa em Química Farmacêutica (LQFar) - UNIFAL-MG.

³ Instituto de Ciências Biomédicas – Laboratório de Bioquímica - UNIFAL-MG.

rafaellajmerli@bol.com.br

As leishmanioses representam um grupo de enfermidades causadas por protozoários flagelados pertencentes ao gênero *Leishmania* e são consideradas um grave problema de saúde pública, sendo classificadas como doença tropical negligenciada. Apesar de se tratar da segunda protozoose de maior importância mundial, ainda não possui um tratamento de alta eficiência e efeitos colaterais reduzidos. Sendo assim, a busca por novos fármacos leishmanicidas se faz necessária. Nesse contexto, a mitocôndria pode ser vista como um possível alvo de ataque, pois está relacionada a diversos eventos celulares vitais ao parasita, como a geração de energia. Esta organela está intimamente ligada também à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem interferir na manutenção da integridade da membrana mitocondrial. Paralelamente, há relatos na literatura de que os compostos cumarínicos têm apresentado atividade leishmanicida e poderiam estar relacionados com alterações na geração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pelo parasita, sendo assim potenciais candidatos a fármacos. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi de avaliar o potencial de membrana mitocondrial e a taxa de produção de peróxido de hidrogênio em promastigotas de *Leishmania amazonensis* tratadas ou não com os compostos cumarínicos, nas fases lag e log da curva de proliferação. Para determinar a taxa de produção de H₂O₂, promastigotas (10⁸ células/mL) de *L. amazonensis* nos dois estágios da curva de proliferação (fase lag e log) tratados ou não (controle) com derivado cumarínico (C5) foram incubados em PBS/1 mM MgCl₂ na presença de 5mM de succinato, 40 μM de digitonina, 0,1 U/mL de horseradish peroxidase e 25 μM de Amplex Red (Molecular Probes®). A fluorescência foi monitorada em comprimentos de onda de excitação e emissão de 571 e 585 nm, respectivamente, em placa de 96 poços no fluorímetro. O potencial de membrana mitocondrial foi analisado em citômetro de fluxo usando Mitotracker. As promastigotas (10⁶/mL) em fase log, tratadas e não tratadas com C5, foram incubadas com essa sonda em PBS/1 mM MgCl₂ por 40 minutos. Incubou-se também um grupo controle positivo com 0,25 μL CCCP (25 μM). Após esse período, foi feita centrifugação diferencial com as amostras em PBS. Em seguida, as promastigotas foram analisadas por citometria de fluxo. Com relação à produção de H₂O₂, foi observada uma redução de 32,53% em parasitos tratados com o composto C5 se comparado ao controle na fase lag. Porém, na fase log houve um aumento de 19,07% em promastigotas tratadas em relação ao grupo controle. Ainda, se comparadas as duas fases, observa-se um aumento de 226,89% na produção de H₂O₂ na fase log em relação à lag nas tratadas com o composto C5. Já em relação ao potencial de membrana, experimentos iniciais demonstraram uma maior despolarização nos parasitos tratados em relação ao grupo controle, comparados com o CCCP (controle positivo), porém esses experimentos ainda não foram totalmente finalizados. Conclui-se que a diminuição da produção de H₂O₂ na fase lag do grupo tratado em relação ao controle pode interferir nas taxas de proliferação celular ao longo da curva de proliferação. A partir disso, mais estudos serão realizados em relação aos mecanismos de ação do composto cumarínico C5, afim de propor a longo prazo o desenvolvimento de potenciais candidatos a fármacos leishmanicida.

Palavras-chave: *Leishmania*, Compostos cumarínicos. Bioenergética.

Auxílio financeiro: CNPq; FAPEMIG; CAPES.

Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* e *in vivo* de compostos de prata contendo imidazolina-2-tiona

Patrícia Ferreira Espuri^{1*}, Vanessa Silva Gontijo¹, Eduardo Figueiredo Peloso¹, Juliana Barbosa Nunes¹, Fábio Antônio Colombo¹, Carine Ervolino de Oliveira¹, Daniel Fonseca Segura², Adelino V. G. Netto² e Marcos José Marques¹

¹Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG, Minas Gerais, Brasil,

²Universidade Federal Paulista – UNESP – SP, São Paulo, Brasil.

*patyespuri@hotmail.com

A leishmaniose é um conjunto de doenças causadas por mais de 20 espécies de protozoários flagelados pertencentes ao gênero *Leishmania* com uma ampla distribuição mundial e considerada um grande problema para a saúde pública. A quimioterapia é principal medida para o controle da doença, mas em geral apresenta alta toxicidade, alto custo, diversidade de efeitos colaterais e resistência parasitária. Neste sentido, complexos de prata foram descritos exibir uma ampla gama de atividades antimicrobianas apresentando baixa toxicidade, além de apresentar atividade leishmanicida *in vitro* em *L. mexicana*. Portanto, uma nova série de compostos de prata poderia ser de interesse na concepção de novas drogas para o tratamento da leishmaniose. Os compostos [Ag (phen) (imzt)] NO₃ (**1**), [Ag (phen) (imzt)] CF₃SO₃ (**2**), [Ag (phen) 2] (BF₄) □ H₂O (**3**), [Ag₂ (imzt)₆] (NO₃)₂ (**4**) e *imzt* foram sintetizados e avaliados *in vitro* quanto à atividade leishmanicida em amastigota de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi*, e os compostos (**4**) e *imzt* foram selecionados para estudos *in vivo*. Adicionalmente, se avaliou a produção de peróxido de hidrogênio e a inibição de cisteína protease nos parasitos tratados com os compostos, além de avaliar a citotoxicidade *in vitro* em macrófagos peritoniais murinos e o monitoramento da toxicidade do composto (**4**) no contexto *in vivo* por análise histopatológica do fígado e rim de Hamsters Dourados. Quanto à atividade leishmanicida, o composto (**4**) foi o mais potente contra as formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi* (IC₅₀ = 1,88; 8,05 μM, respectivamente) e comparável ao da Anfotericina B (IC₅₀ = 1,30; 4,00 μM, respectivamente), fármaco leishmanicida clássico. Além da excelente atividade, o composto (**4**) apresentou citotoxicidade (CC₅₀) de 94,06 μM, exibindo uma toxicidade mais baixa do que o medicamento padrão (Anfotericina B: CC₅₀ = 27,05 μM). No contexto *in vivo*, o composto (**4**) reduziu significativamente o número de amastigotas no fígado e no baço quando comparado com o grupo não tratado. Além disso, quando se compara o efeito do composto (**4**) e Glucantime® no baço, não foi observada diferença estatística significativa. Adicionalmente, nenhum sinal de alterações histológicas significativas, tais como microabscessos, fibrose ou perda acentuada de tecido hepático e / ou renal, que indicariam uma toxicidade grave, foram observados após o tratamento com composto (**4**). Avaliando o efeito dos compostos sobre *Leishmania*, não foi possível observar sua ação na cisteína protease. Mas, quando avaliou o nível de produção de peróxido de hidrogênio no tratamento com o composto (**4**) foi possível observar uma redução de 25,44 e 49,13% nas taxas de peróxido de hidrogênio quando comparadas às fases lag e log não tratados, respectivamente. Sendo assim, a redução desta espécie reativa de oxigênio reduz a sinalização para proliferação celular, o que pode ser observado pela redução no número de parasitas após o tratamento com o composto (**4**). Sendo assim, o resultado mais notável foi observado para o composto (**4**) como o mais ativo. Em uma análise comparativa de todos os resultados, verificamos que as modificações feitas na molécula melhoraram sua atividade *in vitro* e *in vivo*. Portanto, concluímos que, provavelmente, a presença de íon nitrato na estrutura do composto (**4**) em conjunto com íon Ag⁺ foram importantes para a modulação da atividade leishmanicida, resultando na melhora de sua atividade *in vitro* e *in vivo*. Assim, esse composto pode representar um modelo promissor para o desenvolvimento de uma nova classe de agentes leishmanicidas e merece uma investigação mais aprofundada de seus efeitos sobre a *Leishmania*.

Palavras-chave: *Leishmania*; Compostos de Prata; Efeitos biológicos.

Auxílio financeiro: CNPq, FAPEMIG, UNIFAL-MG, FINEP.

Avaliação das propriedades probiótica, antioxidante e anti-inflamatória da cerveja de quefir e seus efeitos sobre a função hepática de ratos *Wistar*

Denise Aparecida Corrêa¹, Flávia Della Lúcia², Kamila Leite Rodrigues³, Kris Simone Tranches Dias⁴, Laís Estefane Sabará Estevam, Letícia Macagnan Janguas⁵, Maria Rita Rodrigues⁶

¹Universidade Federal de Alfenas, Instituto de Ciências Biomédicas/Bioquímica; ²Faculdade de Nutrição; ³Cervejaria Senhorita, ⁴Instituto de Ciências Biomédicas/Bioquímica; ⁵Discente Curso de Nutrição; ⁶Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Análises Clínicas e Toxicológicas.
denise.correa@unifal-mg.edu.br

A produção de cervejas artesanais expandiu-se de maneira muito significativa nos últimos anos. Como resultado da execução de um projeto de pesquisa de doutorado desenvolvido nesta universidade, foram observados efeitos antiulcerogênico e anti-inflamatório de uma cerveja artesanal de quefir produzida na região. Tais efeitos foram atribuídos à uma possível ação sinérgica dos componentes do quefir e dos polifenóis do malte e do lúpulo. A referida cerveja foi a primeira a ser relatada cientificamente como uma “Speciality beer” (classificação pelo BJCP - Beer Judge Certification Program) em vista de sua produção ter sido feita a partir de probióticos como única fonte de fermentação e por possuir o polissacarídeo quefirano, ao qual são atribuídas diferentes propriedades biológicas, isolado de sua fonte natural. Por se tratar do principal sítio de biotransformação do etanol, o fígado está diretamente exposto aos efeitos tóxicos do acetaldeído e das espécies oxidantes provenientes da ação das enzimas ADH (Álcool desidrogenase) e da CYP2E1 do sistema MEOS (Sistema Microsomal de Oxidação do etanol) sobre o álcool. Os metabólitos gerados, assim como o próprio etanol, alteram a permeabilidade da mucosa e a composição da microbiota intestinal favorecendo a transferência de endotoxinas bacterianas do intestino para o fígado, o que pode ser uma das causas dos danos hepáticos decorrentes do consumo de bebidas alcoólicas. Quando isto ocorre, células imunes e células hepáticas são estimuladas e sofrem várias transformações com simultânea expressão e liberação de citocinas pró-inflamatórias. Como diversas evidências sugerem que os probióticos atenuam ou previnem danos hepáticos devido aos seus efeitos anti-inflamatório, antioxidante e de modulação da flora intestinal, reduzindo a transferência de endotoxinas para o fígado, este projeto tem o propósito de investigar os efeitos da cerveja de quefir sobre a função hepática de ratos tratados por 30 dias com este produto. Para tanto estão planejados ensaios bioquímicos de peroxidação lipídica, dosagem de enzimas antioxidantes e de marcadores inflamatórios, complementados com análise morfológica de tecido hepático dos animais tratados. O projeto prevê também estudos de caracterização sensorial da cerveja de quefir em diferentes tempos de armazenamento através da metodologia Perfil Descritivo Otimizado (PDO), com a participação de provadores treinados, e de verificação da aceitabilidade do produto pelo público consumidor de cervejas artesanais. Serão feitas ainda análises físico-químicas incluindo determinação de cor, pH, acidez total, acidez volátil, compostos fenólicos, conteúdo de ésteres e atividade antioxidante da cerveja.

Palavras-chave: Quefir; cerveja; fígado; anti-inflamatório; antioxidante; análise sensorial.

Planejamento e síntese de híbridos di-hidro Eugenol-pentamidina de potencial atividade antimicrobiana

Daniela Carvalho de Paulo^{1*}, Diogo Teixeira Carvalho¹, Thiago dos Santos²

¹Universidade Federal de Alfenas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas

¹Univeridade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
danielacaarvalho@hotmail.com

A pentamidina é uma diamidina aromática utilizada essencialmente contra protozoários, mas são também descritas suas ações antimicrobianas. O fármaco é bem-sucedido em termos de eficácia, entretanto apresenta toxicidade significativa e vários efeitos colaterais conhecidos. Produtos naturais fenólicos exibem um conjunto diversificado de atividades farmacológicas que são amplamente exploradas na busca de novos candidatos a fármacos. Nosso grupo, no LQFar, tem focado no potencial de compostos derivados do eugenol, um alilfenol natural de demonstrada atividade antimicrobiana. Híbridaçã molecular compreende uma estratégia de união das características estruturais farmacofóricas de dois compostos bioativos, em uma única nova molécula, que potencialmente disporá de atividade otimizada. O presente estudo visa à obtenção de híbridos di-hidro Eugenol-pentamidina dotados de potencial atividade antimicrobiana. O produto natural di-hidro Eugenol foi inicialmente nitrado empregando-se KHSO_4 e NaNO_3 em $\text{MeCN}:\text{AcOEt}$ 3:4 (v/v). Este intermediário foi então reduzido para obtenção da amina, isso foi possível em metanol via Pd/C e hidrazina com a geração de H_2 *in situ*. Numa reação *one-pot* a arilamina foi então convertida num sal de diazônio pela adição de ácido sulfúrico a 0 °C e, após 20 minutos, nitrito de sódio. Então, após 30 minutos, este grupo funcional foi substituído para formação de uma azida a partir da adição de NaN_3 . A arilazida foi utilizada para a formação do anel 1,2,3-triazólico, realizando-se uma reação *click* em temperatura ambiente na presença de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, um alcino terminal e ascorbato de sódio como agente redutor. Após a síntese do anel triazólico, uma benzilação seletiva foi efetuada para a proteção da hidroxila fenólica. O produto benzilado foi empregado para formação de um éter em diclorometano e água empregando-se NaOH, 1,4 dibromobutano e TBAB. Finalmente, o brometo foi deslocado utilizando NaCN em DMF, o que gerou a nitrila necessária. Os intermediários reacionais até então foram obtidos em rendimentos medianos a altos (45-92%) e foram caracterizados via ressonância magnética nuclear e espectroscopia na região do infravermelho. As etapas restantes para o término da rota sintética serão efetuadas para a obtenção dos híbridos di-hidro Eugenol-pentamidina desejados e estes serão avaliados quanto ao potencial antimicrobiano. Ao final deste trabalho espera-se obter híbridos di-hidro Eugenol-pentamidina inéditos que possuam expressiva atividade antimicrobiana e de baixa citotoxicidade.

Palavras-chave: antimicrobianos, pentamidina, di-hidro Eugenol, híbridaçã molecular.

Avaliação leishmanicida e citotóxica de derivados da Licarina A *in vitro*

Marcilene Aparecida Alves*, Patrícia Ferreira Espuri, Marcos José Marques, Eduardo Figueiredo Peloso.

Universidade Federal de Alfenas-UNIFAL-MG, Minas Gerais Brasil, Mestrado em Ciências Biológicas.

*alvesmrcln@gmail.com

As leishmanioses formam um conjunto diversificado de doenças parasitárias transmitidas de animais à humanos por meio de picadas de flebotomíneos fêmeas infectados por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. As manifestações clínicas destas doenças apresentam um amplo espectro, podem ocasionar lesões cutâneas simples de auto-ressolução, crônicas, mucosas ou formas viscerais, letais em até 90% dos pacientes não tratados. São doenças endêmicas em 97 países em desenvolvimento, afetando principalmente as populações mais pobres; e apresentam uma prevalência de 12 milhões de pessoas, com cerca de 700 mil a 1 milhão de novos registros, e de 20 a 30 mil mortes anuais, segundo a Organização Mundial de Saúde. As opções terapêuticas disponíveis são escassas, de alto custo, apresentam toxicidade elevada, inúmeros efeitos adversos graves, além de apresentarem altos índices de falha terapêutica e resistência parasitária. Atualmente, os compostos naturais e seus derivados são considerados promissores candidatos a novos fármacos para diversas patologias. Neste contexto, a Neolignana Licarina A tem apresentado várias atividades biológicas, entre elas: antidepressiva, antitumoral, anti-inflamatória, antiparasitária e leishmanicida. O presente trabalho teve como objetivo analisar a atividade leishmanicida e citotóxica *in vitro* de 13 compostos derivados de Licarina A em *Leishmania (L.) amazonensis*. A avaliação da atividade leishmanicida foi realizada pelo método da resazurina para a determinação do potencial inibitório de 50% de proliferação (IC50-promastigota) de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Os compostos foram adicionados à cultura de promastigotas (1×10^6 células/mL por poço) em placa de 48 poços na faixa de 0,1 a 40,0 µg/mL, solubilizados em dimetil sulfoxido (DMSO) (0,6%, v/v em todos os poços) e incubados a 25°C. Após 72 horas de incubação, foi adicionado 10% de resazurina do volume final/poço e incubados novamente por 8 horas. A citotoxicidade foi avaliada pelo método de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium brometo) utilizando macrófagos peritoneais murinos para a determinação da concentração citotóxica de 50% (CC50). Os compostos foram adicionados em diversas concentrações (500 a 3,9 µg/mL) em uma placa de 96 poços e incubados por 48 horas em estufa de CO₂ a 35°C. As análises foram realizadas através de leituras em espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu, duplo-feixe, modelo 2550 à 570 e 600 nm (anti-promastigota) e em 570 nm (citotoxicidade) e os dados foram calculados pelos programas EXCEL e BIOSTAT 5.0. Adicionalmente, foram realizados dois experimentos independentes e em duplicata. Quanto a atividade leishmanicida contra formas promastigotas, foi possível observar que 9 compostos derivados de Licarina A apresentaram valores significativos de IC50. Além disso, quando se avaliou a toxicidade destes compostos, foi possível observar que entre os compostos que apresentaram maior atividade contra formas promastigotas, estes apresentaram menor toxicidade em relação a Licarina A, os quais se destacam: Os compostos DL 10 (IC50 = 85,8 µM; CC50 = 297,06 µM), DL 17 (IC50 = 98,56 µM; CC50 = 460,27 µM) e DL 21 (IC50 = 4,49 µM, CC50 = 103,66 µM) com índices de seletividade de 3,46, 4,66 e 23,06, respectivamente. Podemos concluir que três dos compostos derivados de Licarina A estudados são promissores candidatos a fármacos contra a leishmaniose, portanto é de extrema importância prosseguir nas avaliações anti-amastigota, sendo que aquele que apresentar melhor atividade e maior índice de seletividade contra as formas amastigotas, a forma relevante do ponto de vista biológico, prosseguirá para as avaliações bioquímicas com o intuito de determinar o mecanismo de ação destes.

Palavras-chave: leishmaniose, licarina A, resistência.

Auxílio financeiro: UNIFAL-MG.

Exposição à nicotina durante o início do período pós-natal: Vulnerabilidade ao estresse na vida adulta?

Antonio Alves Pereira Júnior¹; Gabriel Estevam Amorim¹; Alessandra Oliveira Silva¹; Carolina Aparecida de Faria Almeida¹; Jéssyca Milene Ribeiro¹; Giovana de Cassia Pan²; Maria Paula Souza Silva Alves²; Carla Speroni Ceron³; Marcos Vinícios Salles Dias³; Larissa Helena Torres³.

¹ Discente do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. FCF – Unifal-MG;

² Discente do curso de Farmácia FCF – Unifal-MG.

³ Docente do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. FCF – Unifal-MG;

Laboratório de Farmacologia Experimental e Clínica – Unifal-MG

antoniounifal@gmail.com

O tabagismo é um problema de saúde pública e atinge cerca de um terço da população adulta do mundo, alcançando patamares de epidemia global, sendo responsável direto por milhões de mortes anuais e é considerado a principal causa evitável de doenças e mortes prematuras. A quantidade de nicotina encontrada no leite de mulheres tabagistas pode chegar ao triplo da quantidade sérica, mesmo assim a Academia Americana de Pediatria não inclui a nicotina na lista de drogas contraindicadas durante a lactação devido à falta de evidências científicas na área. Formas alternativas de administrar a nicotina, como a transcutânea e oral, são utilizadas durante o período de cessação do tabagismo como forma de inibir o consumo de cigarros, entretanto, não foram suficientemente estudadas para avaliar se a utilização destes métodos durante a lactação como forma de redução de danos é ou não eficiente. Quase metade das mulheres mantém o consumo do tabaco durante a gravidez, sendo influenciadas pela dificuldade na cessação do hábito de fumar e pelo medo de ganho de peso durante a gestação. Este projeto de pesquisa tem como objetivo avaliar se há uma vulnerabilidade ao estresse na vida adulta em camundongos fêmeas expostas à nicotina por meio da amamentação durante 14 dias no início do período pós-natal. Para isto, as mães terão implantadas minibombas de pressão osmótica contendo 100 µL de nicotina solubilizada em salina na concentração de 56 mg/mL, sendo liberada uma dose diária de 8 mg de nicotina para cada kg de animal. Serão utilizados camundongos fêmeas da linhagem *Swiss* oriundas de ninhadas de cruzamentos de camundongos provenientes do biotério da Universidade Federal de Alfenas. Os animais serão mantidos juntamente com as mães em caixas de polietileno durante a fase de lactação, com livre acesso à água e comida. Na fase adulta, os animais passarão por um protocolo de estresse crônico imprevisível, dentre os procedimentos estão o isolamento, serragem úmida, imobilização, privação de água e comida, natação forçada e inversão do ciclo de luz. As sessões serão realizadas na idade adulta dos camundongos, entre o dia pós-natal (P)65 e P74 e em seguida serão avaliados os parâmetros bioquímicos e comportamentais relacionados ao estresse. Para os estudos comportamentais serão utilizados os testes de labirinto em cruz elevado (LCE) e nado forçado, que avaliam comportamento ansioso e depressivo. Serão avaliados também, nos diferentes grupos experimentais, a concentração de proteínas sinaptofisina, sinapsina, PSD95 e BDNF no córtex pré-frontal e hipocampo, avaliando também a evolução ponderal, concentração de corticosterona, nicotina e cotinina sérica. São esperadas alterações nos parâmetros comportamentais nos grupos submetidos ao estresse, havendo uma diminuição da permanência nos braços abertos no LCE e uma diminuição da latência de imobilidade no nado forçado, demonstrando um aumento do comportamento ansioso. A dosagem de nicotina e cotinina será utilizada como marcador biológico da exposição à nicotina. As proteínas sinápticas e o BDNF podem ter as suas concentrações alteradas devido aos efeitos da nicotina e/ou do estresse. Este trabalho possui relevância para a comunidade científica já que a exposição à xenobióticos em uma fase crítica de maturação do sistema nervoso central está relacionada à prejuízo ao processo de desenvolvimento.

Palavras-chave: Tabagismo. Redução de danos. Amamentação. Sistema nervoso central.

Auxílio financeiro: CAPES.

Determinação de ácidos biliares e seus conjugados em soro por extração em fase sólida *on-line* acoplada ao LC-MS/MS

Alberto Thalison Silveira; Alyne Maria da Costa Barbosa, Eduardo Costa de Figueiredo, Isarita Martins

Laboratório de Análise de Toxicantes e Fármacos, Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG, Alfenas, MG, Brasil
albertothalison@hotmail.com

Os ácidos biliares são derivados do metabolismo do colesterol e estão envolvidos em vários processos, incluindo a homeostase do colesterol, de vitaminas lipossolúveis e na absorção de lipídeos. A avaliação dos níveis dos ácidos biliares no soro humano tem-se mostrado como um bom indicador de hepatotoxicidade, por exemplo, causada por solventes orgânicos voláteis em ambientes laborais. Contudo, devido à grande similaridade estrutural entre os ácidos biliares e as baixas concentrações encontradas no soro, determinações necessitam de métodos analíticos com alta detectabilidade e seletividade para uma análise eficiente. Na literatura são reportados métodos para ácidos biliares usando espectrometria de massas para detectar estes ácidos. Entretanto, a análise simultânea de ácidos biliares usando polímeros molecularmente impressos de acesso restrito revestido com albumina de soro bovino (RAMIP-BSA) como material sorvente na extração em fase sólida *on-line* é inédita. Neste projeto, propusemos o desenvolvimento de uma metodologia de extração em fase sólida *on-line* rápida e sensível para a determinação de ácidos biliares séricos com aplicação na avaliação de danos reversíveis no fígado de trabalhadores expostos a solventes orgânicos voláteis. O RAMIP-BSA foi sintetizado pelo método de precipitação usando ácido cólico, 4-vinilpiridina, etilenoglicol dimetacrilato, ácido 4,4'-azobis (4-cianoaléico) e metanol como molécula modelo, monômero funcional, agente de ligação cruzada, iniciado radicalar e solvente porogênico, respectivamente. Os monômeros glicerol dimetacrilato e hidroximetil metacrilato foram usados para promover uma superfície hidrofílica (alta densidade de grupamentos hidroxila). Para aumentar a capacidade de excluir macromoléculas, o polímero foi revestido com albumina de soro bovino usando glutaraldeído como agente de ligação cruzada. O material resultante foi acondicionado em pré-coluna (10 x 4,6 mm, L x D) e acoplado a um sistema *column switching*. As fases móveis de carregamento, eluição e limpeza foram tampão formiato de amônio 10 mmol L⁻¹ (pH 3,0), água (acetato de amônio 5 mmol L⁻¹ + ácido fórmico 0,012%): metanol (acetato de amônio 5 mmol L⁻¹ + ácido fórmico 0,012%) (10: 90, v/v) e acetonitrila: isopropanol: água ultrapurificada (75: 15: 10, v/v/v), respectivamente. A detecção ocorreu por espectrometria de massas com os fragmentos otimizados por injeção direta de ácidos biliares na concentração de 1 mg L⁻¹. Forno de coluna, linha de dessolvatação e bloco de aquecimento foram configurados nas temperaturas de 35, 250 e 400 °C, respectivamente. Um volume de 100 µL de soro diluído na razão 1:4 foi injetado diretamente no sistema de extração *on-line*, totalizando 36 minutos de corrida. A fase de carregamento escolhida possibilitou a total exclusão de proteínas em aproximadamente 2.5 minutos. O método otimizado será validado de acordo com guias internacionais de validação bioanalítica. Por fim, a metodologia desenvolvida apresenta grande potencial para a determinação de ácidos biliares em trabalhadores expostos a solventes orgânicos voláteis, através de uma análise rápida, sensível e seletiva.

Auxílio financeiro: CAPES

Planejamento e síntese de derivado otimizado de cumarina leishmanicida com vistas à redução de sua toxicidade e melhoria de solubilidade

Elkin José Torres Sierra, Daniela Carvalho de Paulo, Clara de Oliveira Carvalho Lopes, Diogo Teixeira Carvalho

Universidade Federal de Alfenas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Doutorado em Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Pesquisa em Química Farmacêutica (LQFar)
lkntorres@gmail.com

As cumarinas (2H-1-benzopirran-2-onas) constituem uma ampla classe de substâncias encontradas em espécies vegetais e e que apresentam variado espectro de atividades biológicas. Uma das mais importantes corresponde ao seu potencial leishmanicida, portanto constituem uma importante fonte de alternativas farmacológicas potenciais contra essa doença considerada como negligenciada e problema de saúde pública no Brasil e na América Latina. Nosso grupo de pesquisa descobriu, recentemente, durante triagem biológica com quimioteca própria, o potencial leishmanicida de duas cumarinas sintéticas. Uma delas foi usada como protótipo para ser otimizada em termos de solubilidade em água e redução de toxicidade, com o objetivo de melhorar os resultados dos testes *in vivo*. Assim, foram planejados novos derivados usando ferramentas computacionais de cálculos teóricos. Neste trabalho, apresentamos o planejamento de um derivado nitrílico a partir do protótipo e os procedimentos para sua obtenção sintética. O planejamento foi realizado baseado na disponibilidade de reagentes e no resultado da avaliação computacional efetuada por meio da ferramenta Swiss-ADME®, a qual oferece a possibilidade de prever parâmetros relacionados com a solubilidade em água (LogP e modelos matemáticos de solubilidade em água baseados em dados empíricos) e dados relacionados com o perfil de administração oral de fármacos (absorção intestinal teórica, Regras de Lipinski, indução no metabolismo hepático). Para a obtenção do referido derivado nitrílico, partiu-se do di-hidroeuugenol, que foi formulado pelo método de Reimer-Tiemann. Esse intermediário foi então utilizado para a síntese da cumarina protótipo seguindo a metodologia de condensação de Knoevenagel com 4-nitrobenzoilacetato de etila e piperidina em etanol. Posteriormente, o grupo nitro presente na cumarina foi convertido a amina via redução com cloreto de estanho. Numa reação *one-pot*, a arilamina obtida foi então diazotada sob banho de gelo com ácido p-toluenossulfônico e nitrito de sódio. Finalmente, através de um ataque nucleofílico, este grupo foi substituído por nitrila com cianeto de sódio seguindo condições clássicas da reação de Sandmeyer. Os intermediários e produto final obtidos até então foram caracterizados via ressonância magnética nuclear. Por meio do cálculo feito via Swiss-ADME, o derivado nitrílico possui menor valor de logP que o precursor nitrado, sendo classificado como moderadamente solúvel. Nitidamente, vê-se aumento da solubilidade em relação ao protótipo (fracamente solúvel). Ademais, a troca do grupo nitro pelo nitrila pode potencialmente diminuir a toxicidade, porque o grupo nitro é um conhecido grupo toxicofórico. Com a obtenção do derivado nitrílico, nossos próximos passos serão realizar modificações moleculares adicionais que visem melhorar ainda mais o perfil de solubilidade das cumarinas e diminuir potencialmente a toxicidade em relação ao protótipo, o que será avaliado em testes biológicos.

Palavras-chave: Cumarinas, Leishmaniose, fases ADME, Condensação de Knoevenagel, Reação de Sandmeyer.

Auxílio financeiro: Agradecimentos à CAPES pela concessão de auxílio financeiro para a execução desse projeto e à UNIFAL pela bolsa de estudos.

Híbridos de 5-nitroimidazois condensados a fenilpropanóides, substâncias com ação potencial antiparasitária e citotóxica

Cristiane Alves Tulha, Giovanna Fiore Serpa Ferreira de Lima, Mônica Fraccarolli Pelozo, Enya Vilar Gonçalves, Lucas Lopardi Franco

Universidade Federal de Alfenas, Laboratório de Química Farmacêutica, Farmácia
cris_tulha@hotmail.com

A hibridação molecular é uma estratégia eficaz no planejamento racional de estruturas moleculares de novos compostos bioativos protótipos, onde há a conjugação de substâncias bioativas distintas em uma única molécula, pois, em geral, o híbrido possui uma ação terapêutica superior às unidades individuais. Existem diversas estratégias diferentes que podem ser empregadas desta forma, neste trabalho, relatamos o uso da química “click”, que promove a obtenção de híbridos conectados por um anel triazol. Foi realizado o acoplamento de um derivado do metronidazol com derivados do Eugenol. O potencial bioativo dos 5-nitroimidazóis como antiparasitário já é bem conhecido. O Eugenol, um derivado fenilpropanóide, é uma substância presente nos óleos essenciais de várias plantas, o qual possui diversas propriedades farmacológicas já relatadas na literatura, como: antibacteriana, antifúngica, antiparasitária, citotóxica e antioxidante. Os objetivos deste trabalho englobam a síntese de híbridos 5-nitromidazol-fenilpropanóides a partir de um intermediário-chave azido do metronidazol, condensado a derivados adequadamente funcionalizados de fenilpropanóides via química “click”, assim a ação citotóxica, tripanocida, leishmanicida e antibacteriana. Também é planejado a realização do mecanismo de ação desses compostos. O intermediário-chave azido foi preparado por condições clássica de síntese orgânica, bem como os derivados funcionalizados fenilpropanóides. A condensação foi realizada por condição clássica de química “click”. Inicialmente escolheu-se o metronidazol como material de partida para preparação do intermediário-chave azido, que foi obtido com rendimentos satisfatórios, e em seguida acoplado em derivados fenilpropanóides funcionalizados. Dois híbridos já foram obtidos e outros estão sendo preparados de maneira similar, e em seguida se iniciará os ensaios biológicos e estudos de mecanismo de ação. Dois novos híbridos inéditos já foram obtidos por esta estratégia, que se mostrou extremamente eficiente. Outros híbridos serão preparados de maneira similar, e os ensaios biológicos e estudos de mecanismo de ação se iniciarão ainda esse semestre. Uma vez estabelecido esse novo padrão estrutural, uma série de novos híbridos serão planejados a partir dos primeiros resultados biológicos.

Palavras-chave: Hibridização; Planejamento racional de fármacos; Nitro-compostos

Auxílio financeiro: CNPq; CAPES; FAPEMIG.

Aplicação de sorventes magnéticos para análise rápida e direta de nicotina presente em amostras biológicas por espectrometria de massas ambiente

Tássia Venga Mendes¹, Eduardo Costa de Figueiredo¹

¹Universidade Federal de Alfenas – MG, Instituto de Ciências Farmacêuticas, PPGCF
tassiav@hotmail.com

A necessidade de se obter análises cada vez mais rápidas tem requerido processos simples, eficazes e com o mínimo ou nenhum preparo de amostras. No entanto, nem sempre o sinal analítico de amostras sem tratamento prévio é satisfatório para a análise de concentrações muito baixas. Sorventes magnéticos vem sendo amplamente aplicados no preparo de amostras complexas. Esta aplicação se dá de forma dispersiva e auxilia na praticidade e simplicidade durante a análise de analitos presentes neste tipo de matriz. Para determinação de concentrações muito baixas de substâncias de forma rápida e precisa, equipamentos como espectrômetro de massas (MS) podem ser utilizados em uma análise de modo direto, isto é, sem o acoplamento de cromatógrafos ou outros equipamentos. Neste contexto, muitas são as formas de se ionizar um analito para que o mesmo seja lido pelo detector. No entanto, a técnica EASI, do inglês *easy ambient sonic-spray ionization*, proposta por Eberlin e colaboradores, conta com a simplicidade de não ser preciso nenhum recurso externo para ionizar os analitos da amostra além de um spray formado por metanol acidificado. Partindo deste pressuposto, o trabalho visa utilizar nanomateriais magnéticos como sorventes unindo esta técnica de extração em fase sólida dispersiva (D-SPE) a espectrometria de massas para análise de nicotina em amostras de urina. Além disso, será proposta uma nova variante das técnicas de ionização ambiente. Será construída uma fonte EASI *home made* com materiais de baixo custo. Logo após a construção, a fonte será aplicada em todas as análises. Os materiais magnéticos Fe₃O₄@SiO₂ e nanotubos de carbono magnéticos (M-CNT) serão sintetizados e caracterizados por análise termogravimétrica (TGA), infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR), microscopia de transmissão eletrônica (TEM), análise da área superficial e porosidade (BET) e potencial zeta. Serão feitos estudos de cinética e isotermas de adsorção. Os dados serão tratados de acordo com os modelos pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem, ordem fracionária, quimissorção (Elovich) e difusão intrapartícula e os modelos de Langmuir, Freundlich, Sips, Khan, Toth e Redlich-Peterson, respectivamente. Em ambos os casos, serão considerados os valores de coeficiente de correlação linear (R²) e a função de erro (Ferror) para melhor adequação a cada modelo. O sistema proposto para a análise do material acoplado a fonte de ionização será denominado MSPE@EASI-MS. A hipótese é que os sorventes magnéticos, após um procedimento de D-SPE, possam ser acondicionados na ponta em um bastão magnetizado por uma bobina solenoide e então, expostos a fonte EASI de modo que os analitos sejam dessorvidos, ionizados e conduzidos ao MS. Neste processo serão otimizados parâmetros como i) distância e angulação da fonte, amostra e o MS ii) fluxo do gás utilizado na fonte, iii) concentração do ácido presente no solvente, iv) parâmetros do MS e v) parâmetros na extração do analito da amostra. Amostras de urina serão dopadas com nicotina de modo que este analito seja um piloto durante as análises frente aos diferentes analitos que podem ser analisados no futuro. Ademais, o método será validado seguindo o guia da AVISA quanto aos parâmetros de linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e recuperação. Após otimizado e validado, o método desenvolvido será aplicado em amostras reais de indivíduos fumantes. Espera-se que este trabalho obtenha resultados promissores e que seja desenvolvida uma nova vertente de análise direta por ionização ambiente utilizando MS.

Palavras-chave: sorventes magnéticos, ionização ambiente, EASI, nicotina, espectrometria de massas.

Auxílio financeiro: UNIFAL-MG; CAPES; FAPEMIG; CNPq.

Síntese e avaliação farmacocinética experimental em ratos *Wistar* de derivado glicosídico do eugenol

Rafael Leite Coelho, Vanessa Bergamin Boralli Marques (orientadora), Diogo Teixeira Carvalho (coorientador).

Universidade Federal de Alfenas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Laboratório de Análise de Toxicantes e Fármacos, Mestrado em Ciências Farmacêuticas.

leitecoelho@msn.com

A resistência microbiana aos antibióticos vem se tornando um problema cada vez mais sério. Diante disto, o desenvolvimento de fármacos originais com mecanismos de ação diferentes daqueles que se encontram no mercado atualmente ganham importância. Propriedades farmacocinéticas inadequadas são o principal empecilho no desenvolvimento de novos medicamentos. Parâmetros como biodisponibilidade, clearance, meia-vida e toxicidade devem ser avaliados cuidadosamente antes que qualquer fármaco chegue ao mercado, de forma a atribuir eficácia e segurança durante seu uso. Propõe-se com este projeto avaliar, em ratos *wistar*, a farmacocinética de um glicosídeo antifúngico obtido a partir do eugenol por grupo de pesquisa com o qual colaboramos. O trabalho será dividido em três partes: na primeira etapa ocorrerá a síntese do derivado glicosídico do eugenol em quantidade suficiente para a realização do estudo. Para a avaliação cinética serão utilizados 12 ratos machos *wistar* sadios que serão canulados para, posteriormente, receberem o candidato a antifúngico via gavagem. O sangue dos animais será colhido em 0,15; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 2; 3; 4 horas. O material coletado será analisado em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (GC-MS), em método anteriormente validado. Espera-se obter sucesso na avaliação farmacocinética do composto e que os parâmetros obtidos indiquem a possibilidade de evolução de estudos com o mesmo. Ainda, se não houver sucesso farmacocinético, há a possibilidade de realizarmos melhorias via estratégias de tecnologia farmacêutica, com avanços na fase biofarmacêutica, para uma classe tão importante de medicamentos e com tão poucas opções.

Palavras-chave: farmacocinética, antifúngico, validação de método, GC-MS.

Auxílio financeiro: CAPES.

Diagnóstico diferencial da proteína NS1 de Zika vírus e Dengue vírus através do reconhecimento com polímeros impressos molecularmente

Matheus Siqueira Silva¹, Ana Patricia Moreira Tavares², Luiz Felipe Leomil Coelho³, Maria Goreti Ferreira Sales², Eduardo Costa de Figueiredo¹

¹Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), Instituto de Ciências Farmacêuticas, PPGCF

²Instituto Superior de Engenharias do Porto (ISEP), Biomark – Sensor Research

³Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia e Imunologia, PPGCF

mth.siqueira@gmail.com

Arboviroses como zika, dengue e febre amarela se tornaram alvos de grande preocupação devido à rápida difusão em território brasileiro com um súbito aumento no número de casos. Até o presente momento não existem medidas profiláticas e/ou remediativas contra os vírus da zika e dengue. Diagnósticos que atuem de forma precisa em fases iniciais da infecção são fundamentais para que o paciente possa receber os devidos cuidados. A semelhança dos sintomas entre infecções por zika e dengue torna o diagnóstico clínico duvidoso e a similaridade estrutural entre esses vírus dificulta a elaboração de um método seletivo. As técnicas de diagnóstico sorológico e molecular apresentam diversas limitações relacionadas à aplicação, armazenamento e custo. Apesar de sua grande sensibilidade, a metodologia molecular é efetiva apenas até o 3º dia após o início dos sintomas e necessita de equipamento sofisticado e mão de obra qualificada, impossibilitando a aplicação desse diagnóstico em campo. Os diagnósticos sorológicos apresentam uma maior reatividade cruzada, são de difícil produção e apresentam 100% de sensibilidade apenas do 6º dia após o início das manifestações clínicas em diante. A NS1, uma glicoproteína comum a todos os flavivírus, encontrada tanto associada à membrana das células infectadas quanto secretada no soro. Essa proteína se mantém detectável em pacientes infectados com o vírus da dengue até o 6º dia de manifestação em infecções primárias, em concentrações de 10 ng.mL⁻¹ a 50 µg.mL⁻¹, mas não existem estudos de determinação da proteína em infecções com o zika vírus. A pré-desnaturação dessa proteína expõe de epítopos internos, os quais podem ser reconhecidos de forma mais seletiva. Dentre as inovações em diagnóstico, sensores eletroquímicos têm apresentado respostas rápidas e estrutura compacta, possibilitando a análise em locais de necessidade. O acoplamento de unidades de bioreconhecimento em eletrodos viabiliza a formação de um sinal eletroquímico proporcional à concentração de um determinado analito. Nesse aspecto, a impressão molecular está se tornando cada vez mais competitiva com enzimas e anticorpos em termo de reconhecimento, produzindo sensores com polímeros versáteis, seletivos e de baixo custo. Com o aperfeiçoamento da impressão de epítopos, a síntese de polímeros específicos para biomacromoléculas apresentou avanços em sensibilidade e seletividade. O reconhecimento artificial de proteínas por polímeros impressos ganhou espaço recentemente no diagnóstico clínico por fornecer quimiosensores rápidos, sensíveis, seletivos, robustos, não destrutivos, com baixo custo atribuído, portáteis e de fácil manuseio. O presente trabalho propõe a elaboração de quimiosensores capazes de detectar e diferenciar as proteínas NS1 de zika virus e dengue virus tipo I. Estão sendo empregados monômeros hidrossolúveis em pH fisiológico visando preservar a conformação estrutural do epítipo o mais próximo possível da conformação natural. O aminofenol é um composto eletroativo capaz de formar uma rede isolante com polimerização autolimitante. A voltametria cíclica é a técnica eletroquímica mais difundida dentre as aplicadas na formação de polímeros impressos. A espessura e porosidade do filme formado pode ser controlada variando a faixa de potencial aplicado, o número de ciclos e a velocidade de varredura, modificando a formação dos sítios de ligação na superfície do filme formado. Afim de avaliar as modificações nos eletrodos estão sendo empregadas as técnicas de voltametria de onda quadrada e a espectroscopia de impedância eletroquímica. Em ambos os casos são aplicadas baixas variações de potencial para evitar modificações no material durante a análise. As variações de condutividade e de capacitância permitem avaliar tanto a formação de

polímero, remoção da molécula molde e detecção do analito, quanto modificações indesejáveis no eletrodo auxiliar e no de referência. O trabalho se encontra em fase de otimização das etapas de síntese e caracterização do polímero. O polímero impresso apresenta aumento de corrente proporcional à adsorção da NS1 desnaturada de dengue vírus sorotipo 1, enquanto o não impresso apresenta comportamento aleatório. A cinética de adsorção seguida pelo sensor ainda não foi elucidada. As próximas etapa consistem em testes de seletividade frente à componentes de amostras reais de soro.

Palavras-chave: Dengue vírus, NS1, epítopo, MIP, Screen-Printed Electrodes, sensor.

Auxílio financeiro: CAPES; CNPq; FAPEMIG.