

RBAC

REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

SUMÁRIO

Fontes de células no transplante de células-tronco hematopoéticas.....	3
<i>Monalisa Lopes Mendes, Mestre, Henrique Neves da Silva Bittencourt, PhD, Luci Maria Sant'Ana Dusse, PhD</i>	
Sources of cells in hematopoietic stem cell transplant	
Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de <i>Staphylococcus aureus</i>.....	9
<i>Raissa M. R. Catão, José Maria Barbosa-Filho, Edeltrudes de Oliveira Lima, Maria do Socorro Vieira Pereira, Maria Angélica Ramos da Silva, Thúlio Antunes de Arruda, Rossana Miranda Pessoa Antunes</i>	
Evaluation of the antimicrobial activity and biological effect by riparins about elimination the resistance of drugs in samples of <i>Staphylococcus aureus</i>	
Avaliação do perfil de suscetibilidade antimicrobiana de <i>Enterococcus</i> spp. isolados em dois hospitais de Porto Alegre – RS, Brasil.....	15
<i>Eduardo André Bender, Ana Lúcia Peixoto de Freitas, Afonso Luis Barth</i>	
Evaluation of antimicrobial susceptibility profile of <i>Enterococcus</i> spp. isolated in two hospitals of Porto Alegre – RS, Brazil	
Alterações laboratoriais encontradas em indivíduos co-infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e pelo Vírus da Hepatite C (HCV).....	21
<i>Karen Freitas Santos, Taise Biscaglia Vieira, Sandra Trevisan Beck, Daniela Bittencourt Rosa Leal</i>	
Laboratorial alterations found in individuals co-infections with the human immunodeficiency virus (HIV) and the hepatitis C virus (HCV)	
Terapia de Reposição de Testosterona: A Polêmica.....	25
<i>Dartora, D.R.; Nienow, D.; Baraldi, D.D.; Schneider, R.; Lara, G.M.</i>	
Testosterone replacement therapy	
Avaliação da Atividade Antimicrobiana <i>in vitro</i> do extrato hidroalcoólico de <i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville sobre isolados ambulatoriais de <i>Staphylococcus aureus</i>.....	27
<i>Ferreira, Sávio Benvindo; Palmeira, Josman Dantas; Souza, Joely Holanda de; Almeida, João Maurício de; Figueiredo, Maria Cecília Pereira; Pequeno, Allamahac Silva; Arruda, Thúlio Antunes; Antunes, Rossana Miranda Pessoa; Catão, Raissa Mayer Ramalho</i>	
Evaluation of the antimicrobial activity <i>in vitro</i> of the hydroalcoholic extract <i>Stryphnodendron adstringens</i> against of <i>Staphylococcus aureus</i> strains	
Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos hidroalcoólico de angico sobre cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>.....	33
<i>Palmeira, Josman Dantas; Ferreira, Sávio Benvindo; de Souza, Joely Holanda; de Almeida, João Maurício; Figueiredo, Maria Cecília; Pequeno, Allamahac Silva; Arruda, Thúlio Antunes; Antunes, Rossana Miranda Pessoa; Catão, Raissa Mayer Ramalho</i>	
Evaluation of the antimicrobial activity <i>in vitro</i> and determination of minimum the inhibitory concentration (MIC) of hydroalcoholic extracts of angico in strains <i>Staphylococcus aureus</i>	
Padronização de dosagem de produto de degradação fibrinogênio/fibrina humano.....	39
<i>Eliane Mari de Oliveira; Izolete Aparecida Thomazini Santos; Rosana Rossi Ferreira; Elenice Deffune</i>	
Human fibrin/fibrinogen degradation product dosage standardization	
Microalbuminúria: aviso de alerta às nefropatias diabéticas.....	43
<i>Juliano Lacava Pereira, Alexandre Nabaes Ferreira, Diogo Gabriel e José Edson Paz da Silva</i>	
Microalbuminuria: notice of alert to diabetics nephropathies	
Flavonóides e aterosclerose.....	49
<i>Tânia T. de OLIVEIRA, Rosimar Regina da SILVA, Waleska C. DORNAS, Tanus J. NAGEM</i>	
Flavonoids and Atherosclerosis	
Efeito da pasteurização sobre os níveis de IgA secretora do leite humano maduro.....	55
<i>Fabício Andrade Martins Esteves, Vanessa de Albuquerque Silva, Larissa Marques Maciel</i>	
Effect of pasteurization on secretory IgA levels from breast human milk	
Prospecção de leveduras em secreção vaginal e correlação com hemograma e dosagem de glicose.....	59
<i>Bruno Severo Gomes, Adriana Nunes de Lima, Rejane Pereira Neves, Olliane Maria Correia Magalhães, Viviana Giampaoli, Ana Lúcia Figueiredo Porto & Lusinete Acirole de Queiroz</i>	
Prospection of yeasts in vaginal secretion and correlation with hemograma and dosage of glucose	
Prevalência de resistência a proteína- C ativada (RPAC) em pacientes atendidos no laboratório médico Santa Luzia – Florianópolis – SC.....	65
<i>Santos, J.D; Zunino, J.N; Neiva, T.J.C.</i>	
Prevalence of activated protein C resistance (APCR) in patients attended in the Medical Laboratory Santa Luzia - Florianópolis – SC	
Efeito de flavonóides e de corantes do urucum sobre a hiperlipidemia induzida em coelhos.....	69
<i>Leonardo Ramos Paes de Lima, Tânia Toledo de Oliveira, Tanus Jorge Nagem, Sergio Pacheco</i>	
Flavonoids and natural urucum dyes on induced hyperlipidemic rabbits	
Avaliação da atividade enzimática de gama-glutamyl-transferase em ex-dependentes do álcool.....	75
<i>José Ricardo dos Santos Vieira, Ana Maria G. Reis, André Victor Sena Silva, Marcelo T. Saito Ito, Patrícia S.F. Jaime</i>	
Evaluation of gamma-glutamyltransferase enzymatic activity in former-alcoholics	

1

VOLUME 42
2010

Fontes de células no transplante de células-tronco hematopoéticas

Sources of cells in hematopoietic stem cell transplant

Monalisa Lopes Mendes, Mestre¹; Henrique Neves da Silva Bittencourt, PhD² & Luci Maria Sant'Ana Dusse, PhD¹

RESUMO - O transplante de células-tronco hematopoéticas constitui um recurso terapêutico utilizado para uma série de doenças malignas e para várias doenças congênitas e adquiridas de origem hematopoética, genética ou imunológica. Os primeiros transplantes foram realizados utilizando células-tronco obtidas da medula óssea. Posteriormente, células-tronco passaram a ser obtidas também do sangue periférico e do sangue de cordão umbilical. Nesta revisão são abordados alguns aspectos referentes ao uso das diferentes fontes de células no transplante de células-tronco-hematopoéticas e a sua relação com a ocorrência da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) e a recuperação hematopoética pós-transplante.

PALAVRAS-CHAVE - Transplante de células-tronco hematopoéticas, células-tronco.

SUMMARY - Bone marrow transplantation is a therapy recommended for some malignancies and various acquired and inherited diseases, which have hematopoietic, genetic or immunologic origin. Originally hematopoietic stem cells for transplantation were harvested from the bone marrow but in recent years two other sources, peripheral blood and umbilical cord, have been introduced. In this review we consider aspects about the use of different sources of cells in hematopoietic stem cell transplant, and their correlation with the graft-versus-host disease (GVHD) and hematologic recovery after transplantation.

KEYWORDS - Bone marrow transplant, stem cells.

INTRODUÇÃO

O transplante de células-tronco hematopoéticas constitui um recurso terapêutico utilizado para resgatar os pacientes que receberam quimioterapia ou irradiação em doses letais para o tratamento de uma série de doenças malignas hematológicas (leucemias, linfomas, mielodisplasias, mieloma múltiplo)¹ e para várias doenças congênitas e adquiridas de origem hematopoética, metabólicas ou imunológicas (aplasia de medula óssea, anemia de fanconi, adrenoleucodistrofia, etc.)². Avanços na tecnologia de obtenção e manipulação das células-tronco hematopoéticas, bem como a maior compreensão da histocompatibilidade, o aprimoramento do condicionamento do paciente, por quimio- ou radioterapia e melhorias na terapia de suporte, tem contribuído para a melhora contínua nos resultados do transplante de células-tronco hematopoéticas³.

Os transplantes são classificados, de acordo com o doador de células-tronco, como singênicos, alogênicos e autólogos. No transplante singênico o doador é um gêmeo univitelino, no alogênico as células-tronco provêm de um outro doador, aparentado ou não e no autólogo as células-tronco são obtidas do próprio paciente⁴.

FONTES DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS PARA TRANSPLANTE

Durante vários anos as células-tronco hematopoéticas utilizadas eram obtidas apenas da medula óssea. A partir do meio da década de oitenta, células-tronco passaram a ser obtidas do sangue periférico⁵ e também do sangue de cordão umbilical⁶⁻⁸. Atualmente, o sangue periférico constitui a principal fonte de células-tronco para transplantes autólogos e alogênicos⁹. Observa-se também o uso crescente de células-tronco obtidas do sangue de cordão, especialmente em crianças⁶⁻⁸.

a) Células-tronco da medula óssea

A obtenção de células-tronco da medula óssea é feita por múltiplas punções, de ambas as cristas ilíacas do doador,

posicionado em decúbito ventral¹⁰. Este procedimento exige internação do doador e é realizado sob anestesia geral ou regional¹¹. Para o sucesso dos transplantes alogênicos, é recomendado que seja obtido um número de células nucleadas superior a 2×10^8 /Kg. Dessa forma, quando o peso do doador for semelhante ao do receptor, este valor é obtido pela aspiração de aproximadamente 10mL/kg de peso do doador, em volume de medula óssea aspirada¹⁰.

A aspiração da medula é feita com agulhas apropriadas que atingem a região medular do osso, onde volumes de aproximadamente 5 a 10 mL são aspirados repetidas vezes. Assim, a cada 5 a 10mL de medula aspirada, a seringa é removida e o seu conteúdo é imediatamente transferido para uma bolsa contendo uma associação de anticoagulante, meio de cultura e heparina. Várias aspirações são obtidas de uma única perfuração da pele¹¹. Este material é então filtrado, para remover espículas ósseas e gordura¹². De modo geral, a coleta de medula é um procedimento simples e a maioria dos doadores recebe alta hospitalar até 24 horas após o procedimento^{10,11}.

Os efeitos adversos relacionados à coleta de medula óssea são mínimos e incluem fadiga, dor no local da coleta, cefaléia e dor nas costas. Além desses, podem ocorrer os efeitos relacionados à anestesia, como náusea, vômitos e dor de garganta^{10,13,14}. Efeitos adversos mais sérios são estimados em 0,1-0,3% dos casos e incluem pneumonia por aspiração, trombose venosa profunda, infecção bacteriana grave, arritmia cardíaca grave e acidente vascular cerebral¹⁵.

A quantificação do número de células-tronco presente no enxerto de medula óssea infundido no receptor tem relevância clínica¹⁶. Como falado acima, a quantificação de células nucleares presentes na medula óssea é o parâmetro mais simples e rápido de mensuração¹⁷. Entretanto, outros parâmetros, como a quantificação do número de unidades formadoras de colônia de granulócito/macrófago (CFU-GM)¹⁸ e, mais recentemente, no número de células CD34+ presentes na medula óssea, têm sido empregados^{16,19}.

Atualmente, o número de células CD34+ presentes no enxerto tem sido o parâmetro com maior relevância clínica.

Recebido em 17/07/2007

Aprovado em 04/01/2010

¹Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas – Faculdade de Farmácia / UFMG

²Servico de Transplante Medular – Hospital das Clínicas / UFMG

No entanto, o número ideal para o transplante varia em função da situação clínica e massa corpórea do paciente, bem como do tipo de transplante^{16,19}. A presença da molécula de superfície CD34, determinada através do uso da citometria de fluxo, identifica uma célula considerada como a célula-tronco hematopoética. Assim, este parâmetro estima a quantidade aproximada de células-tronco infundidas no momento do transplante. Esta medida correlaciona-se com uma série de desfechos no transplante, especialmente no transplante alogênico (sobrevida global, mortalidade relacionada ao procedimento, recuperação hematopoética, etc.)¹⁶. A manipulação do enxerto tem sido realizada em diversos centros de transplante visando a remoção ou enriquecimento e expansão de várias populações de células hematopoéticas. Estas técnicas possibilitam a realização de transplantes com menos complicações imunológicas, especialmente em situações onde não existe compatibilidade HLA completa²⁰.

b) Células-tronco do sangue periférico (CTP)

Em condições normais, há um pequeno número de células-tronco (CD34+) presentes no sangue periférico. Dessa forma, a utilização desta via para obtenção de células-tronco para o transplante medular exige a mobilização prévia destas da medula óssea para o sangue²¹. Essa mobilização é feita pela administração de fator de crescimento hematopoético recombinante ou fator estimulante de colônia (CSF), visando alcançar uma concentração suficiente de células CD34+ no sangue, de modo a garantir o sucesso do transplante^{21,22}.

Nos transplantes autólogos, o procedimento de coleta de células CD34+ pode também incluir o tratamento do paciente com agentes citostáticos em doses altas, porém não mieloablativos previamente ao uso dos fatores de crescimento²³. O agente de mobilização mais comumente utilizado é a filgrastima. Sua administração usual é de 10-16µg/Kg de peso do doador em dose diária, o qual deve ser administrado em injeção subcutânea única ou dividida em duas injeções. Para o transplante alogênico, a coleta de células CD34+ começa após o quarto ou quinto dia de filgrastima, quando utilizado isoladamente²⁴. Já no transplante autólogo, pode-se buscar o momento ideal da coleta pelo número de células CD34+ circulando no sangue periférico. Recomenda-se iniciar a coleta quando se atinge a marca de 10 células CD34+/µL²⁵.

A coleta das células CD34+ é feita através de um processo conhecido como aférese, que consiste em um sistema de fluxo contínuo para separação de frações do sangue. O sangue é obtido por punção da veia antecubital, ou, caso o acesso venoso periférico não seja adequado, por punção de veia central com uso de cateter. Dessa forma, o sangue passa pelo equipamento de aférese (30-90mL/minuto) e é centrifugado em fluxo contínuo, de modo a obter a separação de uma fração composta predominantemente de células mononucleares e plaquetas. Essa fração, rica em células CD34+, é coletada em uma bolsa, enquanto o restante do sangue é re-infundido no doador^{22,26-30}. Durante um procedimento de três horas é possível processar cerca de nove a doze litros de sangue. O número de células CD34+ obtido varia entre os doadores e depende da concentração destas no sangue do doador antes da coleta^{22,26-30}.

O número ideal de células CD34+ para o transplante alogênico não está bem estabelecido e, usualmente o transplante é feito com 4 a 6 x 10⁶ células CD34+/Kg de peso do receptor²⁷⁻³¹. No transplante autólogo a recomendação é um número superior a 2 x 10⁶ células CD34+/Kg de peso do paciente³². Para a maioria dos receptores adultos, uma ou duas leucoaféreses onde 12L de sangue do doador são processados,

são suficientes para prover o número de células CD34+ necessário para o transplante^{26,33}.

Até meados da década de 90, havia receio na utilização de G-CSF no que tange aos efeitos causados ao doador²⁴. A experiência tem mostrado que esta terapia não causa problemas sérios ao doador. Os efeitos adversos frequentemente relatados incluem dor nos ossos, principalmente na espinha dorsal, pelve e costelas, cefaléia, náusea, vômito, mialgia, fadiga e insônia²⁷. Além desses, ocorrem alterações importantes na bioquímica do plasma e na contagem de células sanguíneas, com um aumento significativo de desidrogenase láctica (LDH) e alanina aminotransferase (ALT)³⁴. O número total de leucócitos aumenta expressivamente, chegando a 70-80x10⁹/L e diminui após a aférese³⁴. A contagem de plaquetas diminui em cerca de 20 a 30% em cada coleta e não recupera antes do terceiro ou quarto dia após a última aférese. De modo geral, a plaquetopenia consiste no efeito adverso mais preocupante³⁴.

O procedimento de aférese também traz alguns inconvenientes para o doador. O acesso venoso periférico da veia antecubital pode produzir hematoma ou sangramento. A anticoagulação com citrato ácido-dextrose (ACD) pode levar a sintomas de hipocalcemia³⁵. Doadores portadores de anemia falciforme podem manifestar uma crise grave de falcização após a leucoaférese³⁶. Em dois casos foi relatado ruptura esplênica espontânea³⁷.

c) Células-tronco do sangue do cordão umbilical

O uso potencial do sangue de cordão umbilical como fonte de células-tronco foi proposto em 1982⁶ e o primeiro transplante utilizando essa fonte foi feito em 1988, em uma criança de cinco anos com anemia de Fanconi⁷. Graças ao sucesso obtido, transplantes com sangue de cordão umbilical passaram a ser uma opção viável para numerosas doenças malignas e não malignas³⁸.

O sangue do cordão umbilical contém um número elevado de células CD34+ por mL. No entanto, o volume obtido em cada coleta é pequeno e varia de 50 a 200mL. Dessa forma, o número de células obtidas é, em geral, suficiente apenas para os pacientes com peso de 30-40 kg, considerando a relação número de células CD34+/Kg de peso do receptor³⁸. O sangue do cordão é coletado logo após o nascimento da criança, processado e mantido congelado até o momento da infusão. A unidade de sangue deve conter um número baixo de células T maternas e estar livre de agentes infecciosos transmissíveis. O procedimento de coleta de sangue de cordão parece não ter impacto clínico para o recém-nascido ou para a mãe^{39,40}. O Colégio Americano de Obstetria e Ginecologia⁴¹ e a Academia Americana de Pediatria⁴² têm recomendado que o procedimento obstétrico padrão não seja alterado para facilitar a coleta do sangue de cordão.

Uma unidade de sangue de cordão, geralmente contém um número 10 vezes menor de células nucleadas e CD34+ comparando-se com o material obtido da medula óssea ou do sangue periférico após uso de G-CSF³⁹.

A coleta sistemática de sangue de cordão umbilical por bancos públicos de armazenamento viabilizou a existência, hoje, de mais de 180.000 unidades disponíveis em todo o mundo, o que tem possibilitado a realização de transplantes não relacionados para uma série de pacientes. No Brasil o programa Brasilcord já dispõe de quatro bancos públicos de sangue de cordão umbilical em atividade⁴³.

Apesar do esforço dos bancos públicos em armazenar o maior número de unidades de sangue de cordão quanto possível, um grande número de doadores não são eleitos para a doação⁴⁴. Os principais motivos para não realizar a

coleta do sangue de cordão é a presença de doenças sexualmente transmissíveis na mãe, febre materna durante o parto, medicamentos administrados à mãe, doenças maternas, complicações no parto, presença de infecções e problemas com a placenta ou com o cordão umbilical⁴⁴.

CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS EM FUNÇÃO DA ORIGEM DAS CÉLULAS TRANSPLANTADAS

Dois aspectos tem sido considerados de grande importância na avaliação de pacientes transplantados. O primeiro se refere ao tempo para repovoamento da medula óssea do paciente, a chamada "pega do transplante". O segundo, específico do transplante alogênico, está relacionado ao surgimento da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH). Essa doença está associada ao reconhecimento de antígenos do hospedeiro pelas células imunologicamente competentes presentes no enxerto (principalmente os linfócitos T)⁴⁵. A DECH pode ocorrer logo após o transplante (DECH aguda) ou mais tardiamente (DECH crônica)⁴⁵.

A recuperação do número de neutrófilos e plaquetas nos transplantes é mais rápida quando o transplante é feito com células-tronco periféricas (CTP), comparando-se com células-tronco da medula óssea⁴⁶. Estudos mostram que a recuperação de neutrófilos e plaquetas ocorre de cinco a seis dias mais cedo nos transplantes com CTP em relação àqueles com células-tronco da medula óssea. O tempo médio para recuperação dos neutrófilos para valores $\geq 0,5 \times 10^9/L$ varia de 12 a 19 dias com CTP e de 15 a 25 dias com medula óssea⁴⁶⁻⁴⁸.

O produto final para enxerto obtido do sangue periférico por aférese apresenta um número de 10-15 vezes maior de linfócitos T que aquele obtido da medula óssea⁴⁸. Este número elevado de linfócitos T presentes no enxerto, tem resultado em um aumento da incidência de DECH crônica nos transplantes alogênicos com CTP comparados àqueles com células-tronco de medula óssea^{47,48}.

Teoricamente, seria esperado um risco maior de DECH aguda em transplante utilizando CTP, devido à infusão de um número elevado de linfócitos T. No entanto, isso não tem sido observado na maioria dos estudos^{46,47}.

O maior número de linfócitos T infundidos nos transplantes utilizando CTP confere, em teoria, um risco menor de recaída da doença devido ao efeito do enxerto contra a doença, ou seja os linfócitos T reconhecem e rejeitam antígenos da célula neoplásica, o que contribui para a sua eliminação⁴⁹. Em um estudo retrospectivo de pacientes com leucemia mielóide crônica (LMC), submetidos a transplante com CTP ou células-tronco obtidas da medula óssea de irmãos HLA idênticos ou de irmãos com um antígeno diferente, foi observado um risco menor de recaída molecular e citogenética nos pacientes que receberam CTP em relação aos que receberam células-tronco da medula óssea⁴⁹.

O transplante com CTP está associado a uma redução no risco de mortalidade relacionada ao transplante. Uma análise retrospectiva mostrou um índice mais baixo de mortalidade relacionada ao transplante nos pacientes com leucemia aguda avançada e com LMC em estágios avançados⁵⁰. Por outro lado, não houve evidência de redução da mortalidade relacionada ao transplante em pacientes com doença recente, como leucemia aguda em primeira remissão ou leucemia mielóide crônica em fase crônica. Estes resultados sugerem que o benefício clínico da recuperação hematológica ("pega") mais rápida nos transplantes com CTP seria mais importante para os pacientes com doença avançada, os quais estão sujeitos a um risco maior de mortalidade devido

a ocorrência de infecções e hemorragia no período pós-transplante⁵⁰. Por outro lado, o uso de CTP no transplante alogênico de crianças e adolescentes está associado a uma sobrevida global pior. Seu papel nessa circunstância está sendo reavaliado com base nesses resultados recentes⁵¹.

O uso de CTP no transplante autólogo hoje é considerado como o padrão ouro, já que as dificuldades em relação a DECH inexistem e a recuperação mais rápida obtida possibilita uma redução na mortalidade, além de uma alta hospitalar mais precoce²¹.

Nos últimos anos, o transplante com células-tronco obtidas do sangue de cordão umbilical tem sido uma opção viável, mesmo para receptores adultos, quando não se encontra doadores disponíveis. No entanto, a recuperação hematológica é mais demorada⁵². O número reduzido de células CD34+ presente nesta modalidade de transplante é um fator limitante e tem sido mostrado que quanto menor o número de células CD34+ infundidas, maior a taxa de mortalidade⁵². Por outro lado, o transplante com células-tronco obtidas do sangue de cordão umbilical está associado a maior tolerância imunológica, uma vez que as células imunologicamente competentes presentes no enxerto reconhecem um número limitado de antígenos. Isto permite maior disparidade no HLA sem um aumento significativo na taxa de DECH aguda ou crônica³⁹. A mortalidade excessiva devido à demora da recuperação hematológica e/ou falha de "pega", conseqüente ao menor número de células CD34+ infundidas, parece ser contrabalançado pela redução das mortes relacionadas às complicações da DECH, resultando em taxas similares de sobrevida, quando comparado com transplante feito com CTP ou com células-tronco obtidas da medula óssea^{39,52}. Por outro lado, considerando a correlação entre a ocorrência de DECH e a reação enxerto contra leucemia, a redução da DECH teoricamente implicaria numa redução da reação enxerto contra leucemia e um aumento na incidência de recaída após o transplante com células-tronco obtidas do sangue de cordão umbilical^{39,52}. Na realidade tem-se observado em algumas séries de casos um aumento nas taxas de recidiva após o transplante com sangue de cordão umbilical^{53,54}. No entanto, a maior parte desses transplantes ocorreu em crianças com alto risco de recidiva (fases avançadas de doença)^{53,54}. Estudos recentemente publicados, não têm comprovado um efeito enxerto contra leucemia reduzido com sangue de cordão em relação às outras fontes^{55,56}.

Várias estratégias têm sido avaliadas para superar a limitação do número reduzido de células CD34+ presentes no sangue do cordão umbilical, incluindo a transfusão simultânea de duas unidades de sangue de cordão de doadores distintos⁵⁷, expansão *ex vivo* das células-tronco⁵⁸, bem como estimulação *in vivo* dessas, usando fatores de crescimento ou agentes que aumentam a expressão de moléculas de adesão⁵⁹.

DISCUSSÃO

O transplante de células-tronco hematopoéticas é atualmente utilizado para o tratamento de diversas doenças neoplásicas (leucemias, linfomas, mieloma múltiplo) e não-neoplásicas (aplasia medular, hemoglobinopatias, distúrbios metabólicos ou imunológicos congênitos e doenças auto-imunes). Dados do Registro Europeu de Transplante de Sangue e Medula Óssea (European Group for Blood and Marrow Transplantation – EBMT) mostraram que em 1990, 85% dos transplantes autólogos utilizavam CTP, enquanto em 2001 esta taxa era de 97%. Houve também, um aumento significativo no uso de CTP nos transplantes alogênicos. Em 1990 não havia relato de transplante alogê-

nico utilizando sangue periférico, em 2001 cerca de 63% destes transplantes utilizavam CTP^{60,61}. Já em relação à utilização de sangue de cordão umbilical, dados do Registro Internacional de Transplante de Medula Óssea (International Bone Marrow Transplantation Registry – IBMTR) mostram que, entre 1995 e 2000, quase 20% dos transplantes realizados em pacientes com idade inferior a 20 anos utilizaram esta fonte de células⁶². A utilização de CTP praticamente substituiu o uso de medula óssea nos transplantes autólogos⁹. Nos transplantes alogênicos de CTP, apesar da recuperação hematopoética mais rápida e menor tempo de hospitalização, existe o inconveniente de um risco maior de DECH comparado ao uso de células-tronco hematopoéticas (CTH) provenientes da medula óssea⁴⁶. Deve-se evitar usar CTH provenientes do sangue periférico em crianças⁵¹. O sucesso dos transplantes com doador familiar e a observação da redução das complicações imunológicas no transplante com sangue de cordão umbilical quando comparado ao uso de medula óssea levou a criação de bancos de sangue de cordão com doadores não-aparentados a partir de 1993⁴⁰. Infelizmente, a maioria dos pacientes que poderiam se beneficiar do transplante de medula óssea alogênico não encontra doador compatível na família. Visando solucionar este problema foi criado o Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea (REDOME)⁶³. Apesar do sucesso deste programa, nem sempre é possível encontrar, em tempo hábil, um doador de células-tronco HLA compatível para todos os pacientes que precisam de transplante alogênico. Nestas circunstâncias, os bancos de células-tronco de sangue de cordão constituem uma alternativa promissora⁴⁰.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPQ pela bolsa concedida ao projeto da mestre Monalisa Lopes Mendes.

REFERÊNCIAS

- GRATWOHL A, BALDOMERO H, HORISBERGER B, SCHMID C, PASSWEG J, URBANO-ISPIZUA A. Accreditation Committee of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). A current trends in hematopoietic stem cell transplantation in Europe. *Blood*, v.100, p.2374-86, 2002.
- ARMITAGE, J.O. Bone marrow transplantation. *N Engl J Med*, v.330, p. 827-38, 1994.
- SANTOS, G.W. History of Bone Marrow Transplantation. *Clin Haematol*; v.12, p.611-639, 1983.
- ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. Hematologia: Fundamentos e Prática. São Paulo, SP: Editora Atheneu, 2004.
- MATSUNAGA T, SAKAMAKI, S., KOHGO Y, OHI S, HIRAYAWAY, NIITSU Y. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor can mobilize sufficient amounts of peripheral blood stem cells in healthy volunteers for allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transplant*, v.11, p. 103-108, 1993.
- BROXMEYER HE, DOUGLAS GW, HANGOC G, COOPER S, BARD J, ENGLISH D, ARNY M, THOMAS L, BOYSE EA. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, Washington, v.86, p. 3828-3832, 1989.
- GLUCKMAN E, BROXMEYER HA, AUERBACH AD, FRIEDMAN HS, DOUGLAS GW, DEVERGIE A, ESPEROU H, THIERRY D, SOCIE G, LEHN P. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from na HLA-identical sibling. *N Engl J Med*, v.321, p. 1174-1178, 1989.
- KASAI, M.; MASAUI, N. The characteristics of umbilical cord blood (UCB) and UCB transplantation. *Semin thromb hemost*, v.24, p.491-495, 1998.
- GRATWOHL A, BALDOMERO H, FRAUENDORFER K, URBANO-ISPIZUA A; Joint Accreditation Committee, International Society for Cellular Therapy; European Group for Blood and Marrow Transplantation EBM T activity survey 2004 and changes in disease indication over the past 15 years. *Bone Marrow Transplant*. 2006 Jun;37(12):1069-85.

- THOMAS, E.D.; STORB, R. Technique for human marrow grafting. *Blood*, v.36, p.507-15, 1970.
- TRELEAVEN, J.G.; MEHTA, J. Bone marrow and peripheral blood stem cell harvesting. *J hematother*, v.1, p.215-23, 1992.
- NEUDORF S, HENDRIXSON M, HAMMOND J, HARRIS R, HAKE D, JONES M, PIETRYGA D, SAMBRANO J. A modified method for human bone marrow filtration prior to bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, v.4, p. 97-100, 1989.
- STRONCEK DF, HOLLAND PV, BARTCH G, BIXBY T, SIMMONS RG, ANTIN JH, ANDERSON KC, ASH RC, BOLWELL BJ, Hansen JA. Experiences of the first 493 unrelated marrow donors in the National Marrow Donor Program. *Blood*, v.81, p.1940-6, 1993.
- BUCKNER CD, CLIFT RA, SANDERS JE, STEWART P, BENSINGER WI, DONEY KC, SULLIVAN KM, Witherspoon RP, Deeg HJ, Appelbaum FR. Marrow harvesting from normal donors. *Blood*, v.64, p.630-4, 1984.
- BORTUR, M.M.; BUCKNER, C.D. Major complications of marrow harvesting for transplantation. *Exp hematol*, v.11, p.916-21, 1983.
- BITTENCOURT H, ROCHA, V, CHEVRET S, SOCIÉ G, ESPEROU H, DEVERGIE A, DAL CORTIVO L, MAROLLEAU JP, GARNIER F, RIBAUD P, GLUCKMAN E. Association of CD34 cell dose with hematopoietic recovery, infections, and other outcomes after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood*, v.99, p.2726-2733, 2002.
- KESSINGER A, ARMITAGE JO, LANDMARK JD, SMITH DM, WEISENBURGER DD. Autologous peripheral hematopoietic stem cell transplantation restores hematopoietic function following marrow ablative therapy. *Blood*, v.71, p.723-7, 1988.
- JANSEN J, HANKS S, THOMPSON JM, DUGAN MJ, AKARD LP. Transplantation of hematopoietic stem cells from the peripheral blood. *J Cell Mol Med*, v.9, p.37-50, 2005.
- SIENA S, BREGNI M, BRANDO B, BELLI N, RAVAGNANI F, GANDOLA L, STERN A, LANSDORP P M, BONADONNA G, GIANNI AM. circulating hematopoietic progenitors for autologous transplantation in cancer patients. *Blood*, v.77, p.400-9, 1991.
- HENSLEE-DOWNEY PJ, ABHYANKAR SH, PARRISH RS, PATI AR, GODDER KT, NEGLIA WJ, GOON-JOHNSON KS, GEIER SS, LEE CG, GEE AP. Use of partially mismatched related donors extends access to allogeneic marrow transplant. *Blood*, v.89, p.3864-72, 1997.
- BAY JO, PEFFAULT DE LATOUR R, TOURNILHAC O, CHOUFI B, CHASAGNE J. Hematopoietic growth factors and autologous or allogeneic stem cell transplantation. *Bull Cancer*, v.93, p.473-482, 2006.
- SCHMITZ N, LINCH DC, DREGER P, GOLDSTONE AH, BOOGAERTS MA, FERRANT A, DEMUYNCK HM, LINK H, ZANDER A, BARGE A. Randomised trial of filgrastim-mobilised peripheral blood progenitor cell transplantation versus autologous bone-marrow transplantation in lymphoma patients. *Lancet*, v.347, p.353-357, 1996.
- BRUNVAND MW, BENSINGER WI, SOLL E, WEAVER CH, ROWLEY SD, APPELBAUM FR, LILLEBY K, CLIFT RA, GOOLEY TA, PRESS OW, FEFER A, STORB R, SANDERS JE, MARTIN PL, CHAUNCEY T, MAZIARZ RT, ZUCKERMAN N, MONTGOMERY P, DORN R, WEIDEN PL, DEMIRER T, HOLMBERG LA, SCHIFFMAN K, MCSWEENEY PA, BUCKNER CD High-dose fractionated total-body irradiation, etoposide and cyclophosphamide for treatment of malignant lymphoma: comparison of autologous bone marrow and peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplant*, v.18, p.131-141, 1996.
- VIGORITO A C, AZEVEDO W M, MARQUES J F C, AZEVEDO A M, EID K A B, ARANHA F J P, LORAND-METZE I, OLIVEIRA G B, CORREA M E P, REIS A R C, MIRANDA E C M, SOUZAAC A. A randomised, prospective comparison of allogeneic bone marrow and peripheral blood progenitor cell transplantation in the treatment of haematological malignancies. *Bone Marrow Transplant*, v.22, p.1145-1151, 1998.
- NARAYANASAMI U, KANTETI R, MORELLI J, KLEKAR A, AL-OLAMA A, KEATING C, O'CONNOR C, BERKMAN E, ERBAN JK, SPRAGUE KA, MILLER KB, SCHENKEIN DP Randomized trial of filgrastim versus chemotherapy and filgrastim mobilization of hematopoietic progenitor cells for rescue in autologous transplantation. *Blood*, v.98, p.2059-2064, 2001.
- STRONCEK DF, CLAY ME, SMITH J, HERR G, ILSTRUP S, KUNKEL LA, MCCULLOUGH J Composition of peripheral blood progenitor cell components collected from healthy donors. *Transfusion*, v.37, p.411-7, 1997.
- MAJOLINO I, CAVALLARO AM, BACIGALUPO A, RAMBALDI A, FALDA M, LOCATELLI F, RAIMONDI R, PUCCI G, MORDINI N, BARBUI T, LOCATELLI F, RODEGHIRO F, IRRERA G, INDOVINA A, VALBONESI M, BELLAVITA P, TASSI V, PEROTTI C, SOLI M, BRESOLIN G. Mobilization and collection of PBSC in healthy donors: a retrospective analysis of the Italian Bone Marrow Transplantation Group. *Haematologica*, v.82, p.47-52, 1997.
- KOBBE G, SOEHNEN D, HEYLL A, FISCHER J, THIELE KP, AUL C, WERNET

- PLarge volume leukapheresis maximizes the progenitor cell yield for allogeneic peripheral blood progenitor donation. *J hematother*, v.6, p.125-31, 1997.
29. MIFLIN G, CHARLEY C, STAINER C, ANDERSON S, HUNTER A, RUSSELL N Stem cell mobilization in normal donors for allogeneic transplantation. Analysis of safety and factors affecting efficacy. *Br J Haematol*, v.95, p.345-8, 1996.
 30. ANDERLINI P; ILAUPPE J, PRZEPIORKA D, SEONG D, CHAMPLIN R Peripheral blood stem cell apheresis in normal donors. Feasibility and yield of second collections. *Br J Haematol*, v.96, p.415-7, 1997.
 31. KÖRBLING M, PRZEPIORKA D, HUH YO, ENGEL H, VAN BESIEK K, GIRALT S, ANDERSSON B, KLEINE HD, SEONG D, DEISSEROTH AB. Allogeneic blood stem cell transplantation for refractory leukemia and lymphoma: potential advantage of blood over marrow allografts. *Blood*, v.85, p.1659-65, 1995.
 32. DELAMAIN MT, METZE K, MARQUES JF JR, REIS AR, DE SOUZA CA, LORAND-METZE I. Optimization of CD34+ collection for autologous transplantation using the evolution of peripheral blood cell counts after mobilization with chemotherapy and G-CSF. *Transfus Apher Sci*, v.34, p.33-40, 2006.
 33. ANDERLINI P, PRZEPIORKA D, SEONG D, MILLER P, SUNDBERG J, LICHTIGER B, NORFLEET F, CHAN KW, CHAMPLIN R, KÖRBLING M. Clinical toxicity and laboratory effects of granulocyte-colony-stimulating factor (filgrastim) mobilization and blood stem cell apheresis from normal donors, and analysis of charges for the procedures. *Transfusion*, v.36, p.590-595, 1996.
 34. STRONCEK DF, CLAY ME, PETZOLDT ML, SMITH J, JASZCZ W, OLDHAM FB, MCCULLOUGH J. Treatment of normal individuals with granulocyte-colony-stimulating factor: donor experiences and the effects on peripheral blood CD34+ cell counts and on the collection of peripheral blood stem cells. *Transfusion*, v.36, p.601-10, 1996.
 35. STRONCEK, D.; MCCULLOUGH, J. Policies and procedures for the establishment of an allogeneic blood stem cell collection programme. *Transfus Med*, v.7, p.77-87, 1997.
 36. ADLER BK, SALZMAN DE, CARABASI MH, VAUGHAN WP, REDDY VV, PRCHAL JT. Fatal sickle cell crisis after granulocyte colony-stimulating factor administration. *Blood*, v.97, p.3313-4, 2001.
 37. FALZETTI F, AVERSA F, MINELLI O, TABILIO A. Spontaneous rupture of spleen during peripheral blood stem-cell mobilisation in a healthy donor. *Lancet*, v.353, p.555, 1999.
 38. WAGNER JE, KERNAN NA, STEINBUCH M, BROXMEYER HE, GLUCKMAN E. Allogeneic sibling umbilical-cord-blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease. *Lancet*, v.346, p.214-9, 1995.
 39. COHEN, Y.; NAGLER, A. Umbilical cord blood transplantation – how, when and for whom? *Blood Reviews*, v.18, p.167-179, 2004.
 40. SMITH, F O.; THOMSON, B G. Umbilical cord blood collection, banking, and transplantation: current status and issues relevant to perinatal caregivers. *Birth*, v.27, p.127-35, 2000.
 41. AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS COMMITTEE OPINION. Routine storage of umbilical cord blood for potential future transplantation. *Int J Gynaecol Obstet*, v.58, p.257-9, 1997.
 42. AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS WORK GROUP ON CORD BLOOD BANKING. Cord blood banking for potential future transplantation: subject review. *Pediatrics*, v.104, p.116-8, 1999.
 43. BRASILCORD. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=124. Acesso em: 05 de julho 2006.
 44. MCCULLOUGH, J.; CLAY, M. Reasons for deferral of potential umbilical cord blood donors. *Transfusion*, v.40, p.124-5, 2000.
 45. KOMANDURI KV, COURIEL D, CHAMPLIN RE. Graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation: evolving concepts and novel therapies including photopheresis. *Biol Blood Marrow transplant*, v.12, p.1-6, 2006.
 46. COUBAN S, SIMPSON DR, BARNETT MJ, BREDESON C, HUBESCH L, HOWSON-JAN K, SHORE TB, WALKER IR, BROWETT P, MESSNER HA, PANZARELLA T, LIPTON JH; CANADIAN BONE MARROW TRANSPLANT GROUP. A randomized multicenter comparison of bone marrow and peripheral blood recipients of matched sibling allogeneic transplants for myeloid malignancies. *Blood*, v.100 p.1525-1531, 2002.
 47. BENSINGER WI, MARTIN PJ, STORER B, CLIFT R, FORMAN SJ, NEGRIN R, KASHYAP A, FLOWERS ME, LILLEBY K, CHAUNCEY TR, STORB R, APPELBAUM FR. Transplantation of bone marrow as compared with peripheral blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers. *N Engl J Med*, v.344, p. 175-181, 2001.
 48. SCHMITZ N, BEKSAC M, HASENCLEVER D, BACIGALUPO A, RUUTU T, NAGLER A, GLUCKMAN E, RUSSELL N, APPERLEY JF, GORIN NC, SZER J, BRADSTOCK K, BUZYN A, CLARK P, BORKETT K, GRATWOHL A; EUROPEAN GROUP FOR BLOOD AND MARROW TRANSPLANTATION. Transplantation of mobilized peripheral blood cells to HLA-identical siblings with standard-risk leukemia. *Blood*, v.100, p.761-767, 2002.
 49. ELMAAGACLI, A.; BEELEN, D.; OPALKA, B. The risk of residual molecular and cytogenetic disease in patients with Philadelphia chromosome positive first chronic phase chronic myelogenous leukemia is reduced after transplantation of allogeneic blood stem cells compared with bone marrow. *Blood*, v.94, p.384-389, 1999.
 50. CHAMPLIN, R.; SCHMITZ, N.; HOROWITZ, M. Blood stem cells compared with bone marrow as a source of haemopoietic cells for allogeneic transplantation. IBMTR Histocompatibility and Stem Cell Sources Working Committee and the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Blood*, v.95, p.3702-3709, 2000.
 51. EAPEN M, HOROWITZ MM, KLEIN JP, CHAMPLIN RE, LOBERIZA FR JR, RINGDÉN O, WAGNER JE. Higher mortality after allogeneic peripheral-blood transplantation compared with bone marrow in children and adolescents: the Histocompatibility and Alternate Stem Cell Source Working Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry. *J Clin Oncol*, v. 22, p.4872-4880, 2004.
 52. ROCHA V, GLUCKMAN E; EUROCORD AND EUROPEAN BLOOD AND MARROW TRANSPLANT GROUP. Clinical use of umbilical cord blood hematopoietic stem cells. *Biol Blood Marrow Transplant*, v.12, p.34-41, 2006.
 53. LOCATELLI F, ROCHA V, CHASTANG C, ARCESE W, MICHEL G, ABECASIS M, MESSINA C, ORTEGA J, BADELL-SERRA I, PLOUVIER E, SOUILLET G, JOUET JP, PASQUINI R, FERREIRA E, GARNIER F, GLUCKMAN E. Factors associated with outcome after cord blood transplantation in children with acute leukemia. Eurocord-Cord Blood Transplant Group. *Blood*, v.93, p.3662-71, 1999.
 54. RUBINSTEIN P, CARRIER C, SCARADAVOU A, KURTZBERG J, ADAMSON J, MIGLIACCIO AR, BERKOWITZ RL, CABBAD M, DOBRILA NL, TAYLOR PE, ROSENFELD RE, STEVENS CE Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med*, v. 339, p.1565-77, 1998.
 55. DAVEY S, ARMITAGE S, ROCHA V, GARNIER F, BROWN J, BROWN CJ, WARWICK R, FEHILY D, WATT S, GLUCKMAN E, VORA A, CONTRERAS M, NAVARRETE CV The London Cord Blood Bank: analysis of banking and transplantation outcome. *Br J Haematol*, v.125, p. 358-365, 2004.
 56. STYCZYNSKI J, CHEUNG YK, GARVIN J, SAVAGE DG, BILLOTE GB, HARRISON L, SKERRETT D, WOLOWNIK K, WISCHHOVER C, HAWKS R, BRADLEY MB, DEL TORO G, GEORGE D, YAMASHIRO D, VAN DE VEN C, CAIRO MS. Outcomes of unrelated cord blood transplantation in pediatric recipients. *Bone Marrow Transplant*, v.34, p.129-136, 2004.
 57. BARKER JN, WEISDORF DJ, DEFOR TE, BLAZAR BR, MCGLAVE PB, MILLER JS, VERFAILLIE CM, WAGNER JE. Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood*, v.105, p.1343-1347, 2005.
 58. BROXMEYER HE, SROUR EF, HANGOC G, COOPER S, ANDERSON SA, BODINE DM. High efficiency recovery of hematopoietic progenitor cells with extensive proliferative and ex-vivo expansion activity and of hematopoietic stem cells with NOD/SCID mouse repopulation ability from human cord blood stored frozen for 15 years. *Proc Natl Acad Sci*, v.100, p.645-650, 2003.
 59. COHEN, S.B. Blood money. *Biologist (London)*, v.47, p.280, 2000.
 60. GRATWOHL, A. Bone marrow transplantation activity in Europe 1990. European Group for Bone Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant*, v.8, p.197-201, 1991.
 61. GRATWOHL A, BALDOMERO H, PASSWEG J, FRASSONI F, NIEDERWIESER D, SCHMITZ N, URBANO-ISPIZUA A; ACCREDITATION COMMITTEE OF THE EUROPEAN GROUP FOR BLOOD AND MARROW TRANSPLANTATION (EBMT); WORKING PARTIES ACUTE (ALWP) CHRONIC LEUKEMIAS (CLWP); LYMPHOMA WORKING PARTY. Hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies in Europe. *Leukemia*, v.17, p.941-959, 2003.
 62. LOBERIZA, F. Report on the state of art in blood and marrow transplantation. IBMTR/ABMTR Newsletter, v.10, p.7-10, 2003.
 63. REDOME. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=677. Acesso em: 10 de Julho de 2006.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Luci Maria Sant'Ana Dusse
 Faculdade de Farmácia / UFMG
 Av. Antonio Carlos, 6627 Campus UFMG Bloco 3 – Sala 4104
 Fone: 31 3499-6900/ 6880 FAX:313499-6985
 E-mail:lucim@farmacia.ufmg.br

Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus**

Evaluation of the antimicrobial activity and biological effect by riparins about elimination the resistance of drugs in samples of *Staphylococcus aureus*

Raïssa M. R. Catão^{1*}, José Maria Barbosa-Filho², Edeltrudes de Oliveira Lima³, Maria do Socorro Vieira Pereira⁴, Maria Angélica Ramos da Silva⁴, Thúlio Antunes de Arruda¹ & Rossana Miranda Pessoa Antunes¹

RESUMO - Linhagens de *Staphylococcus aureus* (319U e 122U) de origem bovina, com padrões de resistência plasmidial a drogas previamente conhecidos foram submetidas ao tratamento com três riparinas constituintes de *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauraceae), planta típica da região amazônica com atividade antimicrobiana comprovada contra *S. aureus*. O objetivo foi avaliar o efeito dessas substâncias sobre a curva de morte bacteriana e sua influência sobre a eliminação de plasmídeos de resistência a drogas. Os estudos foram realizados com os éteres metílicos de *N*-benzoiltiramina (riparina I), *N*-(2-hidroxibenzoil)-tiramina (riparina II) e *N*-(2,6-dihidroxibenzoil)-tiramina (riparina III), obtidos da *A. riparia*. A riparina III apresentou atividade curagênica, eliminando marca de resistência para penicilina na linhagem 319U numa frequência de 61,7%. Nessa linhagem, também, foi evidenciada a perda da capacidade de expressar a enzima coagulase. A atividade antiplasmidial e a capacidade de modificar a expressão de fatores de virulência da riparina III mostram a importância desse estudo como contribuição para prevenção de linhagens de *S. aureus* multirresistentes, podendo aumentar a sensibilidade dessas linhagens a outros agentes antimicrobianos.

PALAVRAS-CHAVE - Atividade antimicrobiana, *Aniba riparia*, Riparinas, Cura de plasmídeos, *Staphylococcus aureus*.

SUMMARY - Lineages of bovine origin the *Staphylococcus aureus* (319U and 122U), with standards of plasmidial resistance the drugs previously known had been submitted to the treatment with three constituent riparins of *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauraceae), typical plant of the Amazon region with proven antimicrobial activity against *S. aureus*. The objective was to evaluate the effect of these substances on the curve of bacterial death and its influence on the resistance elimination plasmids the drugs. The studies had been carried through with methylic ethers of *N*-benzoiltiramina (riparin I), *N*-(2-hidroxibenzoil) - tiramina (riparin II) and *N*-(2,6-dihidroxibenzoil) - tiramina (riparin III), gotten it would of the *A. riparia*. Riparin III presented curagenic activity, eliminating mark of resistance for penicillin in the lineage 319U in a 61,7% frequency. In this strain, also coagulase was evidenced the loss of the capacity to express the enzyme. The antiplasmidial activity and the capacity to modify the expression of factors of virulence of riparin III show the importance of this study as contribution for prevention of ancestries of multiresistant *S. aureus*, being able to increase the sensitivity of these lineages to other agent antimicrobials.

KEYWORDS - Antimicrobial activity, *Aniba riparia*, Riparins, Cure of plasmids, *Staphylococcus aureus*.

INTRODUÇÃO

A família Lauraceae é considerada uma das mais primitivas famílias, onde os primeiros registros datam de 2.800 a.C. sendo originária da Grécia antiga, destacando-se das demais famílias pela sua importância econômica, tendo algumas espécies utilizadas na medicina popular e por indústrias de perfumaria e química^[26].

A natureza tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas até o momento e o reino vegetal ocupa lugar de destaque, devido à possibilidade de utilização diversificada tanto para fins alimentícios quanto para fins medicamentosos. Durante milhões de anos, os organismos que constituem o reino vegetal sofreram modificações para melhor adaptarem-se ao meio ambiente. Esses processos, anátomo-fisiológicos deu-lhes a capacidade da síntese do próprio alimento e foi chamado de metabolismo de ordem primária, que inclui os lipídeos, proteínas e carboidratos com funções vitais bem definidas^[21,58].

As principais classes de compostos antimicrobianos de origem vegetal são metabólitos secundários, tais como, fenóis, terpenos, alcalóides, lecitinas, polipeptídeos e poliactenos. Além dessas classes, outras substâncias de origem

vegetal mostram certa atividade antimicrobiana, como: poliaminas, isotiocianatos, tiosulfatos e glucosídeos^[36].

Atualmente em todo o mundo, são aproveitados os recursos naturais com bons resultados. Sob esse aspecto, a flora se torna o campo para a investigação de soluções satisfatórias e criativas, além de originar diversas pesquisas sobre produtos de origem natural. Na literatura científica emergem a todo o momento, trabalhos cujo objeto de estudo é o manejo dos agentes microbianos através de extratos vegetais^[20]. Aproximadamente 80% da população dos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento são quase completamente dependentes da medicina caseira utilizando plantas para suas necessidades primárias de saúde^[9,14]. O uso de plantas medicinais para o tratamento de muitas doenças está associado à medicina popular em várias partes do mundo^[3].

O Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal no mundo, apresentando mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 a 550.000 espécies, das quais, muitas são endêmicas de uma região e ainda não foram avaliadas sob o ponto de vista fitoquímico e farmacológico^[52] o que significa que grande parte de compostos bioativos ainda não foi descoberta. Segundo Barbosa-Filho^[9], a quimiodiversidade e potencialidade far-

Recebido em 14/02/2008

Aprovado em 03/12/2009

*Laboratório de Microbiologia do Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campus Universitário, 58109-753, Campina Grande, Paraíba, Brasil.

¹Departamento de Farmácia, UEPB, Campus Universitário, Campina Grande, Paraíba, Brasil;

²Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, UFPB, João Pessoa, Paraíba, Brasil;

³Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFPB, João Pessoa, Paraíba, Brasil;

⁴Laboratório de Genética de Microrganismos, UFPB, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

macológica da flora brasileira são imensuráveis e permite o estudo de plantas nativas de cada região bem como o estudo de plantas exóticas na Paraíba como é o caso da *Aniba riparia* (Ness) Mez, (Lauraceae), árvore típica da região amazônica, da qual pode-se obter um extrato dos frutos e dos cálices persistentes que possui atividade antibiótica comprovada contra *Candida albicans*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* (26). Do ponto de vista fitoquímico, a *Aniba riparia* (Nees) Mez, fornece uma classe especial de alcalóides contendo uma função alcalamida, restrito a poucos representantes na natureza (7). Após a elucidação estrutural de um dos seus compostos o *O*-metil-*N*-(2-hidroxibenzoil) tiramina verificou-se que, biogeneticamente, esta molécula era resultado da condensação de duas substâncias: o éter metílico da tiramina (agente simpaticomimético) e o ácido salicílico (agente queratolítico e antimicótico); despertando a partir daí, a curiosidade para se verificar a potencialidade farmacológica deste produto natural, de modo que este e outros análogos foram sintetizados no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) da Universidade Federal da Paraíba, das quais, três são de ocorrência natural e foram isoladas pela primeira vez da *Aniba riparia* (Nees) Mez. (Lauraceae), sendo chamadas de riparinas (I, II e III), denominação esta em referência à planta (9). Esses produtos foram submetidos a ensaios farmacológicos, observando-se que o composto mais ativo da série sintética foi o *O*-metil-*N*-(2,6-dihidroxibenzoil) tiramina (riparina III) que apresenta efeito antidepressivo (53) e ansiolítico (52) quando administrado intraperitonealmente em ratos. Entre outras atividades farmacológicas estudadas, foi demonstrado que as riparinas são capazes de induzir vários efeitos, dentre eles: espasmolítico em fêlo isolado de cobaia e em útero isolado de rata (15, 55), hipotensor e bradicárdico transitório, a nível cardíaco (48), antiansiolítico (54) e relaxante muscular (29).

A síntese de novas substâncias, com atividade farmacológica é sem dúvida, um grande avanço tecnológico. Entretanto o estudo químico e farmacológico dos produtos naturais ainda continua sendo um grande desafio, sendo o maior deles, o interesse pela transformação das plantas medicinais em substâncias medicamentosas. O desenvolvimento de qualquer novo antimicrobiano vem sendo acompanhado de resistência bacteriana e a emergência de patógenos resistentes aos antimicrobianos é uma ameaça a esses avanços (33).

O aparecimento de resistência resulta em diversos fatores, dentre eles, é relevante ressaltar, o uso crescente e inadequado de antimicrobianos, os procedimentos invasivos, o grande número de hospedeiros susceptíveis e falhas terapêuticas ocasionando aumento da transmissão de organismos multirresistentes (43). Atualmente muitas cepas são resistentes a quase todos antimicrobianos e a perspectiva de aparecimento de uma cepa resistente a todos os antimicrobianos, constitui uma séria preocupação (47), de modo que a necessidade de encontrar novas substâncias com propriedades antimicrobianas para serem estudadas no combate a esses microrganismos, representa um desafio no tratamento de infecções (42).

Dentre os agentes etiológicos de processos infecciosos, *Staphylococcus aureus* é considerado como um dos mais importantes, visto que abrange desde lesões superficiais até severas infecções sistêmicas, no homem e em outros animais (40, 56). É considerada a espécie mais virulenta do gênero *Staphylococcus* apresentando inúmeros fatores que contribuem para esse fator, tais como toxinas, enzimas e proteínas associadas à parede celular, mediados por genes plas-

midiais ou cromossomiais, que combinados conduzem a invasão tecidual e a sobrevivência no sítio infeccioso (11, 25), além da grande resistência aos mais diversos antimicrobianos (45). *S. aureus* pode ainda apresentar resistência a íons metálicos (cádmio, mercúrio, arsenato) e a biocinas (acriflavina, cloreto de benzalcônio e ceftrimida). A seleção e manutenção dessas marcas de resistência se explicam pela presença desses agentes, como poluentes urbanos ou industriais (40, 44). O objetivo deste trabalho foi avaliar comparativamente a atividade antimicrobiana *in vitro* dos substratos sintéticos riparina I, II e III, inicialmente obtidos da *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauraceae) determinando a concentração bactericida mínima (CIM), a influência da ação dessas substâncias sobre a curva de morte bacteriana e a eliminação de resistência a drogas, mediada por plasmídeos em linhagens de *S. aureus* previamente selecionadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras bacterianas - As linhagens de *S. aureus* (319U e 122U) utilizadas nesse estudo foram isoladas de bovinos em fase de lactação e foram cedidas pelo Laboratório de Genética de Microrganismos da Universidade Federal da Paraíba, e caracterizadas fenotipicamente em sensíveis a metilicina e resistentes a penicilina. Essas linhagens foram selecionadas por apresentam plasmídeos de resistência a antimicrobianos e íons cádmio, demonstrados por brometo de etídio e confirmadas por eletroforese em gel de agarose (41). **Preparo das riparinas** - As riparinas I, II e III, foram obtidas por síntese orgânica, segundo a metodologia estabelecida no LTF/UFPB (7, 8).

As Figuras 1, 2 e 3, representam respectivamente o esquema utilizado para a obtenção das riparinas utilizadas nesse experimento.

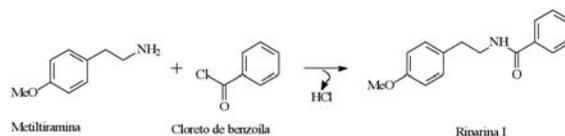


Figura 1 – Reação geral para síntese de riparina I - Acoplamento do éster metílico da tiramina com o cloreto de benzoila

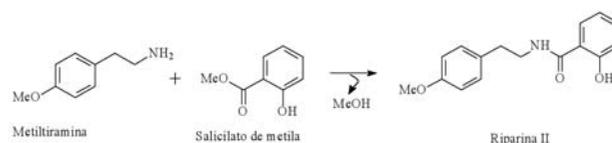


Figura 2 – Reação geral para síntese de riparina II - Acoplamento de éster metílico da tiramina com o salicilato de metila

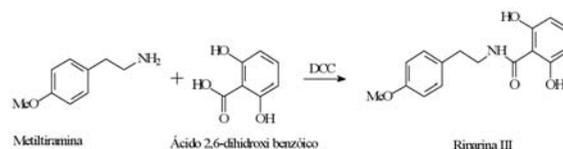


Figura 3 – Reação geral para síntese de riparina III - Acoplamento de éster metílico da tiramina com os ácidos 2,6 dihidroxibenzoico

Preparo da suspensão bacteriana - O inóculo bacteriano, foi previamente padronizado pelo padrão 0,5 da Escala de McFarland, contendo aproximadamente 5×10^6 UFC/mL (10, 35).

Atividade antimicrobiana - Os ensaios para verificar a presença de atividade antimicrobiana das riparina I, II e III

frente às linhagens selecionadas, foram efetuados em triplicata pelo método de difusão em meio sólido, processo cavidade-placa^(10, 19, 40) usando soluções aquosas desses produtos na concentração 400 µg/mL.

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) - A CIM das riparinas foi determinada simultaneamente pelos métodos de difusão em meio sólido (processo cavidade-placa) e por microdiluição em placa. Para o método de difusão em meio sólido, foram utilizadas placas de Petri (90 x 15 mm) descartáveis, estéreis, contendo 20 mL do meio de cultura Agar Müeller-Hinton, e foram inoculadas pela técnica de espalhamento em superfície^(18, 22, 35) com auxílio de swabs estéreis mergulhados na suspensão contendo o inóculo bacteriano, eliminando-se o excesso de líquido por pressão nas paredes do tubo. O inóculo foi semeado sobre toda a superfície do ágar, de modo a se obter um crescimento uniforme e semi-confluente. As placas foram colocadas para secar, durante 3 a 5 minutos realizando-se em seguida, as perfurações das cavidades (6 mm de diâmetro), com o auxílio de perfuradores descartáveis estéreis. Em cada cavidade, foi adicionado 50 µL da solução de riparina em diferentes concentrações (400 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL), para verificação da CIM através do decréscimo do tamanho dos halos de inibição de crescimento. Essas soluções foram previamente solubilizadas com dimetil-sulfóxido (DMSO a 2%). Como controle, foi utilizado em uma das cavidades, 50 µL da solução de DMSO a 2%, usada como solvente, para verificação de alguma possível interferência na atividade antimicrobiana das riparinas. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas. Após este período de incubação os resultados foram notificados, considerando-se com atividade aqueles produtos que inibiram o crescimento microbiano, produzindo halos de inibição igual ou superior a 8 mm de diâmetro^(34, 46, 57). Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado final foi determinado pela média aritmética dos halos de inibição.

Para o método de microdiluição em placa, foram utilizadas microplacas estéreis de 96 cavidades de fundo chato e tampa (Cralplast Ltda.) nas quais foram distribuídos assepticamente, 100 µL de caldo Mueller-Hinton (Difco). Na cavidade de linha A da placa, adicionou-se 100 µL da solução de riparina em dupla concentração (400 µg/mL) e em seguida realizaram-se as diluições seriadas transferindo-se 100 µL da linha A até a linha G da placa. A linha H foi deixada sem riparina e serviu como controle positivo do crescimento bacteriano. Após as diluições, adicionou-se em cada cavidade, 10 µL do inóculo bacteriano. As placas foram tampadas e incubadas a 37 °C por 24 horas. Após esse período, adicionou-se em cada cavidade, 20 µL da solução aquosa de resazurina (Sigma-Aldrich) a 0,01%, como indicador colorimétrico de oxidação-redução para caracterizar a viabilidade celular⁽²⁴⁾. As placas foram mantidas a temperatura ambiente por duas horas e lidas após esse tempo. A leitura realizada de forma visual foi observada pela mudança da cor azul (original da resazurina) para rosa, caracterizando redução desse corante nas cavidades onde havia viabilidade bacteriana; em contrapartida, nas cavidades onde a cor permaneceu azul, não houve redução do corante, indicando inviabilidade bacteriana; podendo-se desta forma determinar a CIM, ou seja, a menor concentração de um produto capaz de inibir o crescimento microbiano^(2, 6, 13, 30).

Curva de morte - Para esse teste foi padronizado o inóculo bacteriano contendo aproximadamente 10⁶ CFU/mL, em caldo Mueller-Hinton (Difco). As concentrações de riparinas usadas foram relacionadas ao valor de suas CIMs (200 µg/mL), e a perda da viabilidade celular foi observada através da redução

do número de UFC/mL após semeio em diferentes intervalos de tempos de incubação, por até 48 horas a 37 °C.

Cura de plasmídeos - As cepas foram cultivadas em caldo Brain Heart Infusion - BHI (Difco), a 37 °C por 24 horas e diluídas 100 vezes no mesmo meio adicionado da concentração subinibitória (1/2 x CIM = 50 µg/mL) de cada riparina ensaiada. Após a incubação a 37 °C/24h, sob agitação, as culturas foram convenientemente diluídas em solução salina estéril (NaCl 0,85%) e alíquotas de 0,1mL, semeadas em Blood Agar Base - BAB (Difco) para determinação do título (UFL/mL). A perda de resistência às drogas foi determinada por réplica (28) em BAB acrescido de cada droga (penicilina e eritromicina) em estudo numa concentração que permitia o desenvolvimento de colônias resistentes. A frequência da eliminação foi calculada como a porcentagem de colônias sensíveis as drogas sobre o total de colônias ensaiadas (no mínimo, 200 colônias ensaiadas em cada experimento). As variantes sensíveis aos antibióticos testados foram selecionadas e a CIM determinada por E-test de acordo com as recomendações do fabricante.

A linhagem ATCC 25923 foi utilizada como controle de referência⁽³⁵⁾. Experimentos controles para a determinação de eliminação espontânea de plasmídeos foram realizados simultaneamente, seguindo o mesmo procedimento: as cepas foram cultivadas em caldo BHI (Difco), a 37 °C por 24 horas e diluídas 100 vezes no mesmo meio, na ausência da cada uma das riparinas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 apresenta a atividade antimicrobiana e a determinação da CIM das riparinas I, II e III frente às linhagens de *S. aureus* selecionadas. As riparinas I e II apresentaram semelhantes halos de inibição de crescimento de 9 mm apenas para a linhagem ATCC 25923, apenas na concentração inicial de 400µg/mL, enquanto que nessa mesma concentração, a riparina III apresentou halos de inibição de crescimento de 11mm, 15mm e 19mm de diâmetro, respectivamente para as linhagens 122U, 319U e ATCC 25923. Estes resultados estão em concordância com relatos anteriores⁽¹⁷⁾, onde comprovaram que as riparinas apresentaram níveis diferentes de atividade antimicrobiana sobre amostras de *S. aureus* multirresistentes de origem humana e observaram que a riparina III apresentou-se como a mais ativa do grupo. A CIM da riparina III foi de 200µg/mL para as linhagens 122U e 319U e de 100µg/mL para a cepa ATCC.

TABELA I
Determinação da atividade antimicrobiana e da CIM *in vitro* de riparinas frente linhagens de *Staphylococcus aureus*

Riparinas [µg/mL]	<i>Staphylococcus aureus</i>		
	ATCC 25923	122U	319U
I	400	9	0
	200	0	0
	100	0	0
	50	0	0
II	400	9	0
	200	0	0
	100	0	0
	50	0	0
III	400	19	11
	200	18	10
	100	10	0
	50	0	0

Legenda: 0 = Ausência de halo.

A Figura 4 apresenta o comportamento das riparinas I, II e III frente à cepa ATCC 25923, apresentando halos de inibição de crescimento que variaram de 10 a 19 mm para a riparina III, e de 9 mm para as riparina I e II, em função das diferentes concentrações utilizadas, 400 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL e 50 µg/mL.

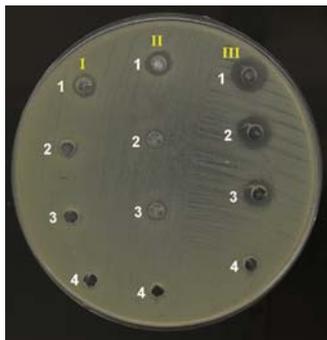


Figura 4. Perfil de suscetibilidade por difusão em meio sólido, da cepa de *S. aureus* ATCC 25923 frente às riparinas I, II e III nas concentrações de 400(1), 200(2), 100(3) e 50(4) µg/mL

A tabela 2 apresenta o comportamento das linhagens 319U e 122U antes e após tratamento pelas riparinas, observando-se que as riparinas I e II não foram capazes de eliminar a marca de resistência para nenhum dos antimicrobianos testados (penicilina e eritromicina) nas linhagens em estudo. A riparina III apresentou essa atividade frente à linhagem 319U, interferindo na significativamente apenas na MIC da penicilina que passou de 16 µg/mL (resistente) para 0,064 µg/mL (sensível). A confirmação da eliminação do plasmídeo de resistência a penicilina, foi realizada semeando-se as variantes sensíveis em placas de BAB-penicilina e determinando-se a CIM pelo E-test. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados das CIMs representam a média aritmética dos valores encontrados.

TABELA II
Comportamento das linhagens de *Staphylococcus aureus* antes e após exposição às riparinas

Linhagens	Marca de resistência	CIM (µg/mL)	CIM* (µg/mL)			Resistência** (µg/mL)
			Riparinas (200µg/mL)			
			I	II	III	
319U	Pen	16	16	16	0,064	≥ 0,25
	Eri	8	8	8	8	≥ 8
122U	Pen	128	128	128	128	≥ 0,25
	Eri	16	16	16	16	≥ 8

Legenda: Pen = Penicilina; Eri = Eritromicina * CIM Após tratamento por riparinas; ** Referência = NCCLS, 2004.

A tabela 3 apresenta a freqüência de eliminação da marca de resistência à penicilina (cura de plasmídeos penicilina-se) pelas riparinas. As riparinas I e II não apresentaram atividade curagênica para nenhuma das linhagens estudadas enquanto que a riparina III mostrou ser a mais eficiente benzilamida do grupo, eliminando essa marca de resistência na amostra 319U numa freqüência de 61,7%. Essa freqüência é superior à encontrada em outros produtos tidos como padrão curagênico como é o caso do brometo de etidio, rifampicina e novobiocina⁽⁴¹⁾. Variações entre os percentuais de freqüência de cura podem ser encontradas em substâncias de um mesmo grupo farmacológico. De modo que esses resultados estão em concordância com outros relatos⁽⁴¹⁾ que encontraram diferentes percentuais quando avaliaram a capacidade das fluorquinolonas em eliminar marca de resistência para penicilina em linhagens de *S. aureus*, detectando uma freqüência de cura de 0,88%

e 0,49% respectivamente, para ciprofloxacina e norfloxacina na linhagem 319U.

A variação do efeito das riparinas na eliminação da marca de resistência à penicilina, mostra a importância desse estudo na busca de agentes antimicrobianos envolvidos na eliminação de plasmídeos de resistência a drogas. Entretanto é importante ressaltar que a flutuação na eliminação de plasmídeos pode refletir uma peculiaridade da linhagem em estudo⁽²⁷⁾.

TABELA III
Freqüência da eliminação da marca de resistência à penicilina por riparinas em linhagens de *Staphylococcus aureus*

Riparinas [100µg/mL]	nº de colônias ensaiadas / nº de variantes sensíveis		Freqüência de cura (%)	
	319U	122U	319U	122U
I	520/0	218/0	0,00	0,00
II	491/0	293/0	0,00	0,00
III	311/192	392/0	61,7	0,00

Esses resultados indicam que a riparina III em concentração sub-inibitória, apresenta potencialidade sobre cura de plasmídeo penicilina-se, através da sua atividade antiplasmidial, sendo capaz de causar reversão do fenótipo de resistência à penicilina, o que pode aumentar a sensibilidade de linhagens de *S. aureus* a outros agentes antimicrobianos. Este fenômeno poderia ser explicado pela inibição do transportador multidrogas de *S. aureus*, que promove a extrusão ativa dos antibióticos das células resistentes. Isto representaria, no futuro, uma alternativa no tratamento de infecções causadas por *S. aureus*.

As Figuras 5 e 6 mostram respectivamente o efeito das riparinas I, II e III sobre as curvas de morte nas linhagens 319U e 122U após exposição por diferentes intervalos de tempo a 37 °C.

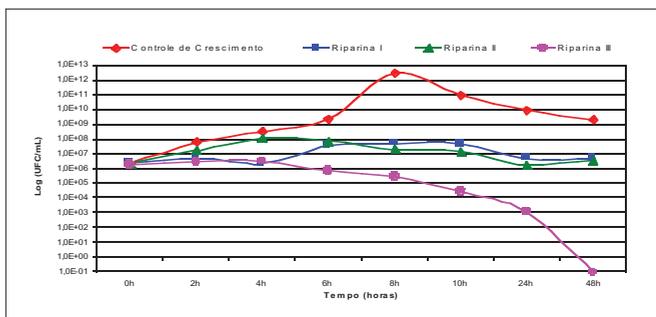


Figura 5. Cinética bacteriana da cepa de *S. aureus* 319U frente às riparinas

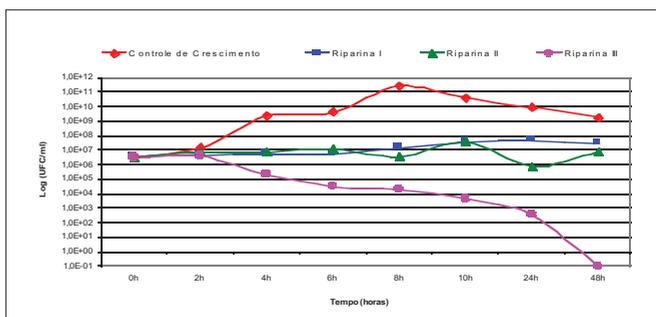


Figura 5. Cinética bacteriana da cepa de *S. aureus* 319U frente às riparinas

Os resultados apresentados são bastante significativos, visto que a atividade bactericida da CIM da riparina III sobre as cepas de *S. aureus* ensaiadas, iniciou-se após 8h e 10h de incubação, quando se observou redução de 2 log 10 UFC/mL do inóculo inicial, atingindo a redução de 4 log 10 UFC/mL em 24h, respectivamente para a linhagem 122U e 3 log 10 UFC/mL para a linhagem 319U. As riparinas I e II mantiveram o inóculo bacteriano sempre próximo ao valor do inóculo inicial, mostrando graus menores de interferência na morte celular. As riparinas I e II impediram a multiplicação celular, apresentando efeito bacteriostático sobre as linhagens de *S. aureus* estudadas. Porém o modo como atuam ainda precisa ser esclarecido.

O efeito bactericida pode ser observado pela diminuição de 3 log 10 UFC/mL ou 99% de morte celular, à partir do inóculo inicial, sobre um tempo determinado^(31, 49). Entretanto, Jones *et al.*⁽²³⁾ consideram significativamente satisfatória, a cinética bactericida de um produto, quando este é capaz de reduzir o inóculo inicial, para valores iguais ou superiores a 2 log 10 UFC/mL em um tempo menor ou igual a 24 horas de incubação e consideram graus menores de morte celular como efeito bacteriostático.

Diante do problema da resistência aos antimicrobianos, várias pesquisas sobre a cinética bacteriana têm sido realizadas buscando-se novos produtos que apresentem eficácia sobre os microrganismos. De modo que a riparina III assim como diversos outros produtos naturais tais como, própolis⁽¹⁾, extratos de *Punica granatum* Linn. (romã)^(16, 38, 50), *Anacardium occidentale* Linn. (cajuzeiro)⁽⁵¹⁾, *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (jurema-preta)⁽³⁷⁾, *Ocotea duckei*⁽⁴⁾ e óleos essenciais de *Mentha x villosa*⁽⁵⁾, *S. terebinthifolius*, *P. bahiana* e *P. bahianus*⁽³⁹⁾, que apresentam atividade bactericida sobre *S. aureus*, podem se tornar possíveis campos de desenvolvimento de novas estratégias no tratamento de infecções promovidas por microrganismos oportunistas, emergentes ou re-emergentes, incluindo amostras multirresistentes⁽¹²⁾.

A relevância dessa pesquisa está na possibilidade de aprofundar os estudos utilizando produtos naturais e/ou sintéticos bioativos para prevenção de linhagens multirresistentes, considerando que os efeitos biológicos *in vitro* das riparinas I, II e III, sugerem que mais pesquisas sejam realizadas. Dentre elas, a determinação de sinergismo e/ou antagonismo entre agentes antimicrobianos, visando conhecer o mecanismo de ação dessas substâncias, bem como o(s) mecanismo(s) de resistência; e determinação de sua potencialidade terapêutica através de estudos *in vivo*, visando encontrar métodos alternativos de controle de patógenos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Dra. Maria do Socorro Vieira Pereira que gentilmente forneceu as linhagens bacterianas para a realização desse estudo e a CAPES/PQI pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. ADELMANN, J. Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana / antioxidante. 2005. 186p. (Dissertação Mestrado) - Universidade Federal do Paraná - Curitiba.
2. ALVES, A. J.. Atividade biológica de óleos essenciais e fitoconstituintes sobre espécies de *Mycobacterium*. 2006. 143p. (Tese de Doutorado). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
3. ARAÚJO, C. A. C.; LEON, L.L. Biological activities of *Curcuma longa* L.

Memórias do Inst.Oswaldo Cruz, 96:723-728, 2001.

4. ANTUNES, R. P. M.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; CAMARA, C. A.; ARRUDA, T. A.; CATÃO, R. M. R.; BARBOSA, T. P.; NUNES, X. P.; DIAS, C. S.; SILVA, T. M. S. Atividade antimicrobiana "in vitro" e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. *Braz. J. Pharmacogn.*, 16 (4):517-524, 2006.
5. ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. P. M.; CATÃO, R. M. R.; ANTUNES, R. P. M. SOUSA, D. P.; NUNES, X. P.; PEREIRA, M. S. V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CUNHA, E. V. L. Preliminary study of antimicrobial activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues. *Braz. J. Pharmacogn.*, 16 (3):307-311, 2006.
6. BANFI, E.; SCIALINO, G.; MONTE-BRAGADIN. Development of a microdilution method to evaluate *Mycobacterium tuberculosis* drugs susceptibility. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52 (5):796-800, 2003.
7. BARBOSA-FILHO, J. M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R.; BARBOSA, R. C. S. B. C.; GIESBRECHT, A. M.; YONG, M. C. M.. Benzoyl esters and amides, stryrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. *Phytochemistry*, 26 (9): 2615-2617, 1987.
8. BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, E. C.; BHATTACHARYYA, J. Synthesis of several new phenylethylamides of substituted benzoic acids. *Química Nova*, 13 (4):332-334, 1990.
9. BARBOSA-FILHO, J.M. Quimiodiversidade e potencialidade farmacológica da flora paraibana.. *Cad.Farm.*,13 (2):85-102, 1997.
10. BAUER, A. N., KIRBY, W. M. M., SHERRIS, J. C., TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J Clin Pathol.*, 5:493-496, 1966.
11. BLATT, J. M.; PIAZZA, C. E. Perfil de sensibilidade de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase negativo* isolados em pacientes internados. *RBAC*, 36 (2): 129-131, 2004.
12. BRITO, T. B. M. Análise fitoquímica e investigação da atividade antibacteriana de plantas medicinais utilizadas popularmente contra infecções. 2003. 199p. (Tese de Doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
13. BURT, S. A.; REINDERS, R. D. Antimicrobial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*, 26 (3):162-167, 2003.
14. CAETANO, N.; SARAIVA, A.; PEREIRA, R.; CARVALHO, D.; PIMENTEL, M. C. B.; MAIA, M. B. S. Determinação da atividade antimicrobiana de extratos de planta de uso popular como anti-inflamatório. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 12 (supl):132-135, 2002.
15. CASTELO-BRANCO, U. V.; CASTELO-BRANCO, U. J. V.; THOMAS, G.; ARAÚJO, C. C.; BARBOSA-FILHO, J. M. Preliminary pharmacological studies on three benzoyl amides constituents of *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauraceae). *Acta Farm. Bonaerense* 19 (3):197-202, 2000.
16. CATÃO, R. M. R.; ANTUNES, R. P. M. A.; ARRUDA, T. A.; PEREIRA, M. S. V.; HIGINO, J. S. ALVES, J. A.; PASSOS, M. G. V. M.; SANTOS, V. L. Atividade antimicrobiana "in vitro" do extrato etanólico de *Punica granatum* Linn. (romã) sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. *RBAC*, 38 (2): 111-114, 2006.
17. CATÃO, R. M. R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P. Avaliação da atividade antimicrobiana de Riparinas sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* multirresistentes. *RBAC*, 37 (4): 247-249, 2005.
18. CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUT – CLSI. Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-Difusão. Norma Aprovada - 8ª ed. M2-A8. v.23, n.1. Substitui a Norma M2-A7, v.20, n.1. 2005.
19. COURVALAIN, P.; GOLDSTEIN, F.; PHILIPPON, A.; SIROT, J. 1985. L'antibiogramme, Videom, Paris, France. Ed. MPC.
20. COUTINHO, H. D. M.; BEZERRA, D. A. C.; LÔBO, K.; BARBOSA, I. J. F. Atividade Antimicrobiana de Produtos Naturais. *Conceitos*. 78-85, 2004.
21. DI STASI, L. C. Plantas Medicinais: arte e ciência – um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Unesp, 161-186, 1966.
22. HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical*

- Analyses, Sussex, v.11, p.137-147, 2000.
23. JONES, R. N.; ANDEREGG, T. R.; DESHPANDE, L. M. AZT2563, a new oxazolidinone bactericidal activity and synergy studies combined with gentamicin or vancomycin against staphylococci and streptococcal stains. *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease*, 43 (1): 87-90, 2002.
 24. KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR. W.C. *Diagnóstico Microbiológico-Texto e atlas colorido*. 5 ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001, 30-31p.
 25. KRUSZNSKA, E.; BIALEK, M.; JANICKA et al., Susceptibility to antibiotics of *Staphylococcus aureus* strains. *Med. Dosw. Micriobiol.*, 49:141-144, 1997.
 26. MARQUES, C. A. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. *Floresta e Ambiente*, 8 (1): 195-206, 2001.
 27. LACEY R. W.; CHOPRA, I. Genetic studies of multiresistant strain of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, 7: 285-287, 1974.
 28. LEDEBERG, J.; LEDEBERG, E. M. Replic plating and indirect selection of bacterial mutants. *Journal of Bacteriology*, 63: 399 – 406, 1952.
 29. MARQUES, A. D. S.; ZHENG, C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LIN, C.T.; GUTIERREZ, S. J. C. Electronic and structural effects in muscular relaxants: Riparin I and Riparin III. *Journal of Molecular Structure*, 753: 13-21, 2005.
 30. MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, 84 (5): 538-544, 1998.
 31. MAY, J.; CHAN, C. H.; FRENCH, G. C. Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45 (5): 639-643, 2000.
 32. MELO, C. T. V.; LIMA, V. T. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; FONTELES, M. M. F.; VASCONCELOS, S. M. M.; VIANA, G. S. ; SOUSA, F. C. F. Anxiolytic-like effects of (O-methyl)-N-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29 (3): 451-454, 2006.
 33. MOELLERING, R. C. Jr. Novos desafios no campo das doenças infecciosas. In: *Patógenos Emergentes nas Doenças Infecciosas: Relatório Especial Hospital Practice*. Euromédica. Ed. Médicas: 5-7. 2000.
 34. NAQVI, S. H.; KILIAN, M. S. Y.; VOHORA, S. B. Anti-bacterial, anti-fungal and antihelmintic investigations on Indian medicinal plants. *Fitoterapia*, 62 (3): 221-228, 1991.
 35. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARD – NCCLS. 2004. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 2 ed. Tentative standart. NCCLS Document M7-T2, V. B. n. B. Villa Nova PA, National Committee for Clinical Laboratory Standart..
 36. NOGUEIRA, M. S. Ação de Produtos Naturais sobre Populações Bacterianas. 2000. 131p. (Dissertação de Mestrado em Genética) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
 37. PADILHA, I. Q. M. Atividade antimicrobiana in vitro e cinética bactericida do extrato de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (Jurema-preta) sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* multirresistentes. 2006. 74p. (Monografia) - Universidade Federal da Paraíba – João Pessoa.
 38. PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Braz. J. Pharmacogn.*, 17 (1):102-107, 2007.
 39. PASSOS, M. G. V. M. Avaliação de atividade antimicrobiana de produtos de plantas nativas do estado da Bahia. 2007. 152p. (Tese de Doutorado) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
 40. PEREIRA, M. S. V. Atividade in vitro de fluorquinolonas e ação sobre plasmídios em amostras de *Staphylococcus aureus* humanas e bovinas. 2000. 135p. (Tese de Doutorado) -Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
 41. PEREIRA, M. S. V.; SIQUEIRA Jr., J. P.; TAKAKI, G. M. C. Eliminação de resistência por fluorquinolonas em amostras de *Staphylococcus aureus* de origem bovina. *Pesq.Vet.Bras.*, 24 (1):111-114, 2004.
 42. PEREIRA, R. S.; SUMITA, T. C.; FURLAN, M. R.; JOGE, A. O. C.; UENO, M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. *Rev.Saúde Pública*, 38 (2):326-328, 2004.
 43. PETRONI, R. C. C. B; BALDASSI, L.; BIDÓIA, E. Sensibilidade de *Staphylococcus aureus* aos extratos da *Aristolochia gigantea* Mart. e Zucc. *Arq. Inst. Biol.*, 71 (supl1): 576-578, 2004.
 44. RUSSEL, A. D. Plasmids and bacterial resistance to biocides. *Journal of Applied Microbiology*, 82: 155-165, 1997.
 45. SADER, H. ; PIGNATARI, A. C.; HOLLINS, R. J.; LEME, I.; JONES, R. N. Oxacilin and quinolone resistant *Staphylococcus aureus* in São Paulo, Brazil: a multicenter molecular epidemiology study. *Infec Control Hosp Epidemiol.*, 14:260-264, 1993.
 46. SAKAR, M. K.; TAMER, A. V.; TOKOUR, S. Antimicrobial activities of some *Hypericum* species growing in Turkey. *Fitoterapia*, 59 (1):49-52, 1988.
 47. SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N. C.; EISENSTEIN, B. I.; MEDOFF, G. *Microbiologia*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002. 642p.
 48. SEIXAS, S.R.S. Preparação de derivados benzotiraminicos e sua atividade cardiopressora. 1996. 103p. (Dissertação de Mestrado) - Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa.
 49. SHELBURNE, S. A.; MUSER, D. M.; HULTEN, K.; CEASAR, H.; LU, M. Y.; BHAILA, I.; HAMILL, J. R. Community- Associated Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus* with drugs combinations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 (10):4016-4019, 2004.
 50. SILVA, J. G. Atividade antimicrobiana do extrato do cajueiro (*Anacardium occidentale* Linn.) sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* de origem humana hospitalar e de origem animal. 2004a. 42p. (Monografia) - Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa.
 51. SILVA, M. A. R. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato hidroalcoólico da romã (*Punica granatum* Linn.) e ação sobre plasmídeos em amostras de *Staphylococcus aureus* de origem bovina. 2004b. 52p. (Monografia) - Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa.
 52. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; de MELLO, J. C.P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. 2002. *Farmacologia da planta ao medicamento*. 4ed. Porto Alegre: Editora da Universidade. 2002. 893p.
 53. SOUSA, F. C. F.; MELO, C. T. V.; MONTEIRO, A. P.; LIMA, V. T. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; PEREIRA, B. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. F.; VIANA, G. S. B. Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 78 (1): 27-33 2004.
 54. SOUSA, F. C. F.; MONTEIRO, A. P.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; GUTIERREZ, S. J. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; VIANA, G. S. B. Antianxiety effects of riparin I from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. *Phytotherapy Research*, (19): 1005-1008, 2005.
 55. THOMAS, G.; CASTELO-BRANCO, U. J. V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BACHELET, M.; VARGAFTIG, B. B. Studies on the mechanism of spasmolytic activity of (O-methyl)-N-2,6-dihydroxybenzoyl)tyramine, a constituent of *Aniba riparia* (Nees) Mez. (Lauraceae), in rat uterus, rabbit aorta and guinea-pig alveolar leucocytes. *J. Pharm. Pharmacol.*, 46:103-107, 1994.
 56. TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 4 ed. São Paulo: Atheneu. 2006. 718p.
 57. WONG-LEUNG, Y. L. Antimicrobial activities of some Hong-Kong plants used in chinese medicine. *Fitoterapia*, 69 (1): 11-16, 1988.
 58. YAMADA, C. S. B. Fitoterapia: sua história e importância. *Fitoterapia - Revista Racine*, 43: 50-51, 1998.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Prof. Raissa M. R. Catão
Rua Benedito Mota, 702
CEP: 58102-520 Campina Grande - PB

Avaliação do perfil de suscetibilidade antimicrobiana de *Enterococcus* spp. isolados em dois hospitais de Porto Alegre – RS, Brasil*

Evaluation of antimicrobial susceptibility profile of *Enterococcus* spp. isolated in two hospitals of Porto Alegre – RS, Brazil

Eduardo André Bender¹; Ana Lúcia Peixoto de Freitas² & Afonso Luís Barth^{2,3}

RESUMO - O perfil de suscetibilidade antimicrobiana de 203 isolados de *Enterococcus* spp. provenientes de diferentes amostras clínicas em dois hospitais de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, foram estudadas. As espécies bacterianas foram identificadas por testes bioquímicos convencionais e pelo sistema automatizado Vitek 2. O alto nível de resistência aos aminoglicosídeos (HLAR), como também o perfil de suscetibilidade a diferentes antimicrobianos, foram avaliados pelo método de disco-difusão. Adicionalmente, foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) para estreptomicina e gentamicina pelo método de diluição em ágar. *E. faecalis* foi a espécie mais prevalente (93,6%) seguido por *E. faecium* (4,4%). A resistência aos antimicrobianos foi de 2,5% à ampicilina (10µg), 0,5% à vancomicina (30µg), 0,5% à teicoplanina (30µg), 33% ao cloranfenicol (30µg), 2% à nitrofurantoína (300µg), 62,1% à eritromicina (15µg), 64,5% à tetraciclina (30µg), 24,6% à rifampicina (5µg), 30% ao ciprofloxacino (5µg) e 87,2% à quinupristina-dalfopristina (15µg). A prevalência de HLAR no total das cepas estudadas foi de 10,3%, sendo que dentro deste universo, 23,6% para gentamicina (120µg) e 37,4% para estreptomicina (300µg). A prevalência de *Enterococcus* resistentes à vancomicina (ERV) foi muito baixa neste estudo (0,5%).

PALAVRAS-CHAVE - *Enterococcus*, suscetibilidade, aminoglicosídeos

SUMMARY - The antimicrobial susceptibility profile of 203 *Enterococcus* spp isolates recovered from different clinical sources of two hospitals in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, were studied. The species were identified by conventional biochemical tests and by automatic system Vitek 2. The high-level resistance to aminoglycosides (HLAR) and the others antimicrobial susceptibility profile were carried out by the disc-diffusion method. Additionally, the minimal inhibitory concentrations (MIC) for streptomycin and gentamicin were evaluated by agar dilution method. The *E. faecalis* was the most frequent specie (93.6%), followed by *E. faecium* (4.4%). The antimicrobial resistance was: 2.5% to ampicillin (10µg), 0.5% to vancomycin (30µg), 0.5% teicoplanin (30µg), 33% to chloramphenicol (30µg), 2% to nitrofurantoin (300µg), 62.1% to erythromycin (15µg), 64.5% to tetracycline (30µg), 24.6% to rifampicin (5µg), 30% to ciprofloxacin (5µg) and 87.2% to quinupristin-dalfopristin (15µg). A total of 10.3% proved to be HLAR, with 23.6% resistant to gentamicin (120µg) and 37.4% to streptomycin (300µg). The prevalence of vancomycin resistance *Enterococcus* (VRE) was very low in this study (0,5%).

KEYWORDS - *Enterococcus*, susceptibility, aminoglycosides

INTRODUÇÃO

Antigamente considerado como um gênero bacteriano de poucas conseqüências em doenças infecciosas, os enterococos têm emergido rapidamente como um dos principais patógenos nosocomiais e na comunidade em geral (1,2,19,28). Sua freqüência nos isolamentos de amostras clínicas tem aumentado, o que tem representado um considerável desafio aos esquemas terapêuticos utilizados em seu tratamento (9,18). Os enterococos são colonizantes normais do trato intestinal e, em menor freqüência, no trato genital feminino e uretra masculina. Merecem atenção como agentes de endocardite infecciosa, bacteremia, síndromes diarréicas em recém-nascidos, infecções do trato urinário e infecções de ferida cirúrgica (12,18,20).

A terapia antimicrobiana para as infecções causadas por enterococos torna-se difícil, uma vez que a maioria dos antibióticos não tem efeito bactericida em concentrações clinicamente relevantes. Dessa forma, as infecções enterocócicas sistêmicas, como endocardite e bacteremia, são comumente tratadas com um agente que atue na parede celular (um beta-lactâmico, como a penicilina e ampicilina, ou um glicopeptídeo, como a vancomicina e teicoplanina) associado com um aminoglicosídeo (usualmente gentamicina ou estreptomicina). Esses agentes atuam sinergicamente para promover a ação bactericida (1,26,28,30). Entretanto, a resis-

tência aos aminoglicosídeos, à ampicilina, à penicilina e à vancomicina tem se tornado um importante problema, contribuindo para a redução das opções de tratamento (4,24). O primeiro caso de enterococos resistente à vancomicina (ERV) no Brasil ocorreu em 1996 e decorre basicamente pela produção de precursores de peptideoglicano na parede celular que se ligam pobremente à vancomicina, impedindo assim sua ação no bloqueio da síntese de parede celular (15,21,23). Até o ano de 2000 não existiam relatos de ERV em hospitais de Porto Alegre, porém, em maio daquele ano, foi descrito o primeiro caso de ERV em um paciente internado na UTI de um hospital da cidade. A partir disso, outros hospitais começaram a pesquisar ERV como colonizante em pacientes de risco, sendo que, desde então, diversas instituições de saúde tem relatado a identificação desta bactéria à divisão de vigilância municipal. Diante do exposto, este estudo procurou avaliar a presença e o perfil de suscetibilidade antimicrobiana de enterococos em ambientes hospitalares, com o intuito de atualizar informações sobre o gênero.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras bacterianas

Fizeram parte deste estudo, 203 isolados de *Enterococcus* spp. provenientes de diferentes materiais clínicos a partir

Recebido em 20/03/2008

Aprovado em 01/09/2009

*Realizado na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises

¹Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

²Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

³Unidade de Pesquisa Biomédica, Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

de pacientes encaminhados a dois hospitais situados na cidade de Porto Alegre, Brasil, sendo eles, o Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e o Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (HSL), entre dezembro de 2006 e março de 2007. Somente um isolado por paciente foi incluído neste estudo. Todos os isolados foram conservados em caldo BHI acrescido de 20% de glicerol e mantidos congelados a 80°C negativos. Este estudo foi aprovado pelos comitês de ética em pesquisa das duas instituições de saúde estudadas (CEP/HCPA 06/506 e CEP/PUCRS 06/03550).

Identificação dos enterococos isolados

A identificação do gênero foi realizada através da observação de características como: coloração de Gram; morfologia celular; atividade hemolítica, ausência da catalase; hidrólise L-pirroglutamil-β-naftilamida (teste de PYR), reação de bile-esculina e crescimento na presença de NaCl 6,5%. A identificação de espécies das 203 amostras estudadas foi realizada através de um método simplificado de provas fisiológicas e bioquímicas descrito por Facklam & Collins (1989)¹³ e Facklam & Teixeira (2003)¹⁴. Concomitantemente a este método, foi utilizado o sistema automatizado Vitek 2 (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) em 80 isolados.

Testes de sensibilidade antimicrobiana

Todos os isolados foram testados contra tetraciclina, cloranfenicol, ciprofloxacino, quinupristina-dalfopristina, rifampicina, eritromicina, nitrofurantoína vancomicina e teicoplanina (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK) usando o método de disco-difusão. Resistência a altos níveis de aminoglicosídeos (HLAR) e à ampicilina foi determinada pelos métodos de disco-difusão e diluição em ágar, seguindo os critérios estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2007)⁸. A concordância entre os resultados de resistência obtidos com os dois métodos de sensibilidade foi determinada através do coeficiente kappa (k), onde se utilizou o programa estatístico SPSS v.15.0.

Ainda, mediante o emprego do método de diluição em ágar, determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM) para os antimicrobianos aminoglicosídeos nas concentrações de: 125, 250, 500 e 1000 µg/mL de gentamicina (Sigma) e 500, 1000, 2000 e 3000 µg/mL de estreptomicina (Sigma). Os padrões *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e ATCC 51299 foram usados como controles de sensibilidade e resistência, respectivamente.

RESULTADOS

Entre as 203 amostras de *Enterococcus* spp. isolados, 54% pertenciam a pacientes internados e 46% a pacientes ambulatoriais. O material clínico mais comum no isolamento de enterococos foi a urina (64,5%) e em menor prevalência a hemocultura (9,8%), líquidos diversos (7,9%), secreções em geral (6,9) e outros (10,9%).

Foi observado, neste estudo, a presença de 5 espécies de *Enterococcus*, sendo *E. faecalis* identificado em 93,6% dos isolados, seguido de *E. faecium* (4,4%), *E. casseliflavus* (1,0%), *E. gallinarum* (0,5%) e *E. hirae* (0,5%).

Foram isolados 5 enterococos resistentes à ampicilina, sendo 4 *E. faecium*. A presença de *E. faecalis* resistente a β-lactâmicos é bastante rara, sendo que, neste estudo, o único representante desta espécie resistente à ampicilina, foi também identificado como resistente à vancomicina e teicoplanina.

A presença de HLAR foi verificada em 37,4% e 23,6% para a estreptomicina (HLR-St) e gentamicina (HLR-Ge), respectivamente, com 10,3% apresentando HLR aos dois aminoglicosídeos (HLR-Ge/St) testados (Tabela).

A resistência à ampicilina por ambos os métodos avaliados (disco-difusão e diluição em ágar) foi idêntica (2,5%). Foram observadas discrepâncias entre os resultados dos testes com HLR St (κ= 0,86) e HLR-Ge (κ= 0,87). Para a gentamicina, foi observado erros graves (VME) em um caso (1,3%) e erro menor (MI) em dois outros (2,6%). Com a estreptomicina observou-se discrepâncias em 3 casos (6,2%), todos VME. Não foi constatada ocorrência de erros maiores (ME) para nenhum dos três antimicrobianos testados (Tabela I).

A tabela II mostra os resultados obtidos na avaliação da suscetibilidade pelo método de disco-difusão a antimicrobianos como vancomicina e teicoplanina, assim como também a outros antimicrobianos alternativos.

Na determinação da CIM para a gentamicina, observou-se 155 amostras sensíveis (CIM ≤ 500µg/mL), sendo que a grande maioria, 144 (92,9%) apresentou suscetibilidade à baixa concentração (CIM ≤ 125µg/mL). Entre os 48 isolados com HLR-Ge (MIC > 500 µg/mL), a maioria 41 (85,4%) apresentaram CIM > 1000 µg/mL. Com relação a estreptomicina, em 86,6% dos isolados sensíveis à estreptomicina (CIM ≤ 2000µg/mL) a CIM foi ≤ 500 µg/mL. Tanto para a gentamicina como para a estreptomicina, houve uma menor incidência de enterococos sensíveis que apresentaram CIM na faixa próxima ao limite de sensibilidade indicado para o método utilizado (Tabela III).

TABELA I
Comparação dos resultados obtidos pelos métodos de disco-difusão e diluição em ágar para a detecção de HLAR e ampicilina em 203 amostras de *Enterococcus*

Antimicrobiano	Nº de amostras resistentes (%)*		VME	ME	MI	K
	Disco-difusão	Diluição em ágar				
Ampicilina	5 (2,5%)	5 (2,5%)	-	-	-	1,0
Estreptomicina	73 (36%)	76 (37,4%)	6,2%	-	-	0,86
Gentamicina	45 (22,2%)	48 (23,6%)	1,3%	-	2,6%	0,87

* Ponto de corte utilizados para determinação da resistência pelo método de disco-difusão e diluição em ágar, respectivamente: ampicilina: ≥ 17mm e ≤ 16mm ou ≤ 8µg/mL e ≤ 16µg/mL; estreptomicina: ≥ 10mm e ≤ 6mm ou ≤ 2000µg/mL e > 2000µg/mL; gentamicina: ≥ 10mm e ≤ 6mm ou ≤ 500µg/mL e > 500µg/mL (CLSI, 2007)⁸. VME= Very major error (≤3%); ME = Major error (≤1,5%); MI = Minor error; K = coeficiente kappa de concordância.

TABELA II
Perfil de suscetibilidade de acordo com o método de disco-difusão de 203 amostras de enterococos provenientes de duas instituições de saúde de Porto Alegre, RS

Antimicrobianos	Sensível n (%)	Intermediário n (%)	Resistente n (%)
Vancomicina	200 (98,5)	2 (1)	1 (0,5)
Teicoplanina	202 (99,5)	0 (0)	1 (0,5)
Cloranfenicol	131 (64,5)	5 (2,5)	67 (33)
Nitrofurantoína	195 (96)	4 (2)	4 (2)
Eritromicina	15 (7,4)	62 (30,5)	126 (62,1)
Tetraciclina	68 (33,5)	4 (2)	131 (64,5)
Rifampicina	71 (35)	82 (40,4)	50 (24,6)
Ciprofloxacino	114 (56,2)	28 (13,8)	61 (30)
Quinupristina-dalfopristina	12 (5,9)	14 (6,9)	177 (87,2)

TABELA III

Determinação da CIM para estreptomicina e gentamicina pelo método de ágar diluição entre 203 amostras de enterococos

Estreptomicina			Gentamicina		
CIM (µg/mL)	Categoria*	Nº de isolados (%)	CIM (µg/mL)	Categoria	Nº de isolados (%)
≤ 500	S	110 (86,6)	≤ 125	S	144 (92,9)
> 500-1000	S	4 (3,2)	> 125-250	S	4 (2,6)
> 1000-2000	S	13 (10,2)	> 250-500	S	7 (4,5)
> 2000-3000	R	40 (52,6)	> 500-1000	R	7 (14,6)
> 3000	R	36 (47,3)	> 1000	R	41 (85,4)

* S = Sensível; R = Resistente

DISCUSSÃO

Os enterococos emergiram como um dos mais importantes patógenos hospitalares do mundo, sendo que a frequência de seu isolamento vem aumentando desde a última década (11,18). Neste estudo, 54% dos isolados de enterococos obtidos foram provenientes de pacientes internados. De um modo geral, os enterococos causam maiores infecções em pacientes internados e principalmente naqueles que estão recebendo terapia antibiótica há algum tempo. Alguns relatos indicam ainda que os próprios pacientes e a equipe assistencial seriam os principais reservatórios (17, 20, 28).

Neste estudo a principal fonte de isolamento de enterococos foi a urina (64,5%), seguida da hemocultura (9,8%), líquidos diversos (7,9%) e secreções em geral (6,9%), estando estes resultados semelhantes aos relatados em outros trabalhos (3,23,28). Todos estes dados evidenciam o papel preponderante dos enterococos como patógeno urinário.

Dentre as espécies de enterococos, foram identificadas como *E. faecalis* (93,6%), *E. faecium* (4,4%), *E. casseliflavus* (1%), *E. gallinarum* (0,5%) e *E. hirae* (0,5%). *E. faecalis* costuma ser o responsável por aproximadamente 80 a 90% das infecções, enquanto que *E. faecium* é apontado como responsável por cerca de 5% a 10% (12,15,16,20). Atualmente, a prevalência de *E. faecium* tem aumentado muito, especialmente em locais onde há alta prevalência de resistência a vancomicina (2,16,28). A pressão seletiva provocada pelo uso extensivo de cefalosporinas de amplo espectro, aminoglicosídeos e outros antimicrobianos com atividade limitada contra enterococos, tem permitido que estes patógenos sobrevivam e prevaleçam entre bactérias que colonizam o trato gastrointestinal de pacientes graves, imunossuprimidos e neutropênicos (27). Particularmente temível é a capacidade do enterococo de transferir genes de resistência a espécies mais virulentas como, por exemplo, os estafilococos (4).

A importância atual na identificação de espécies de enterococos deve-se à rápida elevação da resistência antimicrobiana e à especificidade desta resistência entre cada espécie, sendo de fundamental importância principalmente para o controle de infecções clinicamente importantes, como, por exemplo, bacteremias e endocardite (19,27). Espécies como *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* possuem resistência intrínseca à vancomicina e, deste modo, possuem menor importância em infecções hospitalares (3,7,32).

Neste estudo, verificou-se que 97,5% das cepas eram sensíveis a ampicilina, sendo que foi obtida total concordância entre os testes de sensibilidade utilizados (disco-difusão e

diluição em ágar) para este antimicrobiano (k = 1). Entre as 5 amostras resistentes, 4 (90%) eram *E. faecium* e apenas 1 (10%) *E. faecalis*. Em um estudo similar a este, KAÇMAZ & AKSOY (2005)¹⁹ encontraram resistência à ampicilina de 75% em *E. faecium* e 17% em *E. faecalis*. Segundo SHEPARD & GILMORE. (2002)³¹ e CETINKAYA *et al.* (2000)⁴, *E. faecium* são de 4 até 16 vezes mais resistentes a antibióticos beta-lactâmicos que os *E. faecalis*.

Foi verificado neste estudo HLR-St em 37,4% dos isolados, sendo que a distribuição de resistência a este antimicrobiano foi semelhante entre o HCPA e o HSL (35,9% e 38,8%, respectivamente). O HLR-Ge deve-se à produção de enzimas inativadoras, conferindo resistência para todos os outros aminoglicosídeos como: tobramicina, netilmicina, amikacina e kanamicina, com exceção da estreptomicina, a qual, também, pode ser resistente através de alterações cromossômicas (19,29,33). Verificou-se HLR-Ge em 23,6% dos isolados, sendo que o HSL apresentou maior prevalência de amostras resistentes a este antimicrobiano, 29,8% contra 17,4% observada no HCPA. A concomitante resistência observada frente à estreptomicina e gentamicina (HLR-Ge/St) foi de 10,3%. QUIÑONES *et al.*, (2005)³⁰ estudando enterococos de 12 hospitais cubanos, obtiveram 35,3% e 27,3% de HLR-Ge/St, respectivamente. KAÇMAZ e AKSOY (2005)¹⁹ encontraram 36% de HLR-Ge e 22% de HLR-St, ainda, em outro estudo realizado na cidade de Porto Alegre, d'AZEVEDO *et al.*, (2004)¹⁰ encontraram HLR-Ge e HLR-St em 23,5% e 14,3%, respectivamente.

Apesar de haver boa concordância entre os métodos de sensibilidade utilizados para detecção de HLRA (K=0,89), o teste de disco-difusão para a detecção de HLR-Ge apresentou 1,3% de erro muito maior (VME) e 2,6% de erro menor (MI), quando comparado com o de diluição em ágar, sendo que estes valores estão dentro dos limites aceitáveis estabelecidos pelo CLSI (2007)⁸. No entanto, a ocorrência de erro muito maior apresentou índice inaceitável para a estreptomicina (VME= 6,35%). Segundo SCHULZ & SAHM (1993)³² e QUIÑONES *et al.*, (2005)³⁰, falsa suscetibilidade para a estreptomicina é um problema comumente encontrado, porém pode ser contornado pelo prolongamento da incubação para 48 horas antes da interpretação, o que aumenta a detecção da resistência em alguns padrões de enterococos.

Foi encontrado apenas uma amostra com resistência à vancomicina e à teicoplanina, sendo esta identificada como *E. faecalis*. Ainda, é baixa a prevalência de ERV em amostras clínicas de pacientes com infecções, sendo mais frequente seu isolamento, em estudos que avaliam a presença de pacientes portadores através de swab retal (3,5,7).

Outros antimicrobianos alternativos no tratamento de infecções por enterococos demonstraram, nos dois hospitais, altas taxas de resistência, como é o caso da eritromicina (62,1%) e tetraciclina (64,5%), o que torna estes inadequados para terapia empírica. Ainda, observou-se moderada resistência à rifampicina (24,6%), cloranfenicol (33%) e ciprofloxacino (30%) e baixa resistência à nitrofurantoína (2%). A baixa resistência a este antimicrobiano reforça a indicação de MURRAY (2000)²⁸ para o tratamento e à profilaxia das infecções do trato urinário.

A resistência à quinupristina-dalfopristina (Q/D) foi de 87,2%, sendo que 11,1% eram *E. faecium* e 91% *E. faecalis*. Esta espécie é intrinsecamente resistente à Q/D, entretanto este antibiótico tem sido usado com bons resultados para tratar infecções ocasionadas pelo *E. faecium*, apesar de alguns estudos descreverem o surgimento de resistência crescente durante a terapia (6,22,25).

A determinação da CIM evidenciou que 86,6% e 92,9% dos isolados sensíveis pelo método de disco-difusão eram sensíveis a menor concentração testada para estreptomina (CIM \leq 500 μ g/mL) e gentamicina (CIM \leq 125 μ g/mL), respectivamente. Ainda, a CIM era próxima ao limite de sensibilidade para ambos os aminoglicosídeos em apenas 10,2% e 4,5%. Estes dados sugerem que o teste de disco-difusão, muito difundido entre laboratórios clínicos, quando realizado com cautela e controle rígido da qualidade, apresenta bons resultados na avaliação da suscetibilidade antimicrobiana no gênero enterococos.

CONCLUSÕES

E. faecalis e *E. faecium* foram as espécies mais frequentes neste estudo, sendo também as de maior relevância clínica. A identificação de espécies é recomendada somente em casos de ERV, pois espécies como *E. casseliflavus* e *E. galinarum* são intrinsecamente resistentes à vancomicina.

Este estudo vem confirmar dados prévios de prevalência crescente de enterococos resistentes a altos níveis de aminoglicosídeos em ambientes hospitalares, o que torna ineficaz sua associação com betalactâmicos e glicopeptídeos no tratamento de infecções graves. Verificou-se também entre os antimicrobianos alternativos, elevada resistência à eritromicina e à tetraciclina, moderada resistência ao cloranfenicol, à rifampicina, ao ciprofloxacino e baixa resistência à nitrofurantoina. Podendo-se reafirmar a indicação da quinupristina-dalfopristina para tratar infecções por *E. faecium*.

É fundamental a realização de estudos que avaliam a resistência antimicrobiana dos enterococos em ambientes hospitalares, visto que, este microrganismo representa atualmente um grave problema nas instituições de saúde, especialmente pela possibilidade de disseminação a partir de portadores saudáveis e pela escassez de opções terapêuticas eficazes.

REFERÊNCIAS

1. ASLANGUL, E.; RUIIMY, R.; CHAU, F.; GARRY, L.; ANDREMONT, A.; FANTIN, B. Relationship between the Level of Acquired Resistance to Gentamicin and Synergism with Amoxicillin in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, n. 10, p. 4144-4148, 2005.
2. AVALOS, J. S.; ASSERELLA, L. R.; BOLADOS, N. G.; HERRERA, N. H.; LEYTON, J.O. Resistência a antimicrobianos em cepas de *Enterococcus* sp isoladas en hospitales del norte de Chile. *Revista Chilena de Infectología*, v. 23, n. 3, p. 226-231, 2006.
3. BAZET, C.; BLANCO, J.; SEIJA, V.; PALACIO, R. Enterococos resistentes a vancomicina. Un problema emergente en Uruguay. *Revista Médica del Uruguay*, v. 21, p. 151-158, 2005.
4. CETINKAYA, Y.; FALK, P.; MAYHALL, C., G. Vancomycin-Resistant *Enterococci*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 13, p. 686-707, 2000
5. CHANG, P. C.; LI, H. Y.; TANG, H. J.; LIU, J. W.; WANG, J. J.; CHUANG, Y. C. In vitro synergy of baicalin and gentamicin against vancomycin-resistant *Enterococcus*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. v.40, p. 56-61, 2007.
6. CHOW, J. W.; DONAHEDIAN, S.M.; ZERVOS, M. J. Emergence of increased resistance to quinupristin/dalfopristin during therapy for *Enterococcus faecium* bacteremia. *Clinical Infectious Disease*, v.24, p. 90-91, 1997.
7. CLIMO, M. W.; ARCHER, G. L.; MONROE, S. Vancomycin-resistant Gram-positive pathogens: potential approaches for prevention and control. In: WENZEL; R. P. *Prevention and control of nosocomial infections*, 4rd ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 2003.
8. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement – M100-S17. CLSI, v. 27, n. 1, 2007.
9. CORVALIN, P. Vancomycin resistance in gram – positive cocci. *Clinical*

Infection Disease. v. 42, p. 25-34, 2006.

10. D'AZEVEDO, P. A.; DIAS, C. A. G.; LEMOS, S. B.; BITTENCOURT, J. A. F.; TEIXEIRA, L., M. Antimicrobial susceptibility among *Enterococcus* isolates from the city of Porto Alegre, RS, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 35, p. 199-204, 2004.
11. D'AZEVEDO, P. A.; DIAS, C. A. G.; TEIXEIRA, L., M. Genetic Diversity and antimicrobial resistance of enterococcal isolates from southern region of Brazil. *Revista Instituto Medicina Tropical de São Paulo*, v. 48 n. 1, p. 11-16, January-February, 2006.
12. DESHPANDE, L. M.; FRITSCH, T. R.; MOET, G. J.; BIEDENBACH, D. J.; JONES, R. N. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe: a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 58, p. 163-170, 2007.
13. FACKLAM, R.R.; COLLINS, M. D. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 27, p. 731-734, 1989.
14. FACKLAM, R.; TEIXEIRA, L.M. *Enterococcus*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H., et al. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. Washington, American Society for Microbiology, 2003.
15. FURTADO, G. H. C.; MARTINS, S. T.; COUTINHO, A. P.; SOARES, G. M. M.; WEY, S. B.; MEDEIROS, E. A. S. Incidência de *Enterococcus* resistente à vancomicina em um hospital universitário no Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 39, n. 1, p. 41-46, 2005
16. HALLGREN, A.; ABEDNAZARI, H.; EKDAHL, C.; HANBERGER, H.; NILSSON, M.; SAMUELSSON, A.; SVENSSON, E.; NILSSON, L. E. Antimicrobial susceptibility patterns of enterococci in intensive care units Sweden evaluated by different MIC breakpoint systems, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 48, p. 53-62, 2001
17. HAYDEN, M. K. Insights into the epidemiology and control of infection with vancomycin-resistant enterococci, *Clinical Infectious Disease*, v.31, p. 1058-1065, 2000.
18. HÖRNER, R.; LISCANO, M. G. H.; MARASCHIN, M. M.; SALLA, A.; MENEGHETTI, B.; FORNO, N. F. D.; RIGHI, R. A. Suscetibilidade antimicrobiana entre amostras de *Enterococcus* isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 41, n. 6, p. 391-395, 2005.
19. KAÇMAZ, B.; AKSOY, A. Antimicrobial resistance of enterococci in Turkey. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v. 25, p. 535-538, 2005.
20. KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D. *Diagnóstico microbiológico*. Texto e Atlas Colorido. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. p. 589-659.
21. LEME, I. L.; FERREIRA, A. J. P. *Enterococcos* In: FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. *Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infeciosas e Auto-Imunes* 2th ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2001. p. 132-146.
22. LINDEN, P.K.; PASCULLE, A. W.; McDEVITT, D.; KRAMER, D. J. Effect of quinupristin/dalfopristin on the outcome of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteraemia: comparison with a control cohort. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, c. 39, Suppl. A, p. 145-151, 1997.
23. MARIN, M.E.; MERA, J.R.; ARDUINO, R.C.; CORREA, A.P.; COQUE, T.M.; STAMBOULIAN, D. First report of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated in Argentina. *Clinical Infectious Diseases*, v. 26, n.1, p. 235-236, 1998.
24. MCNAMARA, E.B.; KING, E.M.; SMYTH, E.G. A survey of antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Enterococcus* spp. from Irish hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 35, n. 1, p. 185-189, 1995.
25. MENDES, C.; SINTO, S. I.; HSIUNG, A.; OPLUSTIL, C.; TEIXEIRA, L.; SEGURA, A.; SOUZA, D.; BARTH, A. L.; NICODEMO, A. C. Atividade antimicrobiana in vitro de quinupristina/dalfopristina para cocos gram-positivos isolados de cinco centros brasileiros: resultado do estudo de vigilância L-SMART. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. v. 38, n. 3, p. 191-197, 2002.
26. MOELLERLING, R. C. J. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. *Clinical Infectious Disease*, v. 14, p. 1173-1178, 1992.
27. MUNDY, L.M.; SAHM, D.F.; GILMORE, M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, v.13, p. 513-522, 2000.

28. MURRAY, B. E. Vancomycin-resistant enterococcal infections. *New England Journal of Medicine*, v. 342, p. 710-721, 2000.
29. PALAVECINO R., E. Puesta al día en enterococos - año 2001: Identificación de especies y estudio de susceptibilidad antimicrobiana. *Revista Chilena de Infectología*, v. 18, n. 2, p. 95-100, 2001.
30. QUIÑONES, D.; GOÑI, P.; RUBIO, M.C.; DURAN, E.; GÓMEZ-LUZ, R. Enterococci spp. isolated from Cuba: species frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility profile. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 51, p. 63-67, 2005.
31. SHEPARD, B. D.; GILMORE, M. S. Antibiotic-resistant enterococci: mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes and Infection*, v. 4, p. 215-224, 2002.
32. SCHULZ, J. E.; SAHM, D. F. Reability of the E Test for detection of ampicillin, vancomycin, and high-level aminoglycoside resistance in *Enterococcus* spp..

- Journal of Clinical Microbiology*, p. 3336-3339, 1993
33. ZARRILI, R.; TRIPODI, M. F.; PODOLO, A. D.; FORTUNATO, R.; BAGATTINI, M.; CRISPINO, M.; FLORIO, A.; TRIASSI, M.; UTILI, R. Molecular epidemiology of high-level aminoglycoside-resistant enterococci isolated from patients in a university hospital in southern Italy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 56, p. 827-835, 2005.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Faculdade de Farmácia – UFRGS
Avenida Ipiranga, nº 2752 sala 405, Bairro Santana
CEP: 90610 – 000 Porto Alegre, RS
Tel: (51) 3308 5215
Email: eabender@hotmail.com



Há 42 anos, a SBAC se dedica
ao que existe de mais importante
para o seu laboratório...

VOCÊ!

Associe-se à SBAC

www.sbac.org.br

SBAC

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

42 anos com você!

Alterações laboratoriais encontradas em indivíduos co-infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e pelo Vírus da Hepatite C (HCV)*

Laboratorial alterations found in individuals co-infections with the human immunodeficiency virus (HIV) and the hepatitis C virus (HCV)

Karen Freitas Santos¹, Taíse Biscaglia Vieira¹, Sandra Trevisan Beck² & Daniela Bitencourt Rosa Leaf²

RESUMO - A prevalência da co-infecção HIV/HCV varia em diferentes regiões do mundo. O objetivo deste estudo foi verificar a prevalência de infecção pelo vírus da hepatite C em grupo de pacientes soropositivos para o HIV atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), RS. Associando dados de: terapia antirretroviral, contagem de células T CD4⁺, carga viral do HIV, alterações hematológicas e bioquímicas e presença de infecções oportunistas. Analisou-se 250 prontuários de pacientes HIV positivos, observando a co-infecção HIV/HCV em 78 pacientes (31,2%). Houve um predomínio na população de pacientes jovens (33,8 anos), do sexo masculino (76,9%) e usuários de drogas injetáveis (58,9%). 61,5% realizavam terapia antirretroviral e nenhum realizava terapia contra o HCV. A diferença da contagem de células T CD4⁺ foi estatisticamente significativa entre pacientes em terapia antirretroviral e os sem uso de drogas antirretrovirais. A correlação da carga viral entre estes dois grupos não foi significativa. As alterações hematológicas encontradas foram: anemia (25,6%), neutropenia (16,6%), trombocitopenia (26,9%) e linfopenia (20,5%). Os níveis de ALT foram superiores aos de AST. A infecção oportunista com maior índice foi a citomegalovirose. Os dados analisados demonstram que a co-infecção HIV/HCV traz aos pacientes diversas complicações imunológicas, hematológicas e bioquímicas.

PALAVRAS-CHAVE - Co-infecção; HIV; HCV.

SUMMARY - The prevalence of the co-infection HIV/HCV varies in different areas of the world. The objective of this study was to verify the infection prevalence for the virus of the hepatitis C in group of seropositive patients for HIV taken care at the University Hospital of the Santa Maria/RS. It was verified that other data: therapy antiretroviral, CD4 cell counts, viral load of HIV, hematological and biochemical alterations and opportunist infections presence. 250 records of patient HIV positive were analyzed, noting the co-infection HIV/HCV in 78 patient (31.2%). There was a prevalence in the young patients population (33.8 years), male (76.9%) and users of drugs injected (58.9%). 61.5% accomplished therapy antiretroviral and none accomplished therapy against HCV. The difference of the counting of CD4+ was statistically significant among patient with and without antiretroviral therapy. The hematological alterations found were: anemia (25.6%), neutropenia (16.6%), thrombocytopenic (26.9%) and linfopenia (20.5%). The levels of ALT were superior to the of AST. The opportunist infection with larger index was the citomegalovirose. The analyzed data demonstrate that the co-infection HIV/HCV brings to the patients several complications immunological, hematological and biochemical.

KEYWORDS - Co-infection; HIV; HCV.

INTRODUÇÃO

Acredita-se que 39,5 milhões de pessoas são portadores do vírus HIV no mundo, sendo que a África Sub-saariana continua sendo a região mais castigada pela epidemia, quando dois terços do total mundial de portadores de HIV encontra-se nesta região. No Brasil, a totalidade de casos de infecção pelo HIV, notificados entre 1980 e junho de 2006, é de 433.067 casos¹.

O HCV é um problema de saúde global, com uma estimativa de 170 milhões de pessoas (3% do total da população) infectadas pelo vírus em todo o mundo. Nos EUA, aproximadamente 4 milhões, e na Europa, mais do que 5 milhões de pessoas estão infectadas pelo vírus da hepatite C². Não se conhece, com precisão, a prevalência do HCV no nosso país, mas há relatos feitos em diversas áreas que sugerem que, em média, ela esteja entre 1% a 2% da população em geral. Os indivíduos considerados de risco são aqueles que receberam transfusões de sangue e/ou hemoderivados antes de 1992, usuários de drogas intravenosas, pessoas com tatuagens e piercings, alcoólatras, portadores de HIV, transplantados, hemodialisados, hemofílicos, presidiários e sexualmente promíscuos³.

O vírus da hepatite C e o HIV compartilham os mesmos mecanismos de transmissão. A co-infecção com o HIV ace-

lera a progressão da doença causada pelo vírus da hepatite C, agrava a progressão da infecção causada pelo HIV e aumenta o risco de transmissão do vírus da hepatite C⁴. A incidência do HCV é maior em pessoas infectadas pelo HIV quando comparadas com a população em geral. A co-infecção HIV/HCV causa doença hepática mais severa e mortalidade devido à insuficiência hepática que é mais frequente nas pessoas infectadas pelo HIV⁵. A progressão acelerada de fibrose é mais significativa entre pacientes com contagem mais baixa de células T CD4⁺. Uma contagem de células T CD4⁺ abaixo de 500 células/mm³ está associada com risco elevado de fibrose avançada. A diferença na progressão da hepatite C é causada pelos diferentes genótipos do HCV².

A prevalência da infecção pelo vírus da hepatite C em pacientes co-infectados pelo HIV varia em diferentes regiões do mundo, dependendo dos diferentes fatores de exposição para ambos os vírus⁴. Estudo realizado na população brasileira, em São Paulo, apresentou 17,7% de prevalência de co-infecção pelo HIV/HCV⁶. Porém, no Brasil são poucos estudos que estabelecem esta prevalência, concentrando-se a maioria na Região Sul e Sudeste, sendo muito escasso, principalmente, na Região Nordeste do país, pelo fato de não existir sistematização em bancos de dados locais⁷.

Recebido em 08/04/2008

Aprovado em 04/12/2009

*Trabalho Final de Graduação do Curso de Farmácia do Centro Universitário Franciscano (UNIFRA), apresentado e aprovado.

¹Bacharéis em Farmácia pelo Centro Universitário Franciscano (UNIFRA), Santa Maria/RS

²Professoras do Curso de Farmácia da Universidade Federal de Santa Maria (RS)

O tratamento da co-infecção é difícil, pois pacientes em terapia combinada podem apresentar hepatotoxicidade, o que pode comprometer a adesão ao tratamento. Além disso, a reconstituição do sistema imune pode reativar a hepatite C ou aumentar a replicação do HCV, aumentando a chance de ocorrer acometimento hepático ou piorando o quadro já estabelecido⁵.

Devido aos problemas ocasionados pela co-infecção HIV/HCV, o presente trabalho teve como objetivo verificar a prevalência de casos de co-infecção HIV/HCV em pacientes do HUSM, bem como, analisar a contagem de células T CD4⁺, carga viral, tratamento antirretroviral, alterações hematológicas e bioquímicas e infecções oportunistas que estes pacientes apresentam, visando um possível valor prognóstico.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho de pesquisa foi realizado com base na revisão de 250 prontuários de pacientes soropositivos para o HIV, em acompanhamento no Ambulatório de Doenças Infecciosas do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM). O levantamento dos dados foi realizado no período de junho a novembro de 2006. Nos prontuários selecionados foram analisadas as seguintes informações: idade, sexo, carga viral, contagem de células T CD4⁺ (número de células T CD4⁺ por mm³ de sangue), sorologia para HCV, AST (Aspartato amino transferase), ALT (Alanina amino transferase), tratamento antirretroviral, hemograma e outras infecções presentes.

Foram aplicados procedimentos da estatística descritiva: tabelas de frequência, médias, desvio padrão, percentagens e intervalo de confiança. Também foi estudada a correlação entre as variáveis quantitativas. Para comparar as médias utilizou-se o teste t. Os programas utilizados foram SPSS 8.0 (Statistical Package for Social Science) e o Microsoft Office Excel 2003. O nível de significância utilizado foi de 5%.

O presente trabalho de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) sob o número de processo: 23081.002854/2006-77.

RESULTADOS

Verificou-se a prevalência de co-infecção HIV/HCV entre 250 pacientes avaliados. Entre os indivíduos HIV atendidos no HUSM, encontrou-se uma prevalência de co-infecção HIV/HCV de 31,2% (Fig. 1). Destes 78 pacientes co-infetados, 60 (76,9%) eram do sexo masculino e 18 (23,0%) do sexo feminino. A média de idade para essa população foi de 33,8 anos (DP= ± 7,4), sendo, composta majoritariamente por indivíduos com idades entre 23 e 46 anos (Tab.1).

A população estudada (n=78) apresentou um ou mais fatores de risco, prevalecendo o uso de drogas injetáveis. Vinte e cinco pacientes não apresentaram nenhum relato de fator de risco em seus prontuários. A frequência de fatores de risco dos pacientes pode ser vista na Tabela 2. Em relação a distribuição de fatores de risco, 42 (53,8%) pacientes apresentaram apenas 1 (um) fator; 4 (5,1%) pacientes apresentaram 2 fatores e 7 (8,9%) pacientes apresentaram 3 fatores de risco. Entre os pacientes que apresentam apenas um fator de risco, 37 (88,1%) são usuários de drogas injetáveis e 5 (11,9%) mantêm relações sexuais com parceiro soropositivo para HIV. Já os pacientes que apresentaram 2 ou 3 fatores de risco associados representaram 14,1% (n=11). As associações estão relatadas na Tabela 3. No

grupo analisado, 61,5% dos pacientes estavam em terapia antirretroviral para o HIV e não foi observado por nenhum dos pacientes a terapia concomitante para o HCV.

Para a análise dos resultados da contagem de células T CD4⁺ e da quantificação da carga viral do HIV os pacientes foram separados em dois grupos: os que realizam a terapia antirretroviral e os que não realizam. Os valores absolutos da contagem de células T CD4⁺ e da quantificação da carga viral do HIV para cada grupo de pacientes, de forma estatística descritiva, podem ser visualizados na Tabela 4. Observou-se uma diferença estatisticamente significativa nos valores da contagem de células T CD4⁺ (p=0,008) entre os dois grupos, sendo que na carga viral os resultados não foram estatisticamente significativos (p=0,867).

Entre os 48 pacientes em tratamento, apenas 10 (20,8%) estavam com contagem de células T CD4⁺ abaixo de 200 células/mm³ e associados a uma carga viral plasmática elevada. Os 30 pacientes sem nenhuma terapia tanto para o HIV quanto para o HCV, apresentavam uma contagem de células T CD4⁺ com média de 531,10 células/mm³, e três com contagem abaixo de 200 células/mm³, sendo que destes apenas dois estavam com carga viral plasmática elevada. Quanto à quantificação da carga viral dos 48 pacientes em terapia, 19 (39,5%) apresentaram valores elevados (acima de 10.000 cópias/mL). Destes, 9 apresentavam concomitantemente contagens de células T CD4⁺ abaixo de 200 células/mm³. Entre os pacientes sem tratamento antirretroviral, 17 (56,6%) apresentaram valores acima de 10.000 cópias/mL para a quantificação viral. A correlação encontrada entre os dois grupos não foi significativa.

Em relação as enzimas hepáticas alanina e aspartato amino transferase, a população estudada, apresentou os níveis de alanina aminotransferase elevados em 58,9% dos pacientes, sendo que variavam entre 42 e 492 UI/L, enquanto a aspartato aminotransferase estava elevada em 48,72%, com variação entre 41 e 266 UI/L. A Figura 2 mostra as alterações hematológicas dos pacientes com co-infecção HIV/HCV, onde 25,6% dos pacientes co-infetados apresentaram anemia; 16,6%, neutropenia; 26,9%, trombocitopenia e, 20,5%, linfopenia. Também, verificou-se que 33,3% dos pacientes apresentavam macrocitose.

A infecção pelo citomegalovírus foi a infecção majoritária entre os pacientes imunodeprimidos pela co-infecção HIV/HCV, representando 42 casos (53,8%). A segunda maior prevalência foi a toxoplasmose, representando 50%, seguida pela presença de sífilis, hepatite B e infecção por Herpes Zoster. Outras infecções por bactérias, fungos e vírus, foram também observadas, porém com menor frequência, conforme a Figura 3, que mostra a prevalência das infecções oportunistas presentes no grupo estudado.

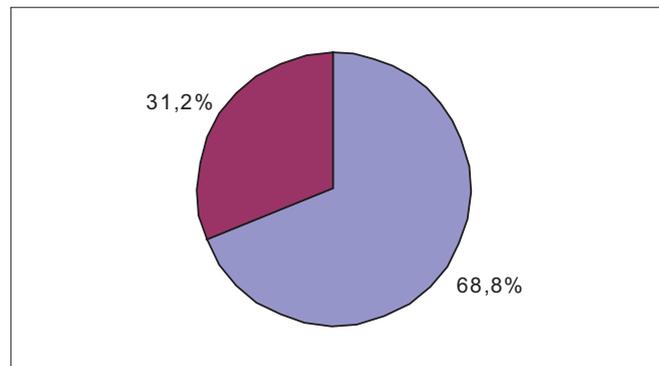


Figura 1 – Prevalência da co-infecção pelos vírus HIV/HCV em pacientes atendidos no HUSM.

TABELA I
Características da população estudada

Característica	Número	Percentual
Sexo		
Masculino	60	76,9
Feminino	18	23,0
Idade (anos)		
23 – 30	32	41,0
31 – 38	26	33,3
39 – 46	17	21,8
47 – 54	2	2,5
> 55	1	1,2

TABELA II
Prevalência dos fatores de risco do grupo de pacientes co-infectados com HIV/HCV

Fator de risco	N	Prevalência
Usuário de drogas injetáveis	46	58,9%
Parceiro soropositivo para HIV	9	11,5%
Homossexual	2	2,5%
Receptor de transfusão de sangue	1	1,2%
Com tatuagens	2	2,5%
Presidiário	2	2,5%
Promiscuidade sexual	5	6,4%
Não relatado quaisquer dos fatores de risco listados acima	25	32,0%

TABELA III
Número de pacientes co-infectados pelos vírus HIV/HCV com 2 ou 3 fatores de risco associados.

Fator de risco 1	Fator de risco 2	Fator de risco 3	n	%
Usuário de drogas injetáveis	parceiro soropositivo para HIV		1	1,2
Homossexual	recebeu transfusão de sangue		1	1,2
Usuário de drogas injetáveis	homossexual		1	1,2
Receptor de transfusão de sangue	com tatuagens		1	1,2
Usuário de drogas injetáveis	parceiro soropositivo para HIV	com tatuagens	1	1,2
Usuário de drogas injetáveis	parceiro soropositivo para HIV	promiscuidade sexual	4	5,1
Usuário de drogas injetáveis	parceiro soropositivo para HIV	presidiário	2	2,5

TABELA IV
Comparação entre a contagem de células T CD4+ e a carga viral dos pacientes co-infectados pelos vírus HIV/HCV com e sem tratamento antirretroviral para o HIV.

Variável	Tratamento antirretroviral	n	Média	Desvio padrão	Erro padrão da média	P*
Contagem de células T CD4+ (células/mm³)	sim	48	371,50	254,17	36,69	0,008
	não	30	531,10	249,83	45,61	
Carga Viral (cópias/mL)	sim	48	53306,17	126740,89	18293,47	0,867
	não	30	48636,17	106911,55	19519,29	

*Teste t. p < 0,05 = significativo.

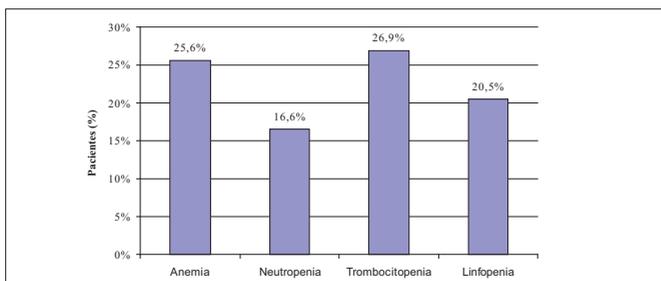


Figura 2 – Alterações hematológicas encontradas na população de pacientes co-infectados pelos vírus HIV/HCV.

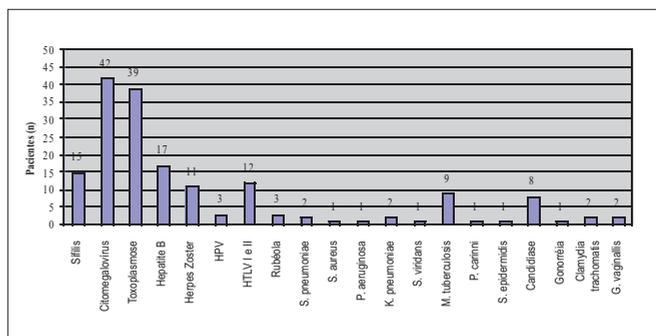


Figura 3 – Infecções por bactérias, protozoários, vírus e fungos encontradas nos pacientes co-infectados pelos vírus HIV/HCV.

DISCUSSÕES E CONCLUSÕES

As taxas de prevalência de co-infecção HIV/HCV variam em diferentes partes do país e do mundo, devido a fatores epidemiológicos, vias de transmissão e fatores de risco. Em Santa Catarina (Brasil) no ano de 1999, entre 99 pacientes a prevalência foi de 53,8% e no ano de 2003, em São Paulo, um trabalho realizado com 232 pacientes encontrou, também, 53,8% de prevalência de co-infecção⁷. Nesse estudo, não se pode deixar de considerar a possibilidade de resultados falso-positivos para o HCV, uma vez que a sorologia para hepatite C foi realizada pelo teste de ELISA, sendo que a realização de um teste confirmatório, mais específico, não foi realizada para todos os pacientes.

O predomínio de indivíduos do sexo masculino infectados pelo HIV também é correspondente a dados do Ministério da Saúde², assim, como outros estudos que comprovam uma maior prevalência de co-infecção HIV/HCV no gênero masculino. O principal fator de risco para a co-infecção HIV/HCV é o uso de drogas injetáveis. No presente estudo, 58,9% dos pacientes são usuários de drogas injetáveis, o que também é verificado por outros estudos^{1,8,9}. Os outros fatores de risco observados entre o grupo de pacientes apresentaram baixas taxas de prevalência, não relevantes, mas que também aumentam as chances de infecção pelo HCV entre os soropositivos para o HIV.

Entre os pacientes que não realizavam terapia para o HIV, apenas 10% destes deveriam estar em tratamento por apresentarem uma contagem de células T CD4+ abaixo de 200 células/mm³, principalmente por já definir-se um caso de AIDS, o restante, não se enquadrava nos critérios para início de terapia preconizada pelo Ministério da Saúde. A não realização da terapia para a hepatite C, concomitante ou não, à terapia antirretroviral do HIV, deve-se às contra-indicações ao tratamento do HCV. Segundo Focaccia *et al.*, 2004¹⁰, os critérios de exclusão ao tratamento medicamentoso são: consumo de drogas ilícitas, dependência à bebidas alcoólicas, contagem de plaquetas abaixo de 75.000 para indicação de interferon e de 90.000 para interferon-peguilado e contagem de neutrófilos inferiores a 1.500 células/mm³, entre outros fatores. Logo, a população estudada apresenta fatores que impedem a terapia contra o vírus da hepatite C, fato este que pode ser o motivo da não realização de tratamento para a infecção pelo HCV¹⁰.

Entre os 48 pacientes em terapia antirretroviral, 20,8% apresentaram de forma inesperada, baixas contagens de células T CD4+ e carga viral plasmática para HIV elevada. Isto pode ter ocorrido devido a uma terapia inadequada, por uso incorreto ou falha terapêutica. Segundo dados do Ministério da Saúde de 2006¹, 10 a 20% dos pacientes não conseguem suprimir a viremia e 20 a 50% dos que apre-

sentam uma boa resposta no início poderam apresentar uma falha virológica após um ano de terapia e após um ano de terapia apresentam uma falha virológica. No grupo não tratado, o aumento da carga viral plasmática para o HIV observado pode ser devido a um avanço da infecção pelo HIV ou à presença de infecções oportunistas, como, por exemplo, uma infecção ativa por *Mycobacterium tuberculosis* a qual aumenta significativamente a viremia plasmática¹¹. No acompanhamento da infecção pelo vírus da hepatite C, comumente é utilizada a dosagem sorológica das enzimas ALT (alanina aminotransferase) e AST (aspartato aminotransferase), sendo comum encontrar em uma hepatite viral ALT e AST (10 a 100 vezes o valor normal) com atividade de ALT maior que AST¹². A elevação dos níveis séricos de atividade enzimáticas das aminotransferases ocorre em virtude do aumento de permeabilidade dos hepatócitos, decorrentes do processo inflamatório hepático³.

As alterações hematológicas encontradas apresentaram valores inferiores aos encontrados na literatura, que descrevem que, 80% dos pacientes infectados pelo HIV apresentam um quadro de anemia e linfopenia, 30% de trombocitopenia e 40% de neutropenia¹³. Já para GOMES *et al.*, 2006¹⁴, a anemia é descrita em 60% dos casos, 40% de casos de trombocitopenia e 50% de neutropenia. Estas citopenias ocorrem devido à depleção das células do sistema imune decorrentes da infecção, de doenças oportunistas e como efeitos secundários dos agentes antirretrovirais. A presença de macrocitose é provavelmente decorrente da terapia antirretroviral ou do alcoolismo, os quais foram observados em alguns pacientes¹⁴.

Entre os pacientes co-infectados HIV/HCV, a ocorrência de uma infecção oportunista representa, na maioria das vezes, uma falha na terapêutica, que pode ser devida ao desenvolvimento da resistência a alguma droga antirretroviral ou ao uso inadequado da terapia. Essa infecção pode ser um indicativo de que o paciente possui a doença avançada ou pode ser devido a uma reconstituição imunológica após início da terapia, uma vez que a melhora imunológica pode resultar em resposta inflamatória a infecções oportunistas pré-existentes, anteriormente subclínicas, mostrando assim, a importância da avaliação laboratorial dos dados analisados.

REFERÊNCIAS

1. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde - Programa Nacional de DST e Aids. Boletim Epidemiológico - Aids e DST. Ano III - nº 1. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

2. ARENDS, J. E.; BOUCHER, C. A. B.; HOEPELMAN, A. I. M. Hepatitis C virus and human immunodeficiency virus coinfection: where do we stand? *Netherlands Journal of Medicine*, 63 (5): 156-163, 2005.
3. FERREIRA, C. T.; SILVEIRA, T. R. Hepatites virais: aspectos epidemiológicos e da prevenção. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 7 (4): 473-487, 2004.
4. MENDES-CORRÊA, M. C. J.; BARONE, A. A. Hepatitis C in patients co-infected with human immunodeficiency virus. A review and experience of a Brazilian Ambulatory. *Revista do Instituto de Medicina tropical São Paulo*, 47 (2): 59-64, 2005.
5. TOLEDO JR., A. C.; PILOTTO, J. H.; VITÓRIA, M. A. A. Infecção pelo HIV/AIDS no 39ª Conferência Intercientífica sobre Agentes Antimicrobianos e Quimioterápicos (ICAAC): poucos avanços e muitas controvérsias. *Cobertura de Congressos*, disponível em: <http://www.hiv.org.br/internas_materia.asp?cod_secao=congresso&cod_materia=338>. Acesso em: 16 set. 2005.
6. NAVARRO, R. M. C.; MENDES-CORRÊA, M. C. J.; CAVALHEIRO, N. P.; BARONE, A. A. Clinical laboratory assesment of hepatitis C and HIV coinfected patients according to the antiretroviral therapy received. *Revista do Instituto de Medicina tropical São Paulo*, 47 (1): 13-17, 2005.
7. SAMPAIO, A. S.; MOURA, P. M. M. F.; CORREIA, J. B. Co-infecção HIV/HBV e HIV/HCV. *Âmbito Hospitalar*, ano XVIII, 177: 27-36, 2006.
8. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde - Programa Nacional de DST e Aids. Boletim Epidemiológico - Aids e DST. 14 (2). Brasília: Ministério da Saúde, 2001.
9. ZOCCATO, K. B. F.; CAIAFFA, W. T.; PROIETTI, F. A.; PROIETTI, A. B. C.; MINGOLI, S. A.; RIBEIRO, G. J. C. HCV and HIV infection and co-infection: injecting drug use and sexual behavior, AJUDE-Brasil I Project. *Caderno de Saúde Pública*, 22 (4), 1-13, 2006.
10. FOCACCIA, R.; SOUZA, F. V.; CONCEIÇÃO, O. J. G.; OLIVEIRA, U.; SANTOS, E. B.; BARALDO, D.; DIAMENT, D.; JUKEMURA, E. Hepatite Viral C: Tratamento. *Âmbito hospitalar*, ano XVI, 167, 2004.
11. BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. *Microbiologia médica*. 21 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2000, 611p.
12. MOTTA, V. T. *Bioquímica Clínica para o Laboratório: Princípios e Interpretações*. 4. ed. Porto Alegre, Editora Médica Missau, 2003, 419p.
13. HENRY, J. B. *Doenças Leucocitárias*. In: DAVEY, F. R.; HUTCHISON, R. E. *Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais*. 19 ed. São Paulo, Editora Manole Ltda, 1999, 1356p.
14. GOMES, A. P.; ESPERIDIÃO, A. V.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; GONÇALVES-REGO, T. C.; VELLOSO, R. B. V.; NUNES, E. R.; TOSTE, R. B.; SILVA, A. S. *Manifestações Hematológicas na Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS)*. *Prática Hospitalar*, 18 (176): 27-33, 2006.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Email: Karen Freitas Santos: kaka_fs@yahoo.com.br;
Daniela Bitencourt Rosa Leal: danibr1@terra.com.br



Com o
SBAC E-Learning
é assim:

Qualquer local
é a sua sala de aula!

www.sbac.org.br

Terapia de Reposição de Testosterona: A Polêmica

Testosterone replacement therapy

Dartora, D.R.¹; Nienow, D.¹; Baraldi, D.D.¹; Schneider, R.¹ & Lara, G.M.²

RESUMO - A terapia de reposição de testosterona (TRT) é uma opção de tratamento para a andropausa, porém, é evitada por ser historicamente associada com o surgimento de câncer de próstata (PCa) clinicamente detectável. Esta crença, suportada por mais de meio século, tem sido muito contestada ultimamente por possuir lacunas científicas importantes. O presente trabalho faz uma revisão da literatura recente e aborda as evidências que sustentam a prática e aplicação clínica de TRT e os novos estudos que procuram esclarecer qual a verdadeira relação de dependência entre crescimento do PCa e hormônios andrógenos.

PALAVRAS-CHAVE - Terapia de reposição de testosterona, andropausa, câncer de próstata.

SUMMARY - Testosterone replacement therapy (TRT) is a treatment option for andropause, although, it's avoided for being historically associated with the onset of clinical detectable prostate cancer (PCa). This belief, supported longer than half century, has been strongly challenged lately thanks to a lot of scientific shortcomings of great importance. The present review approaches the recent literature evidences which sustain the practice and clinical application of TRT and the new studies about the androgenic dependence on PCa growth.

KEYWORDS - testosterone replacement therapy, andropause, prostate cancer.

INTRODUÇÃO

O declínio dos níveis de testosterona plasmática em homens acima dos 50 anos é chamado de andropausa ou climatério masculino (MARKS *et al.*, 2006). Atribui-se à andropausa uma variedade de sintomas experimentados por pacientes idosos, incluindo fraqueza, fadiga, redução da massa e força muscular, redução da massa óssea, hematopoiese prejudicada, disfunção sexual, além de depressão e alterações do humor (SEIDMAN, 2007; MOLLE *et al.*, 2004). Existem trabalhos relatando que, com a progressão da idade, ocorre a redução do fluxo sanguíneo nos testículos, e redução significativa na síntese de testosterona (T). Concomitante a isso, ocorre a redução funcional do eixo hipófise-pituitária-gônadas (HPG), fazendo com que os níveis de T declinem tanto por mecanismos centrais (pituitária), quanto por mecanismos periféricos (testículos) (SEIDMAN, 2001).

A terapia de reposição de testosterona (TRT) mostrou-se eficaz em reverter a disfunção erétil e a falta de libido, além de trazer benefícios não sexuais, como sensação de bem estar, aumento da massa e força muscular, aumento da densidade mineral óssea, melhora do metabolismo da glicose e de marcadores da síndrome metabólica (MORGENTALER, 2007). O câncer de próstata é uma das patologias mais comuns em homens e os dados estatísticos sugerem um aumento em sua incidência, parte disso devido ao teste de triagem com dosagem do antígeno prostático específico (PSA) (SHANANI *et al.*, 2008).

Desde os pioneiros estudos de Huggins e Hodges, ganhadores do prêmio Nobel há aproximadamente 60 anos, a relação entre testosterona e câncer de próstata (PCa) tem sido detalhada extensivamente (SAROSDY, 2006).

Huggins *et al.* demonstraram a dependência androgênica do câncer de próstata. Desde então se acredita que níveis séricos aumentados de testosterona (T) causam aumento do PCa e que a suplementação com testosterona pode converter um câncer de próstata oculto a um câncer clinicamente detectável. Esta preocupação envolvendo PCa e testosterona conduziu à uma proibição pragmática contra terapia de reposição da testosterona (TRT) para qualquer homem diagnosticado com câncer de próstata independente do estado da doença.(MORGENTALER, 2007).

Os andrógenos são conhecidos por desempenhar um importante papel na hiperplasia prostática benigna. Estudos têm sugerido que o câncer de próstata oculto pode progredir rapidamente na presença de andrógenos exógenos; outros mostraram aumento nos níveis de PSA em homens sob terapêutica hormonal, não estando este associado ao câncer de próstata. (KATZ *et al.*, 2007)

A relação entre hormônios androgênicos e crescimento do tecido prostático é complexa já que a próstata não irá se desenvolver sem andrógenos e que a mesma irá atrofiar se o suporte androgênico for retirado. A hipótese hormonal continua sendo a mais importante na etiologia do PCa. (IMAMOTO *et al.*, 2008)

Ainda assim, a visão tradicional de que altos níveis de testosterona representam um fator de risco para PCa parece ter poucas evidências que a suporte (IMAMOTO *et al.*, 2008).

A HISTÓRIA

Desde que Huggins e Hodges demonstraram, em 1941, uma suposta interdependência existente entre a testosterona e o câncer de próstata, considera-se totalmente impróprio administrar testosterona exógena a qualquer paciente diagnosticado com câncer de próstata, independente de este ser hipogonadal ou não (RAJFER, 2008; THOMPSON *et al.*, 2003). Inúmeros estudos foram feitos ao longo destes sessenta anos relacionando o câncer de próstata com a testosterona, sendo que muitos destes conseguiram estabelecer e confirmar a dependência androgênica do tumor, aumentando a proibição acerca do assunto.

Martits *et al.* em 2005 demonstraram que não existe um consenso de que a reposição com testosterona exógena aumenta o risco de carcinoma de próstata em homens idosos.

Ainda que inúmeros argumentos suportem o conceito de que a testosterona exacerba o PCa, como: redução dos níveis de T até níveis encontrados na castração provocam regressão do tumor, deve-se observar evidências científicas para isso.

A POLÊMICA

A própria história natural do PCa imprime falhas à teoria de que a testosterona acelera o crescimento do mesmo, já que o câncer de próstata clínico raramente é encontrado

Recebido em 25/06/2008

Aprovado em 04/12/2009

¹Graduandos do curso de Biomedicina - Instituto de Ciências da Saúde - Centro Universitário Feevale - Novo Hamburgo - Rio Grande do Sul - Brasil

²Professor adjunto da Disciplina de Imunologia Clínica - Biomedicina - Instituto de Ciências da Saúde - Centro Universitário Feevale

em homens na segunda década de vida, quando os níveis de T se encontram nos valores mais altos. Inversamente, ele se torna altamente prevalente quando os homens são mais velhos e os níveis de T decaíram substancialmente. (MORGENTALER, 2007)

Morgentaler, também, sugeriu em seu recente trabalho de revisão sobre a terapia de reposição com testosterona que “se a testosterona realmente se comportasse como ‘gasolina para o fogo’ para o PCa, o esperado seria encontrar um número significativo de casos de PCa em homens extremamente jovens”. Além disso, este estudo discute a importância de elucidar qual a relação entre TRT e PCa, devido ao grande número de homens hipogonadais sintomáticos que seriam beneficiados com o uso clínico dessa terapia.

Fowler *et al.* questionaram, em 1981, “Se a castração promove a regressão do PCa, como é possível que a administração de T não promova a evolução do PCa?” Baseados em seus estudos, constataram que a estimulação sub-máxima da próstata ocorre em níveis fisiológicos de T, concebendo um modelo de saturação e sugerindo um platô da influência de T na atividade prostática. Esta teoria foi reforçada pelos resultados encontrados por Marks e colaboradores.

Um dos grandes dilemas enfrentados pelos urologistas que tratam pacientes com câncer de próstata é o que fazer quando estes se tornam hipogonadais. (RAFJER, 2008)

A reposição de testosterona está indicada quando a presença de sintomas sugestivos de deficiência androgênica for acompanhada por níveis de testosterona total abaixo de 300ng/dl e níveis de testosterona livre abaixo de 6,5ng/dl. (MARTITS *et al.*, 2005).

Wang *et al.* descreveram em seus estudos os benefícios a longo prazo associados com a TRT como: melhora da função sexual, aumento da massa muscular e densidade mineral óssea.

A saturação da testosterona no tecido prostático parece ser um ponto chave na discussão a respeito da terapia de reposição deste hormônio. A saturação para T no tecido prostático ocorre relativamente em baixas concentrações séricas porém dados da literatura demonstram que a TRT para homens hipogonadais causa o aumento no volume prostático até que fique pareado com homens eugonadais da mesma idade. (BEHRE *et al.* 1994; RHODEN *et al.* 2006)

Dados da literatura demonstram um aumento do volume prostático em homens normais, tratados com testosterona, com grande variação inter-individual e que o tamanho alcançado pela glândula após o tratamento é determinado também por polimorfismos genéticos no gene receptor do andrógeno. (NIESCHLAG *et al.*, 2004).

Rhoden *et al.* estudaram um grupo de pacientes que apresentava risco de desenvolvimento para PCa através de análises histológicas, que receberam a TRT durante um ano, e não encontraram grandes elevações no PSA ou no número de novos casos de câncer de próstata.

Outros dados da literatura demonstram que homens submetidos a uma prostatectomia, uma das alternativas terapêuticas para o câncer de próstata, que tem níveis de PSA imensuráveis em seu plasma podem seguramente ser tratados com testosterona exógena. (KAUFMAN *et al.*, 2004)

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os relatos indicam que a TRT pode ser usada com precaução e com acompanhamento em pacientes hipogonadais. Portanto, quando prescrita, um monitoramento cuidadoso da reposição para evitar a doença de próstata se faz necessário. Os achados de diversos estudos devem ser reproduzidos e

se confirmados, irão aumentar a crescente controvérsia sobre o questionável papel da T como “causadora” do PCa. (RAIJFER, 2008).

É de suma importância que mais investigações sejam realizadas sobre a relação de suposta interdependência entre testosterona e PCa, tanto clínica quanto cientificamente.

Elucidar e solver as dúvidas envolvendo as esferas da andropausa, TRT e PCa dará esperança aos muitos pacientes hipogonadais que poderiam se beneficiar do uso seguro da TRT.

REFERÊNCIAS

- Behre, H. M.; Bohmeyer, J.; Nieschlag, E. Prostate volume in testosterone-treated and untreated hypogonadal men in comparison to age-matched normal controls. *Clin. Endocrinol.* 40 (1): 341-49, 1994.
- Fowler, J. E.; Whitmore W. F. The response of metastatic adenocarcinoma of the prostate to the exogenous testosterone. *J Urol.* 126: 372-5, 1981.
- Imamoto, T; Suzuki, H; Yano, M; Kawamura, K; Kamiya, N; Araki, K; Komiya, A; Nihei, H; Naya, Y; Ichikawa, T. The role of testosterone in the pathogenesis of prostate cancer. *Int. J. Urol.* 15 (6): 472-80, 2008.
- Katz, A; Katz, A; Burchill, C. Androgen therapy: Testing before prescribing and monitoring during therapy. *Can Fam Physician.* 53: 1936-42, 2007.
- Kaufman, J. M; Graydon, R. J. Androgen replacement after curative radical prostatectomy for prostate cancer in hypogonadal men. *J. Urol.* 172 (3): 920-22, 2004.
- Marks, L. S; Mazer, N. A; Nostaghel, E; Hess, D. L; Dorey, F. J; Epstein, J. I; Veltri, R. W; Makarov, D. V; Partin, A. W, Bostwick, D. G; Macairan, M. L; Nelson, P. S. Effect of testosterone Replacement Therapy on Prostate Tissue in Men With Late -Onset Hypogonadism: a randomized controlled trial. *Jour. Amer. Medical. Associatio.* 19 (1): 296, 2006.
- Martits, M. A; Costa E. M. F. Benefícios e Riscos do Tratamento da Andropausa. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 51 (2): 61-74, 2005.
- Molle, A. C. M; Matheus, I. C. N; Lucena, J. R; Nunes, L; Oliveira, L. S; Franco, A. S. Fatores psicofisiológicos na terapia de reposição hormonal em homens. *World Wide Web:* <http://www.cienciasecognicao.org>. 3: 4-9, 2004.
- Morgentaler, A. Testosterone Replacement Therapy and Prostate Cancer. *Urol. Clin. N. Am.* 34 (1): 555-563, 2007.
- Nieschlag, E; Behre, H. M; Bouchard, P; Corrales, J. J; Jones, T. H; Stalla, G. K; Webb, S. M; Wu, F. C. W. Testosterone replacement therapy: current trends and future directions. *Human Reproduction Update.* 10 (5): 409-419, 2004.
- Raijfer, J. Testosterone Therapy in Men With Localized Prostate Cancer. *Rev. Urol.* 10 (1): 83, 2008.
- Rhoden, E. L; Morgentaler, A. Influence of demographic factors an biochemical characteristics on de prostate-specific antigen (PSA) response to testosterone replacement therapy. *Impot. Res.* 18: 201-5, 2006.
- Sarosdy, M. F. Testosterone Replacement for Hypogonadism After Treatment of Early Prostate Cancer With Brachytherapy. *Cancer.* 109: 536-541, 2007.
- Seidman, S. N. Testosterone deficiency and depression in aging men: pathogenic and therapeutic implications. *J. Gend. Specific. Med.* 4 (2): 44-8, 2001.
- Seidman, S. N. Androgens and the aging male. *Psychopharmacol. Bull.* 40 (4): 2005-18, 2007.
- Shanani, S; Braga-Basaria, M; Basaria, S. Androgen deprivation therapy in prostate cancer and metabolic risk for atherosclerosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93 (6): 2042-9, 2008.
- Thompson. C. A; Shanafelt, T. D; Loprinzi, C. L. Andropause: Symptoms management for prostate cancer patients treated whit hormonal ablation. *The oncol.* 8: 474-487, 2003.
- Wang, C; Swerdloff, R. S. Pratical aspects of testosterone substitution. *J. Endocrinol. Invest.* 28 (3): 109-11, 2005.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Dr. Ricardo Schneider Jr.
Rua Dr. Florêncio Ygartua, 491/13
CEP. 90430-010 Porto Alegre - RS

Avaliação da Atividade Antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcolólico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus**

Evaluation of the antimicrobial activity *in vitro* of the hydroalcoholic extract *Stryphnodendron adstringens* against of *Staphylococcus aureus* strains

Ferreira, Sávio Benvindo¹; Palmeira, Josman Dantas¹; Souza, Joely Holanda de¹; Almeida, João Maurício de¹; Figueiredo, Maria Cecília Pereira¹; Pequeno, Allamahac Silva¹; Arruda, Thúlio Antunes²; Antunes, Rossana Miranda Pessoa² & Catão, Raíssa Mayer Ramalho²

RESUMO - *Staphylococcus aureus* é um agente etiológico importante associado a infecções adquiridas, onde se destaca por sua frequência elevada e sua patogenicidade, e que foi capaz de desenvolver rapidamente resistência aos antibióticos, constituindo uma séria ameaça à saúde pública. As plantas têm sido uma fonte valiosa de produtos para manutenção da saúde humana e consideradas uma das melhores fontes para se obter uma variedade de drogas; entre elas, encontra-se o *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) que apresenta, entre outras ações, atividade antimicrobiana. A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de difusão em meio sólido, processo cavidade-placa e a Concentração inibitória mínima foi calculada considerando a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento bacteriano, após incubação à 37 graus Celsius, durante 24 horas. O extrato hidroalcolólico de barbatimão foi testado frente ao extrato bruto (100%) e nas diluições referentes as concentrações 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56% e 0,78%, onde foi observado que todas as cepas testadas foram sensíveis ao extrato, onde o maior halo de inibição de crescimento bacteriano foi de 22 mm, no extrato bruto (100%), e o menor de 8mm, na diluição de 1:64 (1,56%).

PALAVRAS-CHAVE - Atividade antimicrobiana, *Stryphnodendron adstringens*, *Staphylococcus aureus*.

SUMMARY - *Staphylococcus aureus* is an important causative agent associated with acquired infections, which is highlighted by their frequency and their high pathogenicity, and he was able to quickly develop resistance to antibiotics, and constitute a serious threat to public health. The plants have been a valuable source of products for maintenance of human health and considered one of the best sources to provide a variety of drugs, among them is the *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) which, among other actions, antimicrobial activity. The antimicrobial activity was determined by the method of dissemination in the midst solid, cavity-plate process and the minimum inhibitory concentration was calculated considering the lowest concentration of the extract can inhibit bacterial growth after hatching to 37 degrees Celsius for 24 hours. The extract hidroalcolólico of barbatimão was tested front of the crude extract (100%) and the dilution in concentrations 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.12%, 1.56% and 0.78 %, Where it was observed that all tested strains were sensitive to extract, where the largest halo of inhibition of bacterial growth was 22 mm in crude extract (100%) and less than 8mm in the dilution of 1:64 (1,56%).

KEYWORDS - Antimicrobial activity, *Stryphnodendron adstringens*, *Staphylococcus aureus*.

INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é um agente etiológico importante associado a infecções adquiridas, tanto na comunidade quanto em hospitais, e que se tornou um paradigma das infecções bacterianas; destaca-se por sua frequência elevada e sua patogenicidade que o capacita a produzir doenças tanto em indivíduos imunocomprometidos quanto em hígidos (MARK *et al.*, 2002); além de possuir uma alta versatilidade em adquirir resistência aos antimicrobianos, o que os tornou uma preocupação universal (RIBEIRO FILHO, 2000). Este microrganismo foi capaz de desenvolver rapidamente resistência aos antibióticos, tornando-se resistente à oxacilina, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), já na década de 60. Tal resistência pode ser carregada pelo cromossomo bacteriano ou por plasmídeo (FDA, 2002). Muitos fatores contribuem para o desenvolvimento da resistência bacteriana aos antimicrobianos, porém um dos principais é a exposição repetida a estas substâncias (CATÃO, 2006). É importante ressaltar que a descoberta de qualquer novo fármaco com atividade antimicrobiana vem acompanhada do aparecimento de resistência microbiana. E a

emergência disseminada de resistência adquirida aos antimicrobianos constitui uma séria ameaça à saúde pública.

As plantas têm sido uma fonte valiosa de produtos para manutenção da saúde humana, sendo mais difundidas especialmente nos últimos anos, após estudos com produtos terapêuticos de plantas medicinais, representando a principal matéria médica utilizada pelas chamadas medicinas tradicionais, ou não ocidentais, em suas práticas terapêuticas, sendo a medicina popular a que utiliza o maior número de espécies diferentes (HAMILTON, 2003).

Em geral, o conhecimento popular é desenvolvido por grupos culturais que ainda convivem intimamente com a natureza, observando-a de perto no seu dia-a-dia e explorando suas potencialidades, mantendo vivo e crescente esse patrimônio pela experimentação sistemática e constante (ELISABETSKY, 1997).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as plantas medicinais são consideradas como uma das melhores fontes para se obter uma variedade de drogas, e cerca de 80% da população mundial usa a medicina tradicional na busca de alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável (CAETANO *et al.*, 2002).

Recebido em 11/06/2008

Aprovado em 02/09/2009

¹Aluno do Curso de Farmácia/Universidade Estadual da Paraíba; Campus Universitário, 58109-753, Campina Grande-PB,

²Prof. do Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campus Universitário, 58109-753, Campina Grande-PB,

*Laboratório de microbiologia da Universidade Estadual da Paraíba. E-mail: saviobfarmacia@hotmail.com

O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto à civilização humana e, por um longo tempo, produtos minerais, animais e vegetais foram a principal fonte de fármacos (ESQUENAZI *et al.*, 2002). Atualmente, diversos fitoconstituintes já são conhecidos e estudos em modelos experimentais são empregados no sentido de entender suas atividades biológicas, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e dentre estes modelos encontra-se o de resistência bacteriana (MIYAKE *et al.*, 2004).

Diversas plantas são usadas na medicina popular (CAETANO *et al.*, 2002; ARNOUST *et al.*, 2005; GONÇALVES *et al.*, 2006; FOGGIO *et al.*, 2006;) e a espécie *Stryphnodendron adstringens* tem como principal princípio ativo o tanino e que, na medicina popular, dentre outras indicações terapêuticas, destaca-se como cicatrizante (COUTINHO *et al.*, 2004). *Stryphnodendron adstringens* é conhecido popularmente como barbatimão, mas também, recebe diversas denominações vulgares, que variam de região para região, como: abaramotemo, barba-de-timão, charãozinho-roxo, cascada-virgindade, além de possuir os seguintes sinônimos: Mimosa barba de timan Vellozo, *Acácia adstringens* Mart., *Stryphnodendron barbatiman* Mart., *Stryphnodendron barbadetiman* (Vellozo) Mart. (CAMARGO, 1985).

O Barbatimão é uma árvore hermafrodita, de pequeno porte, medindo entre 2 e 6m de altura, pertencente à família Leguminosae-Mimosaceae, de ampla distribuição no cerrado brasileiro, que se caracteriza por apresentar ramos com escassas folhagens, rica em substância taninosa. Seu fruto é uma vagem com endocarpo macio e fibroso de coloração escura, contendo varias sementes mais ou menos compridas e suas folhas são alternas e compostas. Sua casca é áspera e cheia de fissuras, sendo uma importante fonte de tanino, uma substância empregada no curtume de couros e no artesanato. Todavia, esta planta é mais conhecida na medicina popular, sendo amplamente utilizada como anti-séptico e bactericida, no tratamento de várias infecções cutâneas, além de ainda ser empregada no tratamento de gonorréia, leucorréia, hérnia, feridas hemorrágicas, diarreias, gastrite, dores de garganta, hemorróidas e em forma de gotas sua utilização para conjuntivite (ALMEIDA *et al.*, 1998; CRUZ, 1985; NUNES *et al.*, 2003; MACEDO, 2004).

Foi observado em testes com ratos que o grupo de animais em que foi empregada soluções de barbatimão a 1% apresentou uma ação antiedematosa superior no grupo que utilizaram a Clorhexidina a 0,12% (37,07% maior) e ainda maior no grupo – controle (45,11% maior) o que é da maior importância clínica terapêutica (COUTINHO, *et al.*, 2004). Em avaliações laboratoriais foi, testada a ação do extrato aquoso de barbatimão na concentração de 5% no crescimento micelial e esporulação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*, onde observou uma redução de 47,31% do tamanho das colônias e de 63,6% de esporulação comparada à testemunha mostrando a sua eficácia no combate ao "Mal do Panamá", causado pelo *F. oxysporum* f. sp. *Cubense* que se constitui num dos mais sérios problemas para a bananicultura (SILVEIRA, 2006)

Vários trabalhos têm sido desenvolvidos acerca da atividade biológica do barbatimão, dentre eles destacam-se a atividade tripanocida observada pela demonstração do efeito do extrato bruto etanólico do barbatimão sobre a parasitemia do *Trypanosoma cruzi* em camundongos infectados, ocorrendo uma redução significativa da parasitemia em relação ao grupo controle (HERZOG-SOARES *et al.*, 2002), e, um trabalho de bioprospecção para avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodendron*

adstringens, caracterizando que esta planta possui atividade antioxidante, nas regiões onde se encontram derivados tânica e antimicrobiana, dos extratos polares contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli* (SOUZA *et al.*, 2007).

Diante do descrito, o objetivo deste estudo foi de avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcolico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus* e determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do composto em estudo.

MATERIAIS E MÉTODOS

A parte experimental da pesquisa foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Estadual da Paraíba (LAC / UEPB), durante o período de setembro a novembro de 2007. A espécie vegetal foi selecionada, identificada e adquirida segundo Arruda (2001), pelos professores Thúlio Antunes de Arruda (Laboratório de Fitoterapia / UEPB) e Rossana Miranda Pessoa Antunes (Laboratório de Homeopatia / UEPB).

PREPARO DOS EXTRATOS

O extrato hidroalcolico do Barbatimão foi preparado seguindo-se as recomendações da Farmacopéia Brasileira (1959). Em seguida, foram preparadas diluições seriadas a partir do extrato bruto (100%), equivalente às concentrações de 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56% e 0,78% que foram mantidas estocadas em vidro âmbar, à temperatura ambiente.

AMOSTRAS BACTERIANAS

As 10 cepas de *S. aureus* de origem humana, utilizadas nesse trabalho, foram adquiridas, isoladas, identificadas fenotipicamente por métodos microbiológicos tradicionais e cedidas pelo Laboratório Diagnose – Campina Grande – PB. Para identificação destas cepas os testes bioquímicos utilizados foram: coagulase, fermentação do manitol e DNase. A cepa padrão *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi usada como controle de sensibilidade aos antimicrobianos.

SUSPENSÃO BACTERIANA E INÓCULO

A partir do crescimento em Agar Mueller-Hinton (BBL), após incubação 37°C / 24h, repicou-se de 2 a 4 colônias para 1 mL de solução salina (NaCl 0,85%) estéril, para obtenção uma turvação equivalente a da escala 0,5 de Mac Farland (BAUER *et al.*, 1966; TAVARES, 1984; DRUTZ, 1987; CHIN LU, 1971; CLEELAND, 1991).

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A determinação da atividade antimicrobiana do extrato de barbatimão sobre as cepas de *S. aureus* foi realizada pelo método de difusão em meio sólido, processo cavidade-placa (BAUER, *et al.*, 1966; CLSI, 2005; CATÃO *et al.*, 2005; CATÃO, *et al.*, 2006; CATÃO, 2007; ANTUNES, 2006; ARRUDA, 2001).

Para a realização do teste de difusão, as placas de Petri (90 x 15 mm), descartáveis, estéreis, foram inoculadas pela técnica de *pour plate*, nas quais inoculou-se 1,0 mL do inóculo bacteriano e em seguida, adicionou-se 25mL do ágar Mueller-Hinton fundido e resfriado a 45°C. O material foi homogeneizado girando-se a placa através de movimentos circulares. Após solidificação do meio, foram feitos em cada placa 6 cavidades de 6 mm cada, com o auxílio de

ponteiras descartáveis estéreis. Nessas cavidades, foram adicionados 50 µL do extrato em suas diferentes concentrações, incluindo o solvente utilizado na sua preparação, para ver se ele poderia interferir no resultado da atividade antimicrobiana.

As placas foram incubadas a 37°C / 24 horas e, após este período, os resultados foram notificados e considerados positivos aqueles em que houve inibição de crescimento bacteriano, produzindo halos de inibição de crescimento igual ou superior a 8mm de diâmetro (WONG-LEUG, 1988; SAKAR *et al.*, 1988; NAQVI *et al.* 1991; CATÃO, 2007). O resultado final foi determinado pela media aritmética dos halos de inibição. Considerou-se como CIM a menor concentração do extrato de barbatimão, capaz de inibir o crescimento da cepa bacteriana, após incubação a 37°C / 24h (FABRY, *et al.*, 1998; CONSENTINO, *et al.*, 1999; ALVES, 2006; CATÃO, 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado que todas as cepas de *Staphylococcus aureus* foram sensíveis ao extrato hidroalcolico de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão). Elas foram avaliadas frente ao extrato bruto (100%) e nas diluições referentes as concentrações de 50%, 25%, 12,5%, 6,25% 3,12% 1,56% e 0,78%. A determinação de atividade antimicrobiana do barbatimão foi observada até a concentração de 1,56%, onde constatou-se halos de inibição de crescimento de 8 e 9mm para todas as cepas analisadas (Tabela 1).

O Gráfico 1 apresenta a gradativa diminuição do tamanho médio dos halos de inibição de crescimento em função da redução da concentração do extrato de barbatimão.

Observou-se que o maior halo foi de 22mm e o menor de 8mm. Na concentração de 0,78% o extrato de barbatimão não formou um halo de inibição de crescimento bacteriano para nenhuma das cepas testadas, de modo que a CIM do extrato de *S. adstringens* foi determinada como sendo 1,56%, ou seja, a última concentração onde foi possível visualizar halos de crescimento bacteriano.

A Figura 2 mostra a ação antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcolico de *S. adstringens* frente a uma amostra de *S. aureus* e a ausência da interferência do álcool etanólico utilizado como diluente na preparação do extrato (cavidade central).

A resistência desenvolvida pelas bactérias frente aos antimicrobianos tem ocorrido com uma velocidade bem superior à descoberta de novos produtos capazes de um eficaz tratamento contra infecções, principalmente as bacterianas. Isso se deve, além de uma dinâmica habilidade de sofrer mutações e repassar aos seus descendentes, a uma terapia antimicrobiana não seguida ou pelo seu prescritor ou pelo paciente que a recebe o que dificulta sua eficácia e contribui para o aumento da pressão seletiva desenvolvida por estes microrganismos diante dos antibióticos o que gera uma maior taxa de mortalidade, morbidade e aumento de custos ao setor de saúde (COHEN, 1992; VIKSVEEN, 2003). Diante disso, os produtos naturais surgem como um caminho extremamente viável a descoberta de novos compostos já que grande parte já são utilizados a muitos anos pela população com baixo poder aquisitivo e que hoje o governo brasileiro inicia sua regulamentação através da Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos (CALIXTO, 2000; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Segundo Cowan (1999), 25% dos fármacos comercializados são originários de plantas, porém nenhum destes é usado como antimicrobiano, a grande maioria é usada como suplementos vitamínicos e dietéticos. A partir disso

nasce à necessidade de se pesquisar se esses compostos poderiam ser um auxílio na luta contra os microrganismos. A literatura refere-se ao extrato de *S. adstringens* por apresentar atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Bacillus subtilis* (ALVES *et al.*, 2000). Com relação à espécie de *S. aureus*, este trabalho demonstrou que o barbatimão apresentou uma notável atividade antimicrobiana estando este resultado em concordância com a literatura (ORLANDO, 2005; ALMEIDA *et al.* 1998).

Vários estudos já foram realizados com o barbatimão (GONÇALVES *et al.*, 2002; ORLANDO, 2005; ALMEIDA *et al.* 1998). Gonçalves *et al.* realizou um estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extrato de algumas árvores nativas, entre elas se testou o extrato hidroalcolico do *S. adstringens* a 10% (m/V) em várias bactérias incluindo o *S. aureus* apresentando halo de inibição de crescimento de 20 mm. Nesse estudo os halos encontrados, no extrato bruto foram equivalentes aos encontrados por Gonçalves *et al.*, 2002 em diluições mais baixas. Isso se deve, provavelmente, a variações da resistência das cepas testadas e/ou a parte da planta utilizada para o preparo do extrato.

Orlando (2005), mostrou que o extrato hidroalcolico de *S. adstringens* nas concentrações de 100mg/ml, 200mg/ml e 300mg/ml possui atividade antimicrobiana não somente ao *S. aureus*, mas também contra *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Kocuria rhizophila*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Shigella flexneri*.

É provável que a atividade antimicrobiana apresentada pelo extrato hidroalcolico de *S. adstringens* deva-se principalmente a seu alto teor de taninos encontrados em sua casca, os quais têm a capacidade de inibir adesinas e enzimas bacterianas e formar complexos com polissacarídeos e proteínas (Cowan, 1999).

TABELA I

Atividade antimicrobiana e CIM do extrato de barbatimão em diferentes concentrações frente a cepas de *S. aureus*

Nº. cepas testadas	Extrato bruto	Extrato hidroalcolico						
		50%	25%	Diluições (%V média dos halos (mm))			1,56%	0,78%
				12,5%	6,25%	3,12%		
ATCC 25923	18	16	15	14	13	11	8	0
1	17	15	14	13	12	10,5	8	0
2	18	17	16	14	13	10,5	8	0
3	22	19	17	14	11	10	8	0
4	20	18	17	15	12	11	9	0
5	19	18	17	15	12	10,5	9	0
6	18	17	15	14	12	10,5	9	0
7	17	16	14	13	11	10	9	0
8	19	17	15	13	11	9,5	8	0
9	18	17	15	14	11	9	9	0
10	18	16	14	13	12	9,5	8	0
Nº e (%) de cepas sensíveis		11(100%)	11(100%)	11(100%)	11(100%)	11(100%)	11(100%)	0 (0%)



figura1

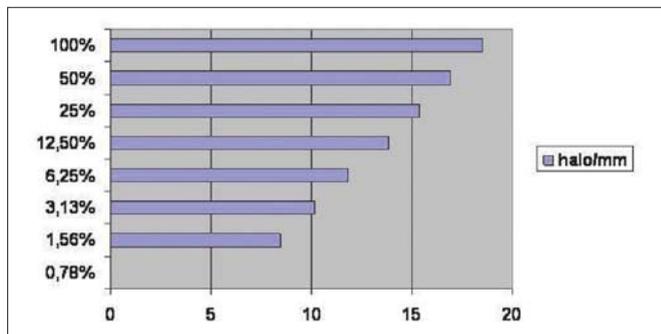


Figura 2

CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, concluiu-se que o extrato hidroalcolico do *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) apresentou atividade contra as cepas de *Staphylococcus aureus* analisadas, o que passe ser uma alternativa para o tratamento de infecções causadas por este microrganismo, visto que o barbatimão já esta sendo comercializado sob as formas de cremes, pomadas, sabonetes medicinais, pomadas, tinturas, entre outros.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. – Cerrado: Espécies vegetais úteis. Planaltina: EMBRAPACAPAC, 1998, p. 347 – 351.
- ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F.; SMÂNIA JUNIOR, A.; ZANI, C. L. – Biological screening of brasilian medicinal plants. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 95 (3), 367-373, 2000.
- ANTUNES, R. P. M.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; CAMARA, C. A.; ARRUDA, T. A.; CATÃO, R. M. R.; BARBOSA, T. P.; NUNES, X. P.; DIAS, C. S.; SILVA, T. M. S. – Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. Brazilian Journal of Pharmacognosy, João Pessoa, v.16, n.4, p.517-524, 2006.
- ARNOUST, A. H.; SANTOS, A. S.; BEINNER, R. P. C. – Plantas Medicinais de Uso Caseiro - Conhecimento Popular e Interesse por Cultivo Comunitário. Espaço para a Saúde, Londrina, 6 (2): 1-6, 2005.
- ARRUDA, Thulio Antunes de. Estudo etnofarmacobotânico e atividade antimicrobiana de plantas medicinais. 2001. 94 p. Dissertação de Mestrado Interdisciplinar em Saúde Coletiva – UEPB, Campina Grande.
- BAUER, A. N.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. – Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. American Journal of Clinical Pathology, Chicago, 45 (4), 493-496, 1966.
- CAETANO, N.; SARAIVA, A.; PEREIRA, R.; CARVALHO, D.; PIMENTEL, M. C. B.; MAIA, M. B. S. – Determinação da atividade antimicrobiana de extratos de planta de uso popular como antiinflamatório. Rev. Brás. Farmacog., 12: 132-135, 2002.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). Braz. J. Med. Biol. Res., 33: 179-189, 2000.
- CAMARGO, M. T. L. A. – Medicina popular. São Paulo: Almed, 1985.
- CATÃO, R. M. R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; ARRUDA, T.A.; ANTUNES, R. P. M. A. – Avaliação da atividade antimicrobiana de Riparinas sobre cepas de Staphylococcus aureus e Escherichia coli multirresistentes. Rer. Brás. Anal. Clín., 37 (4): 247-249, 2005.
- CATÃO, R. M. R.; ANTUNES, R. M. P.; ARRUDA, T.A.; PEREIRA, M. S. V.; HIGINO, J. S.; ALVES, J. A.; PASSOS, M. G. V. M.; SANTOS, V. L. – Atividade antimicrobiana “in vitro” do extrato etanolico de Punica granatum Linn. (romã) sobre cepas isolados ambulatoriais de Staphylococcus aureus. Rev. Bras. Anal. Clin., 38(2): 111-114, 2006.

- CATÃO, R. M. R. Atividade antimicrobiana e efeitos biológicos d3eriparinas sobre bactérias e fungos leveduriformes. 2007. 126 p. Tese de Doutorado - UFPB, João Pessoa.
- CHIN LU, Y. In vitro study of pyrrolnityn. J. Am. Med. Assoc., Chicago, 70(8), 19-22, 1971.
- CLEELAND, R.; SQUIRES, E. - Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections in: LORRIAN, V. Antibiotics in laboratory medicine. 3 ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1991. 739-788 p.
- CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUT – CLSI. – Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada - 8ª ed. M2-A8. 23 (1). Substitui a Norma M2-A7, 20 (1), 2005.
- COHEN, M. L. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. Science, 257 (11), 1050-1055, 1992.
- CONSENTINO, S.; TUBEROSO, G.; PISANO, B.; SATTA, M.; MASCIA, V.; ARZEDI, E.; PALMAS, F. - In vitro antimicrobial activity and chemical composition of sardinian thymus essential oils. Letters in Applied Microbiology Reviews, 12(4): 564-582, 1999.
- COUTINHO, H.; PINTO, D. S.; RIBEIRO, J. E. G.; FRIEDMAN, H. – Ação antiedematosa do Stryphnodendron barbadetiman (Barbatimão) a 1 por cento em comparação com a clorhexidina a 0, 12 por cento. Rev. odonto ciênc.,19 (45):201-206, 2004.
- COWAN, M.M. – Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews, 12(4), 564-582, 1999.
- CRUZ, G. L. – Dicionário das plantas úteis do Brasil. 3ed. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira, 1985.
- DRUTZ, D. J. - In vitro antifungal susceptability testing and measurement of levels of antifungal agents in body fluids. Rev. Infect. Dis., 9(2): 411-415, 1987.
- ELISABETSKY, E. – Etnofarmacologia de algumas tribos brasileiras. In: RIBEIRO, Darcy (Ed.) Suma Etnológica Brasileira. Petrópolis, Rio de Janeiro, Vozes, 1997. v.1.
- ESQUENAZI, D.; Wigg, M. D.; Miranda, M. M.; Rodrigues, H.M.; Tostes, J. B.; Rozental, S.; Silva, A. J.; Alviano C. S. - Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from Cocos nucifera Linn. (Palmae) husk fiber extract. Res Microbiol., 153: 647-652, 2002.
- FABRY, W.; OKEMO, P. O.; ANSORG, R. - Antibacterial activity of east African medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology, 60: 79-84, 1998.
- FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. – Plantas Medicinais Como fontes de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. Multiciência (UNICAMP), 7, 2006.
- FOOD AND DRUG ASSOCIATION – Antimicrobial resistance: a growing threat. Disponível em <www.fda.gov > Acesso dia 17 de Setembro de 2002.
- GONCALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. – Efeitos antimicrobianos de algumas árvores medicinais nativas nas conjuntivites infecciosas. O Biológico, 68: 134, 2006.
- HAMILTON, A. – Medicinal plants and conservation: issues and approaches. International Plants Conservation Unit, WWF-UK, 2003.
- HERZOG-SOARES, J. D.; ALVES, R. K.; ISAC, E.; BEZERRA, J. C. B.; GOMES, M. H.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H. – Atividade tripanocida in vivo de Stryphnodendron adstringens (barbatimão verdadeiro e Carocar brasiliensis (pequi)). Rev. Brás. Farmacog., 2: 1010, 2002.
- MACEDO, F. M.; MARTINS, G. T.; RODRIGUES, C. G.; OLIVEIRA, D. A. de – Triagem Fitoquímica do Barbatimão [Stryphnodendron adstringens (Mart) Coville]. Rev. Bras. Bioc., 5 (2): 1166-1168, 2007.
- MARK, C. ENRIGHT, M., ROBINSON, A.; RANDLE, G.; FEIL, E.; GRUNDMANN, H.; SPRATT, B. - The evolutionary history of methicillin-resistat Staphylococcus aureus (MRSA). PNAS, 99: 7687-7698, 2002.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. 1ª ed. Brasília, 2006.
- MIYAKE, M. A.; CANNIELLO, M.; BALBANI, A. P. S.; BUTUGAN, O. – Inquérito sobre uso de plantas medicinais para tratamento de afecções otorrinolaringológicas entre pacientes de um hospital público terciário. São Paulo, Caderno de Debates da RBORL, 70: 43-55, 2004.
- NAQVI, S. H.; KILIAN, M. S. Y.; VOHORA, S. B. Anti-bacterial, anti-fungal and antihelminthic investigations on Indian medicinal plants. Fitoterapia, SãoPaulo, 62 (3): 221-228, 1991.

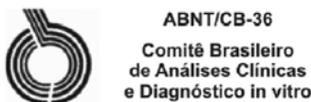
- NUNES, G. P.; SILVA, M. F.; RESENDE, U. M.; SIQUEIRA, J. M. de – Plantas Mediciniais comercializadas por raizeiros no centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Ver. Bras. Farmacog., 13 (2): 83-92, 2003.
- ORLANDO, S. C. – Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico bruto da casca do *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (Barbatimão). 2005. 88 p. Dissertação de Pós - Graduação – Universidade de França, França.
- RIBEIRO FILHO, N. – Resistência bacteriana aos antibióticos. In Fernandes AT, Fernandes MOV, Ribeiro Filho N. Infecção hospitalar e suas interfaces na área de saúde. São Paulo (SP): Atheneu, 2000.
- SAKAR, M. K.; TAMER, A. V.; TOKOUR, S. - Antimicrobial activities of some *Hypericum* species growing in Turkey. Fitoterapia, 59 (1): 49-52, 1988.
- SILVEIRA, E. K. C. P.; XAVIER, A. A.; RIBEIRO, R. C. F.; MIZOBUTSI, E. H.; SANTOS, M. G.; AGUIAR, F. M. – Avaliação de extrato de mamona no crescimento e esporulação de *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense.. In: XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2006, Salvador. Anais do XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Brasília : SBF, 31: 358-358, 2006.
- SOUZA, T. M.; SEVERI, J.A.; SILVA, V.Y.A.; SANTOS, E.; PIETRO, R.C.L.R. – Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl., 28 (2), 221-226, 2007.
- TAVARES, W. - Manual de Antibióticos. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1984, 374 p.
- VIKSVEEN, P. – Antibiotics and the development of resistant microorganisms. Can homeopathy be an alternative? Journal of homeopathy, 92: 99-107, 2003.
- WONG-LEUNG, Y. L. Antimicrobial activities of some Hong-Kong plants used in chinese medicine. Fitoterapia, 69 (1): 11-16, 1988.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Sávio Benvindo Ferreira
 Rua João Julião Martins 375/102
 CEP. 58109-090 Campina Grande - PB



A Sociedade Brasileira de Análises Clínicas patrocina e promove os seguintes programas e produtos:



Asociación Mercosur de Normalización



Participe você também. Associe-se! www.sbac.org.br

Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos hidroalcolóico de angico sobre cepas de *Staphylococcus aureus**

Evaluation of the antimicrobial activity *in vitro* and determination of minimum the inhibitory concentration (MIC) of hidroalcoholic extracts of angico in strains *Staphylococcus aureus*

Palmeira, Josman Dantas^{*1}; Ferreira, Sávio Benvindo¹; de Souza, Joelly Holanda¹; de Almeida, João Maurício¹; Figueiredo, Maria Cecília¹; Pequeno, Allamahac Silva¹; Arruda, Thúlio Antunes²; Antunes, Rossana Miranda Pessoa² & Catão, Raïssa Mayer Ramalho²

RESUMO - Plantas medicinais com propriedades antimicrobianas juntamente com a problemática da resistência microbiana são de grande relevância, principalmente em países em desenvolvimento, são uma ótima alternativa para investimentos em pesquisas, pois apontam para o uso de novos antibióticos que sejam eficazes diante dos patógenos emergentes. O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcolóico da *Anadenanthera macrocarpa* (angico) e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) sobre amostras de cepas de *Staphylococcus aureus* de origem humana. A atividade antimicrobiana e a CIM do extrato do angico frente a cepas de *S. aureus* foi determinada por difusão em placa com Ágar Mueller-Hinton usando o método de pour plate. Após solidificação do inóculo (1mL) adicionado ao ágar (25mL) foram feitas cavidades de 6 mm, preenchidas com 50 µL do extrato. Foram testadas 10 amostras de *S. aureus*, e a atividade foi determinada pela presença do halo de inibição igual ou superior a 8 mm. Todas as amostras mostraram-se sensíveis à ação do extrato de angico, com halos de inibição variando de 19 a 25 mm. O extrato hidroalcolóico do angico, apresentou atividade antimicrobiana e CIM de 3,12% (1:32) para todas as cepas de *S. aureus* testadas.

PALAVRAS-CHAVE - Atividade antimicrobiana, Angico, *Staphylococcus aureus*

SUMMARY - Medicinal plants with antimicrobial properties together with the problematic one of the microbial resistance are of great relevance, mainly in developing countries, are an excellent alternative for investments in research, therefore they point with respect to the antibiotic use new that is efficient ahead of the emergent pathogens. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity *in vitro* of the hidroalcoholic extract of *Anadenanthera macrocarpa* (angico) and determination of the minimum inhibitory concentration (CIM) on samples of strains of *Staphylococcus aureus* of origin human being. The antimicrobial activity and the CIM of the extract of the angico front strains of *S. aureus* plate was determined by diffusion in plate with Mueller-Hinton Agar having used the method of pour. After solidification of I inoculate it (1mL) added to the agar (25mL) had been made socket of 6 mm, filled with 50 µL of the extract. 10 samples had been tested of *S. aureus*, e the activity was determined by the presence of the halo of the 8 equal or superior inhibition mm. All the samples had revealed sensible to the action of the angico extract, with halos of inhibition varying of 19 the 25 mm. The hidroalcoholic extract of the angico, presented antimicrobial activity and CIM of 3,12% (1: 32) for all strains of *S. aureus* tested.

KEYWORDS - Antimicrobial activity, Angico, *Staphylococcus aureus*

INTRODUÇÃO

A pesquisa de extratos vegetais com ação antimicrobiana se apresenta como uma saída para o combate aos microrganismos, em razão do grande aumento da resistência de microrganismos patogênicos a múltiplas drogas, devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos, levando assim à procura dessas novas alternativas terapêuticas (2, 6, 23, 24, 25). Além disso, é também um modelo ecologicamente correto de produção de substâncias que sejam eficazes e menos agressivas tanto para o meio ambiente como para o homem, contribuindo assim para uma melhor qualidade de vida (10).

As plantas medicinais estão dentre os produtos naturais de grande interesse científico, devido à possibilidade de empregá-las como fitofármacos, por proporcionarem grandes chances de obterem-se moléculas protótipos, devido à diversidade de seus constituintes (13, 19, 21, 22, 27).

Quanto a sua descrição botânica, o Angico (*Anadenanthera macrocarpa* Benth) pertencente à família Leguminosae, subfamília Mimosoideae, trata-se de uma árvore de grande porte, medindo entre 4 a 5m de altura; seu caule e ramos

possuem casca castanho-avermelhada, armados e com espinhos agudos. Suas folhas são alternas, compostas, bipinadas, com 8 a 15 cm de comprimento; as inflorescências se apresentam em panículas de espigas globosas; suas flores diminutas são andrógenas; o seu fruto é um legume rígido, glabro, achatado, deiscente de cor marrom; suas sementes são de 5 a 10, subelípticas, lisas e escuras (1).

Quimicamente é constituído por: alcalóides indólico (óxido de N, N-dimetiltriptamina); esteróides (palmitato de δ -sitosterol e δ -sitosterol); flavonóides (3,3',4',7,8-pentahidroflavona); triterpenóides (lupenona e lupeol); derivados fenólicos (3,4,5-dimethoxidalbergiona, dalbergiona e kuhlmannia) (1). Na medicina popular, o angico, vem sendo utilizado de diversas formas, dentre elas, o decocto da casca (na preparação de xaropes), usado no tratamento das tosse, coqueluches e bronquites; a maceração da casca, utilizada no tratamento de inflamações e leucorréias e quando a preparação é com álcool ou cachaça, pode ser utilizada em ferimentos externos, agindo como hemostático e cicatrizante (20). Segundo Desmachelier (11), extratos metanólicos do angico demonstraram atividade antioxidante frente a radicais livres. Entretanto, segundo Agra (1), os frutos do angico

Recebido em 27/05/2008

Aprovado em 02/09/2009

¹Aluno do Curso de Farmácia/Universidade Estadual da Paraíba; Campus Universitário, 58109-753, Campina Grande-PB,
²Prof. do Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campus Universitário, 58109-753, Campina Grande-PB

co são considerados venenosos, o que inviabiliza a sua utilização na medicina popular para enfermidades.

Staphylococcus aureus, são cocos Gram-positivos, imóveis, não produtores de esporos, catalase positiva, que tendem a formar agrupamentos irregulares semelhantes a cachos de uva e que podem eventualmente ser encontrados em diversos espécimes clínicos. São amplamente distribuídos na natureza e fazem parte da microbiota normal da pele e mucosas dos mamíferos e aves. São facultativos quanto à respiração e pouco exigentes nutricionalmente. Crescem no Agar Manitol Salgado, e são ativos metabolicamente, fermentando carboidratos e produzindo pigmentos que variam do branco ao amarelo forte (17, 33).

É considerado um patógeno importante para os seres humanos, sendo responsável por diversos processos infecciosos tanto de origem comunitária quanto hospitalar sendo, conseqüentemente, a espécie mais extensivamente estudada (34). É o agente causador mais comum de infecções piogênicas. Estas infecções podem se localizar na pele ou em regiões mais profundas do organismo. Quando presentes na pele essas podem causar diversas doenças, diferenciadas pela localização e por outras características. Em indivíduos debilitados, esse microrganismo pode causar infecções de caráter bem mais grave (17). Além das infecções piogênicas, o *S. aureus* pode causar vários tipos de intoxicações, seja na vigência de um processo infeccioso ou não (34).

Os portadores de *S. aureus* desempenham um papel importante na epidemiologia e patogênese da infecção. Cerca de 20% dos indivíduos sadios, são portadores assintomáticos enquanto que, grande parte da população (60%) alberga linhagens que mudam com frequência variável, sendo chamados de portadores intermitentes e 20% das pessoas raramente albergam qualquer tipo de linhagem. Os portadores de *S. aureus* têm sido identificados como importantes fatores de risco para infecções em pacientes cirúrgicos, os que fazem hemodiálise ou ainda, aqueles portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV). A presença de *S. aureus* em animais sadios também é de grande importância no campo da saúde pública como no da saúde animal (31).

A infecção por estafilococos geralmente é o resultado da combinação de fatores de virulência bacteriana com a capacidade de sobrevivência do microrganismo em condições adversas: os constituintes da parede celular, a produção de enzimas e toxinas que promovem a invasão tissular, a capacidade de persistir no interior das células e o seu potencial de adquirir resistência aos agentes antimicrobianos associados à diminuição da defesa do hospedeiro (18). Além da vasta resistência aos mais diversos antimicrobianos o *S. aureus* pode ainda apresentar resistência a íons metálicos e biocidas. A multirresistência do *S. aureus* resulta de vários fatores, dentre eles, a presença de plasmídeos, geralmente em múltiplas cópias, de mutações cromossômicas e de elementos transponíveis (34).

A análise da resistência estafilocócica a agentes antimicrobianos tem revelado alguns mecanismos bioquímicos, tais como a inativação do agente antimicrobiano por enzimas, modificando ou hidrolisando os agentes; alterações nos receptores alvos por aquisição de um alvo novo com reduzida afinidade para o antimicrobiano; aquisição de enzimas convertendo o alvo nativo, ou mutação de genes codificando este alvo e acesso limitado dos antimicrobianos, principalmente pela atividade de efluxo do antibiótico (26). Os antimicrobianos são um importante fator seletivo para o desenvolvimento de resistência bacteriana tanto cromossomal quanto plasmidial. O uso inadequado de antimicro-

bianos seja em pacientes ambulatoriais ou hospitalares não é um dos principais fatores de aumento da resistência, por não ser capaz de destruir bactérias intrinsecamente resistentes e/ou que adquiriram resistência cromossômica, aumentando assim o surgimento e a manutenção de resistência a drogas. Do ponto de vista epidemiológico, a resistência mediada por plasmídeos é mais importante, por ser transmissível e pode estar associada a outras propriedades que permitam a um microrganismo colonizar e invadir um hospedeiro sensível (4).

Associando-se aspectos como patogenicidade bacteriana, resistência microbiana, incidência de acometimento do patógeno na população, utilização da medicina popular, condição monetária da população, dentre outros aspectos, torna-se substancialmente importante a viabilização de estudos e experimentos que colaborem com a medicina popular, no combate aos microrganismos.

O objetivo desse estudo foi determinar a atividade antimicrobiana e a Concentração Inibitória Mínima (CIM) *in vitro* do extrato hidroalcolólico de *Anadenanthera macrocarpa* (Angico) frente a cepas de *S. aureus* de origem humana.

MATERIAIS E MÉTODOS

A parte experimental da pesquisa foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), durante o período de setembro a novembro de 2007.

A espécie vegetal foi selecionada, adquirida e identificada pelos professores Thúlio Antunes de Arruda (Laboratório de Fitoterapia) e Rossana Miranda Pessoa Antunes (Laboratório de Homeopatia) que prepararam o extrato hidroalcolólico do angico, seguindo as recomendações da Farmacopéia Brasileira 2º ed. (1959).

TABELA I
Equivalência entre as diluições e concentrações do extrato testado

DILUIÇÃO	CONCENTRAÇÃO (%)
1/1	100*
1/2	50
1/4	25
1/8	12,50
1/16	6,25
1/32	3,12
1/64	1,56
1/128	0,78

Legenda:* Extrato Bruto

MICRORGANISMOS TESTADOS

Foram utilizadas 10 cepas de *S. aureus* de origem humana, cedidas pelo Laboratório DIAGNOSE – Campina Grande – PB e previamente identificadas através de testes bioquímicos (coagulase, fermentação do manitol e DNase). A cepa padrão *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi usada como controle de sensibilidade aos antimicrobianos.

MEIOS DE CULTURA

O meio Agar Mueller-Hinton (BBL) foi utilizado para os ensaios de atividade antimicrobiana e preparado conforme instruções do fabricante, seguindo a distribuição de 25 mL por placa de Petri de 90 x 15 mm.

SUSPENSÃO BACTERIANA E INÓCULO

A partir do crescimento em Agar Mueller-Hinton, após incubação por 24 horas/37°C, repicou-se de 2 a 4 colônias

em 1 mL de solução salina 0,85% estéril, até obter uma turvação semelhante a da escala 0,5 de MacFarland para obter uma concentração final de 10^8 UFC/mL (7, 8).

DIFUSÃO EM MEIO SÓLIDO

Os testes de determinação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico do angico foi realizado pela técnica de *pour plate*, utilizando 1,0 mL do inóculo bacteriano, distribuindo-o em uma placa de Petri 90x15 mm previamente esterilizada, na qual adicionou-se 25 mL do ágar Mueller-Hinton fundido e resfriado a 45°C. O material foi homogeneizado girando-se a placa através de movimentos circulares. Após solidificação do meio, foram feitos, em cada placa, 6 cavidades de 6 mm cada, com o auxílio de ponteiros descartáveis estéreis. Nessas cavidades foram colocados 50 µL do extrato em suas diferentes concentrações, incluindo o solvente, para ver se ele poderia interferir no resultado da atividade antimicrobiana.

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

As placas foram incubadas 24h/37°C e após este período foram medidas, as zonas de inibição de crescimento (halos), em milímetros. A presença de halos com diâmetro ≥ 8 mm foi considerada como atividade antimicrobiana. O resultado final foi determinado pela média aritmética dos valores obtidos dos tamanhos dos halos (mm).

A CIM foi considerada como a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento bacteriano, (presença de halo de inibição de crescimento), após incubação por 24h/37°C (9, 14).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A resistência aos antimicrobianos tornou-se um dos grandes problemas de saúde pública do mundo contemporâneo a resistência progressiva tem despertado uma preocupação mundial, principalmente na busca contínua de novos antimicrobianos. O aumento de cepas resistentes a vários antimicrobianos tem se tornado comum, destacando-se o *S. aureus* como um dos agentes mais freqüentemente isolados em infecções humanas (36).

Os produtos naturais têm-se mostrado como uma excelente alternativa terapêutica, de modo que, o interesse por plantas com propriedades medicamentosas tem evoluído consideravelmente em todo o mundo (2, 6, 13, 15).

A tabela 2 apresenta a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcoólico do angico, observando-se sua eficácia em todas as cepas de *S. aureus* analisadas. Constatou-se que o maior halo obtido para o extrato bruto mediu 25 mm, (cepa 4), e o menor, mediu 19 mm de diâmetro, (cepas 6 e 9) e após diluições seriadas deste extrato, verificou-se um acentuado declínio no tamanho dos halos até que eles não mais se apresentassem, podendo-se então determinar o valor da concentração inibitória mínima (CIM) para cada cepa.

Todas as cepas apresentaram-se sensíveis desde o extrato bruto (100%) até a concentração 3,12%, que foi determinada como sendo a CIM, com halos que variaram entre 11 a 9 mm. Observou-se ainda, que o extrato de angico foi ativo até a concentração de 1,56%, em 50% das cepas (4, 5, 6, 7 e 8), apresentando halos de inibição de crescimento igual a 8 mm. Esses halos estão de acordo com os diâmetros pré-estabelecidos por Nascimento *et al.* (22); Wong-Leung (37); Sakar *et al.* (29), que consideram com atividade antimicrobiana todos os produtos que apresentam halos ≥ 8 mm. Segundo Bergey's Manual of Determinative Bacteriology

(16), o tamanho do halo está relacionado a diversos fatores que podem ocorrer devido à resistência específica de cada cepa, à difusão do extrato no meio de cultura, à composição dos princípios ativos de cada extrato e às peculiaridades dos mecanismos de ação destes, ainda pouco elucidados.

TABELA II
Apresentação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de angico frente a cepas de *Staphylococcus aureus*

Identificação das cepas	[Concentrações] / Diâmetro do Halo (mm)								Alcool a 70%
	100%*	50%	25%	12,50%	6,25%	3,12%	1,56%	0,78%	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	20	19	18	17	15	11	8	0	0
<i>S. aureus</i> 1	21	19	17	15	13	10	0	0	0
<i>S. aureus</i> 2	20	18	17	14	12	10	0	0	0
<i>S. aureus</i> 3	21	20	18	16	13	9	0	0	0
<i>S. aureus</i> 4	25	22	21	16	13	10	8	0	0
<i>S. aureus</i> 5	21	18	17	16	15	11	8	0	0
<i>S. aureus</i> 6	19	18	16	15	13	10	8	0	0
<i>S. aureus</i> 7	20	19	18	15	12	10	8	0	0
<i>S. aureus</i> 8	20	19	18	17	15	11	8	0	0
<i>S. aureus</i> 9	19	18	17	16	14	9	0	0	0
<i>S. aureus</i> 10	20	19	18	17	15	11	0	0	0
Nº (%) Total de Cepas Sensíveis = 10	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	5 (50%)	0 (0%)	0 (0%)

Legenda: * Extrato Bruto

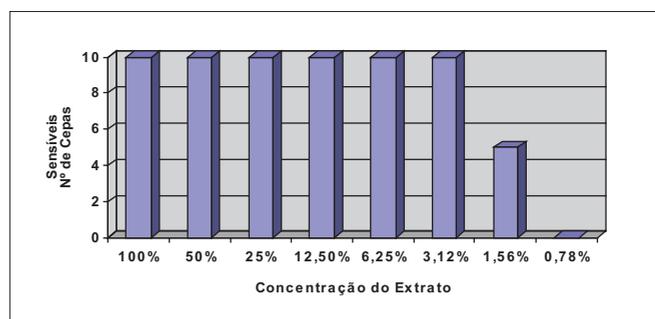


Figura 1 – Número de cepas de *S. aureus* sensíveis em relação às diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de Angico

Observou-se também que o solvente (álcool etílico a 70%) não interferiu na avaliação da atividade antimicrobiana, uma vez que quando testado sozinho não promoveu formação de halo de inibição de crescimento bacteriano para nenhuma das cepas.

A figura 1 apresenta o número de cepas de *S. aureus* sensíveis às diferentes concentrações do extrato de angico, constatando a eficácia desse extrato até a concentração de 3,12% para todas as cepas e até a concentração 1,56% para 50% das cepas.

A tabela 3 apresenta as CIMs do extrato hidroalcoólico de angico, para cada uma das cepas de *S. aureus*. De acordo com esses resultados, pode-se afirmar que a concentração de 3,12% é a ideal para essas cepas.

É importante registrar que a atividade antimicrobiana assim como a CIM difere, principalmente, quando se trata de microrganismos pertencentes a outros gêneros. Segundo Viana (35), o extrato de angico possui atividade antimicrobiana para *Salmonella* spp., apresentando CIM na concentração de 12,5% ou seja equivalente a diluição 1/8. Este fato provavelmente se deve às características dos microrganismos analisados, mostrando que não é pertinente a avaliação da atividade antimicrobiana de um produto, comparando-a ao comportamento de resistência e/ou sensibilidade entre bactérias Gram positivas e Gram negativas. Entretanto, apesar de relatos na literatura indicarem uma evidente atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico do angico, Gonçalves *et al.* (15), não comprovaram essa atividade frente às linhagens bacterianas por eles avaliadas. É provável que existam diferenças entre as espécies vegetais estudadas.

TABELA II
Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato de angico frente a cepas de *Staphylococcus aureus*

IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS	CIM
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1,56%
<i>Staphylococcus aureus</i> 1	3,12%
<i>Staphylococcus aureus</i> 2	3,12%
<i>Staphylococcus aureus</i> 3	3,12%
<i>Staphylococcus aureus</i> 4	1,56%
<i>Staphylococcus aureus</i> 5	1,56%
<i>Staphylococcus aureus</i> 6	1,56%
<i>Staphylococcus aureus</i> 7	1,56%
<i>Staphylococcus aureus</i> 8	1,56%
<i>Staphylococcus aureus</i> 9	3,12%
<i>Staphylococcus aureus</i> 10	3,12%

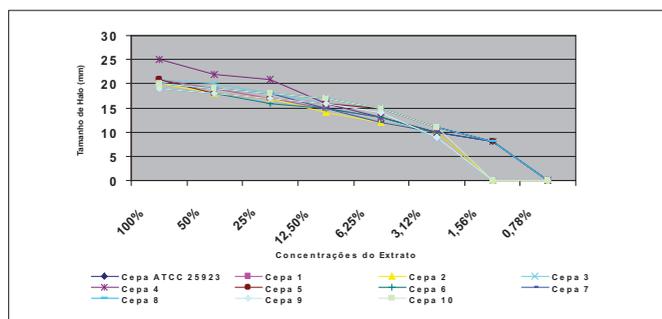


Figura 2 – Avaliação do declínio da atividade antimicrobiana do extrato de Angico, frente a cepas de *S. aureus*

Deste modo, considerando-se os resultados de Viana (35), é provável que os extratos de angico sejam mais eficazes frente a bactérias Gram positivas (*S. aureus*) do que a bactérias Gram negativas (*Salmonella* spp). O que se pode afirmar, no entanto, é que a CIM para *S. aureus* é bem menor do que para *Salmonella* spp.

A figura 2 mostra o declínio da atividade antimicrobiana do extrato de angico com suas diferentes concentrações, frente a cepas de *S. aureus*. É importante registrar que a determinação do tamanho dos halos de inibição de crescimento, sofre várias interferências entre elas, a difusibilidade dos produtos ainda em estudo, nos meios de cultura.

A figura 3 apresenta halos de inibição de crescimento, que variam de 25 a 9 mm, em função das diferentes concentrações utilizadas, 100%, 50%, 25,0%, 12,5%, 6,25% e 3,12%, sobre uma cepa de *S. aureus*.



Figura 3 – Representação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcolólico de angico em diferentes concentrações sobre *S. aureus*

CONCLUSÃO

Considerando a atividade antimicrobiana "in vitro" que o extrato hidroalcolólico de angico apresentou sobre as linhagens de *S. aureus*, neste estudo, sugere-se que mais pesquisas sejam realizadas visando conhecer o mecanismo de ação dessa substância assim como a determinação de sua potencialidade terapêutica através de estudos "in vivo", no sentido de encontrar métodos alternativos de controle de patógenos.

REFERÊNCIAS

- 1 - AGRA, M. de F. - Plantas da medicina popular dos cariris velhos (Paraíba - Brasil): espécies mais comuns. João Pessoa: União, 1996.
- 2 - ANTUNES R. M. P.; LIMA E. O.; PEREIRA M. S. V.; CAMARA C. A.; ARRUDA T. A.; CATÃO R. M. R.; BARBOSA T. P.; NUNES X. P.; DIAS C. S.; SILVA T. M. S. - Atividade antimicrobiana "in vitro" e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. Rev Bras Farmacogn 16: 517-524, 2006.
- 3 - ARRUDA, Thulio Antunes de. Estudo etnofarmacobotânico e atividade antimicrobiana de plantas medicinais. 2001. 94 p. Dissertação de Mestrado Interdisciplinar em Saúde Coletiva - UEPB, Campina Grande.
- 4 - BRODY; LARNER; MINNERMAN; NEU. Farmacologia Humana. 2º Ed. Rio de Janeiro: Editora Afiliada, 1997. p. 603-604.
- 5 - CATÃO, R. M. R. Atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de terpenos sobre bactérias e fungos leveduriformes. 2007. 126p. Tese de Doutorado - UFPB, João Pessoa.
- 6 - CATÃO, R. M. R.; ANTUNES, R. M. P.; ARRUDA, T.A.; PEREIRA, M. S. V.; HIGINO, J. S.; ALVES, J. A.; PASSOS, M. G. V. M.; SANTOS, V. L. - Atividade antimicrobiana "in vitro" do extrato etanólico de Punica granatum Linn. (romã) sobre cepas de isolados ambulatoriais de Staphylococcus aureus. RBAC, vol.38(2): 111-114, 2006.
- 7 - CHIN LU, Y. In vitro study of pyrrolnityn. J. Am. Med. Assoc., Chicago, 70(8), p. 19-22, 1971.
- 8 - CLEELAND, R.; SQUIRES, E. - Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections in: LORRIAN, V. Antibiotics in laboratory medicine. 3 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1991. p. 739-788.
- 9 - CONSENTINO, S.; TUBEROSO, G.; PISANO, B.; SATTI, M.; MASCI, V.; ARZEDI, E.; PALMAS, F. - In vitro antimicrobial activity and chemical composition of sardinian thymus essential oils. Letters in Applied Microbiology Reviews, 12(4): p. 564-582, 1999.
- 10 - DEOUX, S.; DEOUX, P. Ecologia é a Saúde: o impacto da deterioração do impacto na saúde. Lisboa: Instituto Piaget, 1998.
- 11 - DESMARCHÉLIER, C.; ROMÃO, R. L.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. - Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the 'Caatinga' region in northeastern Brazil. J Ethnopharmacol; 67(1):69-77, 1999.
- 12 - DRUTZ, D. J. - In vitro antifungal susceptibility testing and measurement of levels of antifungal agents in body fluids. Rev. Infect. Dis., 9(2): p. 411-415, 1987.
- 13 - DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; PEREIRA, B.; MAGALHÃES, P. M.; DELARMEILINA, C. - Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcolólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. Rev Bras Farmacogn, 14(Supl. 1): 6-8, 2004.
- 14 - FABRY, W.; OKEMO, P. O.; ANSORG, R. - Antibacterial activity of east African medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology, 60: p. 79-84, 1998.
- 15 - GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. - Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. Arq. Inst. Biol., v.72, n.3: p.353-358, 2005.
- 16 - HOLT, J. G. et al. Bergey's manual of determinate bacteriology. 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.
- 17 - JAWETZ, E.; MELNICK, L.; ADELBERG, A.; BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. - Microbiologia Médica. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

- 18 – JELJASZEWICZ, L.; MLYNARCZYK, G.; MLYNARCZYK, A. - Antibiotic resistance in gram-positive cocci. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.16: p.473-478, 2000.
- 19 – LIMA, M. R. F.; XIMENES, C. P. A.; LUNA, J. S.; SANTANA, A. E. G. - The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. *Rev Bras Farmacogn*, v.16: p.300-306, 2006.
- 20 – MATOS, F. J. de A. - O Formulário fitoterápico do professor Dias da Rocha: informações sobre o emprego na medicina caseira, de plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. 2. Ed. Fortaleza: EUFC, 1997.
- 21 – MICHELIN, D. C.; MORESCHI, P. E.; LIMA, A. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; PAGANELLI, M. O.; CHAUD, M. V. - Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. *Rev Bras Farmacogn*, v.15: p.316-320, 2005.
- 22 – NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. - Antibacterial activity of plants extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Braz J Microbiol*, v.31: p.247-256, 2000.
- 23 – NOVAIS, T. S.; COSTA, J. F. O.; DAVID, J. P. L.; DAVID, J. M.; QUEIROZ, L. P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A. M.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, R. R. - Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. *Rev Bras Farmacogn*, v.13(Supl. 2): p.5-8, 2003.
- 24 – OLIVEIRA, F. P.; LIMA, E. O.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P.; SOUZA, E. L.; SANTOS, B. H. C.; BARRETO, H. M. - Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. *Rev Bras Farmacogn*, v.16: p.510-516, 2006.
- 25 – OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O.; SILVA FILHO, R. N. - Interference of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on the anti-*Candida* activity of some clinically used antifungals. *Rev Bras Farmacogn*, v.17: p.186-190, 2007.
- 26 – PEDROSA, J. de M. C. - Estudo da viabilidade dos extratos etanólicos de *Barbatimão* e *Angico*, após estocagem por dois anos frente à cepas de *Staphylococcus aureus*. 2003. Tese de Conclusão de Curso - UEPB, Campina Grande.
- 27 – PESSINI, G. L.; HOLETZ, F. B.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V. - Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. *Rev Bras Farmacogn*, v.13(Supl. 1): p.21-24, 2003.
- 28 – SANTOS, S. DA C.; MELLO, J. C. P. de. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs). - *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2. Ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/URFSC, 2000. p. 517-544.
- 29 – SAKAR, M. K.; TAMER, A. V.; TOKOUR, S. - Antimicrobial activities of some *Hypericum* species growing in Turkey. *Fitoterapia*, São Paulo, v.59, n.1: p.49-52, 1988.
- 30 – SEELEY, H. W. Jr.; VANDEMARK, P. J.; Lee, J. J. *Microbes in action*. New York: W. H. Freeman & Company, 1991.
- 31 – SILVA, J. G. Atividade antimicrobiana do extrato do cajueiro (*Anacardium occidentale* Linn.) sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* de origem humana hospitalar e de origem animal. 2004. 39p. Tese de Conclusão de Curso – UPFB, João Pessoa.
- 32 – TAVARES, W. - *Manual de Antibióticos*. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1984. p.374.
- 33 – TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. - *Microbiologia*. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.
- 34 – TRABULSI, R.; ALTERTHUM; GOMPERTZ, F.; CANDEIAS, N. - *Microbiologia*. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p.149-153.
- 35 – VIANA, A. P. P. - Avaliação da atividade antimicrobiana de *Anadenanthera macrocarpa* e *Stryphnodendron coriaceum* frente a cepas de *Salmonella* spp. 2003. Tese de Conclusão de Curso - UEPB, Campina Grande.
- 36 – XU, Hong-Xi; LEE, F. Song Activity of plant Flavonoids Against Antibiotic-Resistant Bacteria. *Phytotherapy Research*, London, v.5: p. 39-43, 2001.
- 37 – WONG-LEUNG, Y. L. Antimicrobial activities of some Hong-Kong plants used in chinese medicine. *Fitoterapia*, São Paulo, v.69, n.1: p.11-16, 1988.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:
Tel.: (85) 88074337/32672798
*E-mail: josmandantasp@gmail.com

Acreditação de Sistema de Qualidade de Laboratórios Clínicos e de Organizações Prestadoras de Serviços de Saúde.



DICQ

Patrocinado pela
Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
SBAC

Instituição Acreditadora da
Organização Nacional de Acreditação

O mais completo organismo de acreditação de laboratórios clínicos da América Latina

Saiba mais. Acesse: www.dicq.org.br ou entre em contato conosco pelo telefone 21 2187-0822 acreditacao@dicq.org.br e acreditacaodicqona@dicq.org.br

Microalbuminúria: aviso de alerta às nefropatias diabéticas

Microalbuminuria: notice of alert to diabetics nephropathies*

Juliano Lacava Pereira¹, Alexandre Nabaes Ferreira², Diogo Gabriel³ & José Edson Paz da Silva⁴

RESUMO - A microalbuminúria foi inicialmente detectada na urina de pacientes diabéticos tipo 1 e foi definida como a excreção subclínica de albumina na urina que não é detectada pelos métodos convencionais. O objetivo desse trabalho foi comparar pacientes diabéticos com não diabéticos relacionando a microalbuminúria, creatinina urinária e relação microalbuminúria/creatinúria. Foram analisados 50 pacientes sendo 32 diabéticos e 18 não diabéticos provenientes da cidade de Caçapava do Sul no Rio Grande do Sul. Eles foram analisados em um laboratório local, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido e preencheram uma ficha contendo um questionário investigativo fechado. Para a estatística foi utilizado o teste t de Student e a correlação de Pearson, sendo utilizado $p < 0,05$ como índice de significância. Não houve diferença estatística entre os grupos quanto à creatinina urinária ($p = 0,25$). Entretanto, o índice de massa corporal foi maior no grupo de pacientes diabéticos ($p = 0,001$). A microalbuminúria foi maior nos pacientes diabéticos ($p = 0,013$). A correlação de Pearson entre o tempo de diabetes e a relação microalbuminúria/creatinúria foi fraca ($r = 0,099$). Assim, concluímos que o monitoramento da microalbuminúria e a redução do índice de massa corporal têm papel importante no prognóstico de doença microvascular.

PALAVRAS-CHAVE - Nefropatia diabética, microalbuminúria e imunoturbidimetria.

SUMMARY - Microalbuminuria was detected prior in urine of diabetic patients from 1 type and was called subclinical excretion of albumin in urine which don't detected through conventional the methods. The aim of this study was to compare diabetic patients whit non diabetic patients in the relationship between microalbuminuria, creatinuria and relation between them. We analyzed 50 patients being 32 diabetics and 18 non-diabetics from the city of Caçapava South in Rio Grande do Sul They were analysed in a laboratory site, signed a term of free and informed consent and filled out a form containing a questionnaire investigative closed. Results had been analyzed Student t test and Pearson correlation with $p < 0,05$ to significance rate. In study, did not have statistic difference between creatinina groups ($p=0,25$). However, IMC were increased in diabetic groups ($p=0,001$) as well as microalbuminuria ($p=0,013$). Pearson correlation between diabetes time and Malb/Crea relation was poor ($r=0,099$). Therefore study were important, however, the sampling must be increased to results for more consistent results.

KEYWORDS - Diabetic Nefropatia; microalbuminuria; imunoturbidimetria.

INTRODUÇÃO

A microalbuminúria foi inicialmente revelada em pacientes com Diabetes Mellitus do tipo 1 (DM1) e foi classificada como a excreção urinária de pequenas quantidades de albumina, a qual se encontra abaixo dos limites de sensibilidade dos métodos tradicionais de dosagens de proteínas. Isso pode auxiliar em um diagnóstico mais precoce de problemas renais como a nefropatia diabética (BOTTINI *et al.*, 2005).

A microalbuminúria é, entre outros, um sinal de alerta à nefropatia diabética (ND), surgindo devido a disfunções e lesões endoteliais na micro e na macrocirculação, estando presente em 30% dos pacientes diabéticos de meia idade. A nefropatia diabética acomete cerca de 35% dos indivíduos com DM1 e entre 10 a 40% daqueles com DM2 (JÚNIOR *et al.*, 2001; CRUZ *et al.*, 2003; CORRÊA *et al.*, 2006). Esta fração protéica denominada microalbuminúria, é utilizada para auxiliar no diagnóstico de enfermidades como microangiopatias, nefropatias, cardiopatias, neuropatias e retinopatias. A nefropatia ou síndrome nefrótica, é reconhecida pela acentuada excreção renal de proteínas séricas, principalmente albumina, devido ao aumento da permeabilidade glomerular e acomete de 20 a 30% dos pacientes com Diabetes Mellitus (COHEN *et al.*, 2001; BOELTER *et al.*, 2003; GUYTON & HALL, 2006).

Uma forma prática e simples de se realizar o rastreamento da ND incipiente é medir a excreção urinária de albumina

(EUA) em uma amostra de urina coletada ao acaso como, por exemplo, durante a consulta médica.

Valores de albumina entre 17mg/L e 174mg/L em amostra casual de urina exibem sensibilidade de 100% e especificidade de 79,6% para o diagnóstico de microalbuminúria (MURUSSI *et al.*, 2003). Em indivíduos diabéticos, a proteinúria revela uma nefropatia característica observada em cinco fases: na primeira, visualiza-se na ultrasonografia uma hipertrofia renal. A segunda caracteriza-se pelas alterações histológicas renais sem sintomas aparentes. Na próxima, surge a microalbuminúria e uma leve hipertensão arterial. Já na quarta fase, as manifestações da nefropatia são clinicamente detectáveis e nos exames laboratoriais encontra-se proteinúria, taxa de filtração glomerular diminuída e a maioria dos pacientes com hipertensão arterial (VALLADA, 1981). A quinta e última fase é a de insuficiência renal (IR), muitas vezes necessitando de diálise e, também, podendo levar a falência renal (PICCIRILLO *et al.*, 2002; VALLADA, 1981). Nos casos de IR crônica, em pacientes com DM1, atualmente, o transplante renopancreático simultâneo (SRP) é o melhor tratamento, pois tem o objetivo de reverter ou amenizar complicações secundárias dos pacientes com Diabetes como a ND (NICOLUZZI *et al.*, 2003). Tem sido demonstrado que as medidas das concentrações de albumina e creatinina em amostras isoladas de urina, admitindo o cálculo da relação entre elas, podem ser suficientes para o rastreamento e mesmo para a avaliação da eficácia de medidas adotadas para a redução da micro-

Recebido em 01/08/2008

Aprovado em 16/11/2009

*Pesquisa desenvolvida no Laboratório Saretta;

¹Biomédico Especialista em Análises Clínicas – SBAC;

²Farmacêutico-bioquímico Especialista em Biologia Molecular – ULBRA;

³Farmacêutico-bioquímico Mestre em Bioquímica Toxicológica – UFSM;

⁴Farmacêutico-bioquímico Doutor em Análises Clínicas – USP

albuminúria (ZANELLA, 2006). Podem ser usados valores para a relação albumina/creatinina (MALB/CREA) de 30 a 300 mg/g de creatinina (BOTTINI *et al.*, 2005). Em amostras minutadas de urina, 15 a 30% sofrem rejeição devido a erros de coleta segundo Shaw *et al.* (BOTTINI *et al.*, 2005). Para alguns autores, a dosagem de microalbuminúria em amostras isoladas de urina fornece o mesmo resultado da análise em urina de 24hs. A melhor avaliação é obtida quando a determinação é feita na primeira urina da manhã, evitando-se as variações diurnas que ocorrem com a atividade física (BOTTINI *et al.*, 2005; ZANELLA, 2006). De acordo com Zanella, 2006, atualmente, utilizam-se valores descritos na tabela 2 para rastreamento de nefropatia diabética:

TABELA I

	Normoalbuminúria	Microalbuminúria	Macroalbuminúria
Urina isolada	< 20 mg/ml	20 a 199 mg/ml	≥ 200 mg/ml
MALB/CREA	< 30 mg/g	30 a 299 mg/g	≥ 300 mg/g
Urina 24hs	< 30 mg	30 a 299 mg	≥ 300 mg
Urina 12hs	< 20 µg/min	20 a 199 µg/min	≥ 200 µg/min
Urina Overnight	< 15 µg/min	15 a 150 µg/min	≥ 150 µg/min

Fonte: Baseada em Zanella, 2006.

Um dos grandes motivos de prevenção da nefropatia diabética é o custo do tratamento do Diabetes Mellitus, que aumenta em 65% na nefropatia incipiente (fase de microalbuminúria), 195% na nefropatia clínica (fase de macroalbuminúria) e 771% na insuficiência renal terminal. A baixa disponibilidade da dosagem de microalbuminúria nos serviços de saúde pública limita a detecção precoce da nefropatia diabética (PASCOAL e JR., 1998; MURUSSI *et al.*, 2003; JÚNIOR *et al.*, 2001). A nefropatia diabética está associada à alta taxa de morbi-mortalidade perinatal e adulta, estando entre as mais freqüentes causas de insuficiência renal crônica em pacientes adultos (SANCHEZ *et al.*, 2003). Está comprovado que intervenções na fase de microalbuminúria seriam capazes de melhorar consideravelmente o prognóstico da ND (JÚNIOR *et al.*, 2001), ou mesmo, reverter determinada moléstia renal (CRUZ *et al.*, 2003). No tratamento da nefropatia diabética incipiente, são usados para controle da pressão arterial (P.A.), inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) (GROSS, 2003) ou bloqueadores dos receptores da angiotensina II (BRA), que devem manter a P.A. em níveis iguais ou inferiores a 130/80 mmHg (ZANELLA, 2006). Os IECA e os BRA produzem efeito renoprotetor, a medida que reduzem a P.A., a pressão intraglomerular e a permeabilidade da membrana glomerular, que são fatores determinantes da progressão da lesão renal (ZANELLA, 2006). "A hipertensão pode exacerbar a lesão dos glomérulos e dos vasos sanguíneos renais, sendo uma das principais causas de doença renal terminal. Por outro lado, anormalidades da função renal podem causar hipertensão. Assim, a relação entre hipertensão e doença renal pode em certos casos gerar um círculo vicioso: a lesão renal primária leva a aumento da pressão sanguínea que, por sua vez, causa mais dano aos rins, aumentando ainda mais a pressão sanguínea e, assim por diante, até que se desenvolva doença renal terminal (GUYTON & HALL, 2006)." Dietas hipoprotéicas têm sido úteis em modificar de forma favorável a evolução da ND, desacelerando a perda da função renal. O papel específico das modificações da dieta no tratamento da nefropatia diabética ainda não está completamente esclarecido, porém dados recentes demonstraram efeitos benéficos de algumas intervenções dietéticas, como a restrição protéica da dieta na progressão da ND e a retirada da carne vermelha

da dieta nos níveis de EUA. Existem evidências de que não apenas a quantidade, mas também o tipo de proteína ingerida está associado com a ND (MELLO *et al.*, 2005). A tabela 2 ilustra as principais intervenções e metas no prognóstico da nefropatia diabética:

TABELA II

Intervenções	Metas
Controle da pressão arterial	< 120 x 70 mmHg
Controle glicêmico	Hemoglobina glicosilada < 7%
Correção da dislipidemia	Colesterol LDL < 100 mg/dl
Dieta hipoprotéica	Proteinúria < 0,3 g/24hs

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar pacientes diabéticos e não diabéticos com relação à microalbuminúria; e os específicos foram: verificar se há discrepância entre a excreção urinária de creatinina dos pacientes diabéticos e do grupo controle utilizando a reação de Jaffé, comparar os índices de massa corpórea dos diabéticos com os não diabéticos, avaliar a prevalência da microalbuminúria entre os diabéticos e o grupo controle pelo método de imunoturbidimetria utilizando primeira urina da manhã, conferir uma possível relação entre o tempo de Diabetes e a relação Malb/Crea e verificar se o grupo em estudo (diabéticos) está se privando da ingestão de carne vermelha, a qual aumenta os níveis de albuminúria.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram selecionados 50 pacientes, sendo trinta e dois diabéticos (20 mulheres e 12 homens) e dezoito não diabéticos (06 mulheres e doze homens). Os pacientes foram selecionados nos postos de saúde do SUS (sistema único de saúde) e em clínicas médicas da cidade de Caçapava do Sul – RS e orientados por seis médicos da mesma cidade, a receberem instrução de coleta e frascos estéreis no Laboratório Sarett. Nas amostras de urina, determinou-se a microalbuminúria e a creatinina urinária, permitindo o cálculo da relação Microalbuminúria/Creatinúria (Malb/Crea). Para constituir o grupo controle foram usados os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

PACIENTES NÃO DIABÉTICOS - Critérios de inclusão: pacientes não diabéticos, com idade entre 18 e 75 anos, independente da etnia e do sexo, que apresentassem em seu histórico médico taxas de glicemia, creatinemia e pressão arterial normais. Critérios de exclusão: indivíduos que executaram esforço físico e/ou verificaram que estavam com febre no período de 48 horas prévias à coleta. Pacientes com quaisquer patologias ou suspeita de patologias.

PACIENTES DIABÉTICOS - Critérios de inclusão: foram selecionados pacientes diabéticos (independente do tipo), entre 18 e 75 anos de idade que apresentaram em seus históricos médicos taxas de glicemia acima de 170 mg/dl, creatinemia igual ou superior a 1,5 mg/dl e hipertensão arterial. Critérios de exclusão: indivíduos que executaram esforço físico e/ou verificaram que estavam com febre no período de 48 horas prévias à coleta. Pacientes com outras patologias que não o Diabetes.

O teste de microalbuminúria foi executado no aparelho *BEHRING TURBITIMER SYSTEM* da Dade Behring, pelo método de imunoturbidimetria, com reativos do mesmo fabricante. A microalbuminúria foi diagnosticada isolada e através da relação Malb/Crea, que possibilita a correção da albuminúria para amostras isoladas de urina, com valores entre 30 e 300 mg/g (BOTTINI *et al.*, 2005). Já a creatinúria foi dosada no aparelho *METROLAB 2300 PLUS* da

Wiener, através da reação de Jaffé modificada. Os dados foram analisados com o programa SPSS for Windows e foram realizados o teste T de Student e a correlação de Pearson para alguns dados usando $p < 0,05$ para significância.

RESULTADOS

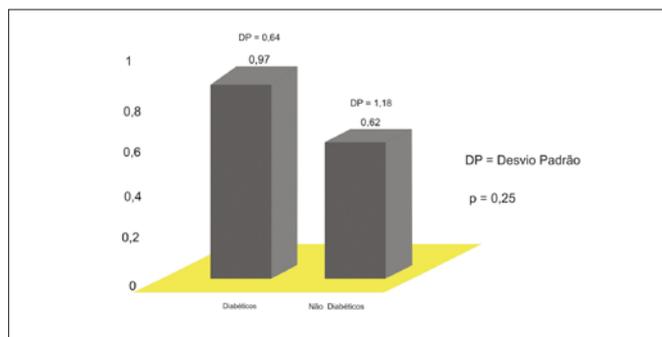


Figura 1 - Comparação entre a creatinina urinária dos pacientes diabéticos e dos pacientes não diabéticos.

A figura 1 mostra a diferença entre os pacientes diabéticos e os pacientes não diabéticos com relação à média dos valores de creatinina urinária. O desvio padrão do grupo diabético foi 0,64 enquanto que o desvio padrão do grupo não diabético foi 1,18. Assim, devido ao desvio padrão alto, os valores, embora diferentes, não foram significativos ($p = 0,25$).

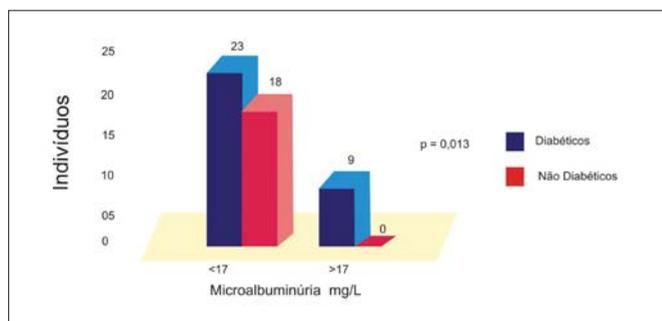


Figura 2 - Comparação entre a microalbuminúria dos pacientes diabéticos e dos pacientes não diabéticos.

Ocorreu, de acordo com a figura 2, uma prevalência de indivíduos diabéticos com microalbuminúria inferior a 17 mg/L (23 indivíduos), porém, com microalbuminúria superior a 17 mg/L, teve-se nove diabéticos e nenhum não diabético. A diferença foi estatisticamente significativa $p = 0,013$. Já utilizando as médias e os desvios padrão o valor de p foi também significativo de acordo com a tabela 3.

TABELA III

Média e desvio padrão dos níveis de microalbuminúria (mg/l) em pacientes com Diabetes e sem Diabetes.

Diabetes	Microalbuminúria (mg/L)		Valor de p
	Média	Desvio Padrão	
Ausência	3,82	4,44	*0,007
Presença	13,05	17,36	

* Valor de $p = 0,007$, significativo a 5%.

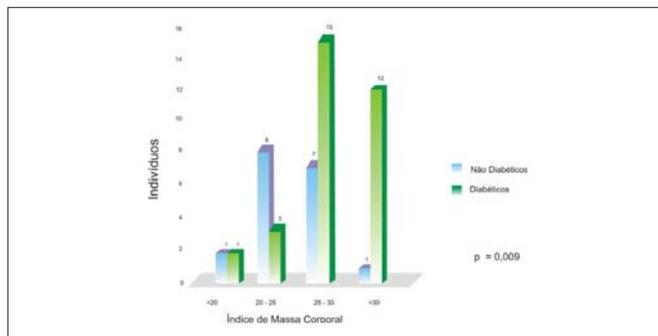


Figura 3 - Comparação do índice de massa corporal dos pacientes diabéticos e não diabéticos.

De acordo com a figura 3, o número de pacientes diabéticos com índice de massa corporal indicando sobrepeso e obesidade é maior que os pacientes não diabéticos. Essa diferença foi significativa ($p = 0,009$). Também houve diferença significativa quando comparadas às médias e os desvios padrão do grupo controle com os diabéticos em relação ao índice de massa corporal de acordo com a tabela 4.

TABELA IV

Valores de Índice de Massa Corporal (IMC) de pacientes com Diabetes e sem Diabetes.

Diabetes	IMC (Kg/m ²)		Valor de p
	Média	Desvio padrão	
Ausência	24,61	3,81	0,001*
Presença	29,38	5,38	

* Valor de $p = 0,007$, significativo a 5%.

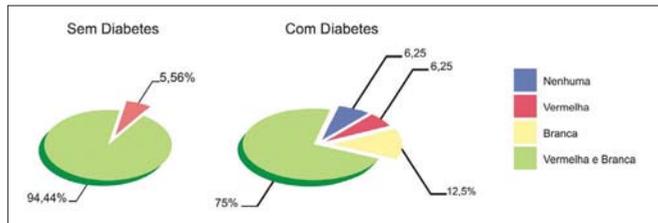


Figura 4 - Tipo de carne consumida por pacientes com diabetes e sem diabetes.

A maioria dos pacientes diabéticos consome carne vermelha e branca (75%), assim como os não diabéticos (94,44%). Dos pacientes que ingerem somente carne vermelha, também há uma relação entre os grupos, diabéticos (6,25%) e não diabéticos (5,56%). Apenas (6,25%) dos pacientes diabéticos não consomem carne de nenhum tipo e (12,5%) alimentam-se com carne vermelha e branca. A tabela 5 descreve valores relativos e absolutos de sexo e dieta dos grupos estudados.

TABELA V

Valores absolutos e relativos de sexo e tipo de carne consumida de pacientes com Diabetes e sem Diabetes.

Características Avaliadas	Diabetes	
	Ausência (controles)	Presença (casos)
Sexo	Feminino	06 (12%)
	Masculino	12 (24%)
	Total	18 (36%)
Tipo de carne que consomem	Vermelha	01 (02%)
	Branca	00 (00%)
	Branca e Vermelha	17 (34%)
	Nenhuma	00 (00%)
	Total	18 (36%)

TABELA VI
Média e Desvio padrão da idade de pacientes com Diabetes e sem Diabetes.

Diabetes	Idade	Idade (anos)	
		Média	Desvio Padrão
Ausência		41,67	17,32
Presença		55,81	12,67

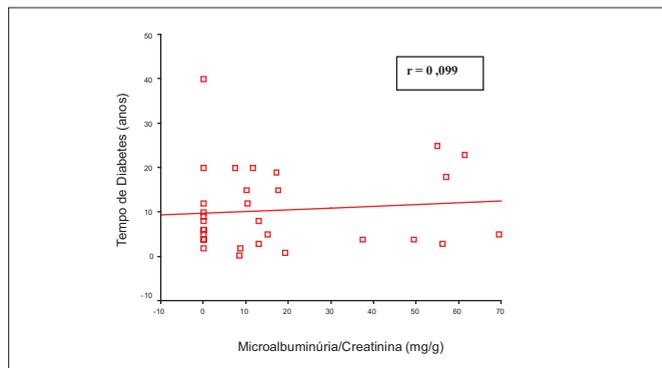


Figura 5 - correlação entre o tempo de Diabetes e a relação entre microalbuminúria e a creatinina.

CORRELAÇÃO DE PEARSON

Valor do r de pearson = 0,099 (correlação fraca)
 Valor do teste t = 0,59 para o nível de significância de 5% ou intervalo de confiança 95%. Este valor do teste realmente mostra que não existe correlação entre o tempo de Diabetes e a relação (Malb/Crea).

DISCUSSÃO

O presente estudo caracteriza-se como um estudo de caso e controle de uma amostra populacional de pacientes DM1 e DM2, acompanhados nos postos de saúde pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e em clínicas médicas particulares da cidade de Caçapava do Sul – RS. As primeiras pesquisas relacionando o papel da microalbuminúria como fator de risco para nefropatia diabética e doenças microvasculares foram executadas com urina de 24 horas ou de repouso (exemplo: 12hs overnight), devido à precaução quanto a grande variabilidade intra-individual que pode chegar a 40% no nível de excreção urinária de albumina (Bottini *et al.*, 2005; Corrêa *et al.*, 2006). Esta variabilidade pode ser causada por infecções urinárias, exercícios físicos, ingestão de proteínas, fatores hemodinâmicos, gravidez, doenças agudas e deficiente controle metabólico (Kassirer e Harrington, 1988; Mogensen *et al.*, 2000). A colheita de urina de 24 horas é um procedimento muito inconveniente para o laboratório de análises clínicas, devido a grande dependência de colaboração e compreensão por parte do paciente que com frequência a amostra é sujeitada a erros (Ginsberg *et al.*, 1983; Schwab *et al.*, 1987). Há mais de 15 anos que se procura uma forma viável para as colheitas de urina minutadas. Recentemente vários autores têm validado a utilização da relação microalbuminúria/creatinúria como método de triagem para microalbuminúria (Ahn *et al.*, 1999; Lepore *et al.*, 2002; Schultz *et al.*, 2000). Outros estudos revelaram uma correlação muito significativa entre a excreção urinária de albumina em amostras minutadas e a primeira urina da manhã (Khawali *et al.*, 2002; Meinhardt *et al.*, 2003; Mundet Tudurã *et al.*, 2001).

Neste estudo, considerou-se o paciente microalbuminúrico quando a dosagem de microalbuminúria encontrou-se entre 17 e 174 mg/L ou quando a relação microalbuminúria/creatinúria situava-se entre 30 e 300 mg/g de creatinina.

Na presente pesquisa, os valores de creatinúria entre o grupo diabético e o grupo controle (não diabético), não foram estatisticamente significativos, conforme a figura 1 ($p = 0,25$), embora este item não seja avaliado separadamente pela maioria dos pesquisadores da área, sugere-se estudos futuros para que possamos trabalhar com mais segurança com a relação Malb/Crea, ao ponto que quando a creatinúria encontra-se diminuída e a excreção urinária de albumina (EUA) na faixa de normoalbuminúria $<17\text{mg/L}$ em amostra isolada, mas próxima da faixa de microalbuminúria $>17\text{mg/L}$ em amostra casual, pode ocorrer um resultado de microalbuminúria pela relação Malb/Crea em um paciente, possivelmente sadio, devido ao fato da dosagem baixa de creatinúria. Foi descrita uma observação semelhante por Mattix *et al.*, 2002, que diz que indivíduos muito musculosos ou indivíduos caquéticos podem levar os resultados da relação Malb/Crea a falsos positivos, ou a falsos negativos de acordo com a excreção de creatinina. Quanto à determinação de microalbuminúria, também ocorreu diferença estatística entre os grupos ($p = 0,013$), semelhante ao trabalho de Silva *et al.*, 2008, que demonstrou ocorrência de microalbuminúria em pacientes com Diabetes e com hipertensão, mas em nenhum indivíduo do grupo controle, embora, Silva *et al.* tenha considerado a microalbuminúria somente com base na relação Malb/Crea.

Na comparação entre o índice de massa corporal (IMC) dos pacientes diabéticos com o grupo não diabético (figura 3), foi constatado que o índice de pacientes diabéticos com sobrepeso ou com obesidade foi maior que em pacientes não diabéticos ($p = 0,009$), o que vai a favor dos fatores de risco para desenvolvimento de Diabetes e microalbuminúria.

Quanto à dieta, foi revelado que 75% dos pacientes diabéticos estudados alimentam-se tanto de carne branca como de carne vermelha, enquanto que 6,25% comem apenas carne vermelha. Estes resultados mostram que os pacientes diabéticos não estão se privando da dieta a base de carne vermelha. Mello e colaboradores sugerem que a retirada da carne vermelha da dieta é capaz de reduzir a EUA e melhorar o perfil lipídico sérico. Já Murussi e colaboradores, relatam que a alimentação baseada em carne branca quando comparada com dietas baseadas em carne vermelha, demonstra que é possível reduzir a taxa de filtração glomerular elevada no DM1 e no DM2.

A correlação entre o tempo de Diabetes e a relação Malb/Crea foi fraca ($r = 0,099$), não aderindo com clareza o que diz a literatura, pois Piccirillo e colaboradores demonstraram que pacientes microalbuminúricos apresentam maior tempo de duração do Diabetes.

CONCLUSÃO

Foi concluído que:

- O excesso de peso é um potencial fator de risco para o Diabetes;
- A EUA na faixa de microalbuminúria, com a primeira urina da manhã, é uma forte aliada para rastreamento de doença microvascular, como a nefropatia diabética;
- A grande maioria dos pacientes diabéticos está fazendo dietas com carne vermelha, o que não é indicado pela literatura devido ao fato das proteínas desta carne favorecer o aumento da microalbuminúria;
- A correlação entre o tempo de Diabetes e a relação

Malb/Crea foi baixa, devido ao fato, sugerimos outros estudos para esclarecer esta relação, pois na literatura a correlação existe.

Logo, conclui-se que os pacientes diabéticos devem reduzir de forma significativa o IMC, privando-se de carne vermelha para amenizar os danos renais decorrentes do Diabetes e, monitorar suas taxas de EUA e creatinina urinária utilizando amostra isolada de urina para determinação da relação Microalbuminúria/Creatinúria, não ignorando os demais marcadores de função renal.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos médicos da cidade de Caçapava do Sul pelo auxílio na seleção dos pacientes para constituir os grupos e à SULLAB pelo apoio com os kits de microalbuminúria.

REFERÊNCIAS

- AHN, C. W.; SONG, Y. D.; KIM, J. H.; LIM, S. K.; CHOI, K. H.; KIM, K. R.; LEE, H. C.; HUH, K. B. The validity of random urine specimen albumin measurement as a screening test for diabetic nephropathy. *Yonsei Med J.* v. 40, n. 1, p. 40-5, 1999.
- BOELTER, Maria Cristina; AZEVEDO, Mirela Jobim De; GROSS, Jorge Luiz; LAVINSKY, Jacó. Fatores de risco para retinopatia diabética. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia.* São Paulo, v. 66, n. 2, 2003.
- BOTTINI, Paula Virgínia; AFAZ, Suzy Helena; SILVEIRA, Sidnei; GARLIPP, Célia Regina. Diagnostic value of the albumin / creatinine ratio in detecting microalbuminuria. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.* Rio de Janeiro, v. 41, n. 2, abr. 2005.
- COHEN, César N.; FILHO, Francisco M. Albanesi; GONÇALVES, Maria F. R.; GOMES, Marília B. Descenso Pressórico Durante o Sono e Microalbuminúria em Pacientes Normotensos com Diabetes Tipo 1. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.* São Paulo, v. 45, n. 3, jun. 2001.
- CORRÊA, Fernanda H S; NOGUEIRA, Verônica G; CLEMENTE, Eliete L S; BEVILÁQUA, Maria de F; GOMES, Marília de Brito. Avaliação da microalbuminúria em indivíduos não diabéticos. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.* São Paulo v. 50, n. 3, jun. 2006.
- CRUZ, Ney de Souza; SARTORI, Maria Salette; SANTOS, Maria Luiza dos; ARAGON, Flávio Ferrari; PADOVANI, Carlos Roberto; PIMENTA, Walkyria de Paula. Avaliação quanto à presença de microalbuminúria e hiperfiltração glomerular no estágio de tolerância à glicose diminuída. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.* São Paulo, v. 47, n. 2, abr. 2003.
- GINSBERG, J. M.; CHANG B. S.; MATARESE R. A.; GARELLA S.. Use of single voided urine samples to estimate quantitative proteinuria. *N Engl J Med.* Dec. 1983.
- GROSS, Jorge Luiz. Microalbuminúria e a síndrome metabólica. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.* São Paulo, v. 47, n. 2, abr. 2003.
- GUYTON, Arthur C.; HALL, John E.. *Fisiologia Médica.* Rio de Janeiro, 11.ed., 2006.
- JUNIOR, Silvio Sidney Reggi; MORALES, Paulo Henrique A; FERREIRA, Sandra R G. Existe Concordância no Acometimento Renal e Retiniano da Microangiopatia Diabética?. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.* São Paulo, v. 45, n. 5, out. 2001.
- KASSIRER, J. P.; HARRINGTON, J. T.. Laboratory evaluation of renal function. *Diseases of the kidney.* Boston, v. 1, p. 393-441, 1988.
- KHAWALI, C.; ANDRIOLO, A.; FERREIRA, S. R. G.. Comparison of methods for urinary albumin determination in patients with type 1 diabetes. *Braz J Med Biol Res.* v. 35, n. 3, p. 327-43, 2002.
- LEPORE, G.; MAGLIO, M. L.; NOSARI, I.; DODESINI, A. R.; TREVISAN, R.. Cost-effectiveness of two screening programs for microalbuminuria in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* v. 25, n. 11, p. 2103-4, 2002.
- MATTIX, HJ; HSU, Cy; SHAYKEVIDCH, S; CURHAN, G. Use of the albumin/creatinine ratio to detect microalbuminuria: implications of sex and race. *J Am Soc Nephrol.* 2002.
- MEINHARDT, U.; AMMANN R. A.; DIEM, P.; MULLIS, P. E.. Microalbuminuria in diabetes mellitus: efficacy of a new screening method in comparison with timed overnight urine collection. *J Diabetes Complications.* v. 17, n. 5, p. 254-7, 2003.
- MELLO, Vanessa D. F.; AZEVEDO, Mirela J. De; Zelmanovitz, Themis; GROSS, Jorge L.. Papel da dieta como fator de risco e progressão da nefropatia diabética. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.* São Paulo, v. 49, n. 4, Aug. 2005.
- MOGENSEN, C. E.; NELDAM, S.; TIKKANEN, I.; OREN, S.; VISKOPER, R.; WATTS, R. W.; COOPER, M. E.. Randomised controlled trial of dual blockade of renin-angiotensin system in patients with hypertension, microalbuminuria, and non-insulin dependent diabetes: the candesartan and lisinopril microalbuminuria (CALM) study. *Revista BMJ.* v. 321, p. 1440-4, dec. 2000.
- MURUSSI, Márcia; COESTER, Ariane; GROSS, Jorge Luiz; SILVEIRO, Sandra Pinho. Nefropatia Diabética no Diabete Melito Tipo 2: Fatores de Risco e Prevenção. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.* Porto Alegre, v. 47, n. 3, jun. 2003.
- NICOLUZZI, João eduardo; MARMANILLO, Carlos W; REPKA, João Carlos de. Transplante simultâneo de pâncreas-rim em portador de diabetes mellitus tipo 1 com insuficiência renal crônica. Experiência inicial do Hospital Angelina Caron. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.* São Paulo, v. 47, n. 3, jun. 2003.
- PASCOAL, Istênio F; JÚNIOR, Décio Mion. Rim e Hipertensão. *Med on line - Revista Virtual de Medicina.* v. 1, n. 3, ano I, jul/ago/set 1998.
- PICCIRILLO, Laura J.; CUNHA, Edna F; GONÇALVES, Maria de F. R.; CLEMENTE, Eliete L. S.; NEVES, Ricardo; GOMES, Marília de B. Microalbuminúria em pacientes diabéticos tipo 1: prevalência e fatores associados. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.* São Paulo, v. 46, n. 6, dez. 2002.
- SANCHEZ, Victor Hugo Saucedo; BERTINI, Anna Maria; TABORDA, Wladimir Correa; BARROS, Rosy Ane Araujo; HAGEMANN, Cristiane Cadore. Uso da microalbuminúria em amostras urinárias aleatórias para o rastreamento de pré-eclâmpsia em grávidas diabéticas. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria.* Rio de Janeiro, v. 25, n. 4, mai. 2003.
- SCHULTZ, C. J.; NEIL, H. A.; DALTON, R. N.; DUNGER, D. B.. Risk of nephropathy can be detected before the onset of microalbuminuria during the early years after diagnosis of type 1 diabetes. *Diabetes Care.* v. 23, p. 1811-5, 2000.
- SCHWAB, S.J.; CHRISTENSEN, R. L.; DOUGHERTY, K.; KLAHR, S.. Quantitation of proteinuria by the use of protein-to-creatinine ratios in single urine samples. *Arch Inter Med.* v. 147, p. 943-4, 1987.
- SILVA, Ricardo Pereira; CISNE, Karinne; OLIVEIRA, Jerusa Mara de; KUBRUSLY, Marcos; RODRIGUES SOBRINHO, Carlos Roberto Martins; ANDRADE, Pedro José Negreiros de. Determination of microalbuminuria in hypertensive patients and in patients with coronary artery disease. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia,* vol.90, n. 2, 2008.
- TUDURÁ, Mundet X.; CARMONA, Martínez S.; GONZALES, Espinosa N.; RODWAY, Lã pez; FONT, Carrera T.; LECUMBERRI, Romea S.; FOLS, Gimbert; MONTESA, Marta J.. Albumin to creatinine ratio as a diagnostic tool for type 2 diabetic nephropathy. *Med Clin (Barc).* v. 116, n. 19, p. 732-3, 2001.
- VALLADA, Edgar Pinto. *Manual de Exames de Urina.* 4.ed., Livraria Atheneu, Rio de Janeiro, 1981.
- ZANELLA, Maria Teresa. Microalbuminúria: fator de risco cardiovascular e renal subestimado na prática clínica. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.* São Paulo, v. 50, n. 2, abr. 2006.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Dr. Juliano Lacava Pereira
Rua São José, 63 Beco do Marzinho
CEP. 96570-000 Caçapava do Sul - RS

Flavonóides e Aterosclerose

Flavonoids and Atherosclerosis

Tânia T. de OLIVEIRA¹, Rosimar Regina da SILVA¹, Waleska C. DORNAS² & Tanus J. NAGEM²

RESUMO - Dentre as enfermidades pertencentes ao grupo das doenças cardiovasculares, a aterosclerose têm sido, atualmente, considerada problema de saúde pública no Brasil, tendo em vista o seu papel no perfil de mortalidade e das alterações patológicas que acarretam. Pesquisas têm demonstrado associações entre o consumo de gordura saturada, nível de colesterol e doenças coronárias; no entanto, medidas dietéticas isoladas mostram-se, freqüentemente, insuficientes, tornando-se necessária a associação dessas com fármacos hipolipidêmicos capazes de reduzir a síntese endógena de colesterol ou melhorar a eficiência de sua remoção do plasma. Durante os últimos anos, um número crescente de estudos tem relacionado flavonóides a promissores fármacos naturais, uma vez que têm sido atribuídos a esses a capacidade de modificar a biossíntese de eicosanóides (resposta anti-prostanóide e antiinflamatória), proteger colesterol-LDL da oxidação (inibindo formação de placa aterosclerótica), prevenir agregação plaquetária (efeitos anti-trombóticos) e promover relaxamento de músculo liso (efeito anti-hipertensivo e anti-iscêmico). Sendo assim, essa revisão sugere que a proteção contra doenças cardiovasculares associadas por meio de dietas ricas em flavonóides pode resultar em uma variedade de efeitos produzidos por diferentes mecanismos, necessitando, portanto, de maiores investigações e entendimentos científicos.

PALAVRAS-CHAVE - flavonóides, colesterol, doenças cardiovasculares, aterosclerose.

SUMMARY - Among the ill belonging to the group of the cardiovascular diseases, the condition arteriosclerosis has been, now, considered problem of public health in Brazil, considering its role in the mortality profile and in the pathological alterations that it presents. Researches have been demonstrating associations among the consumption of saturated fat, cholesterol level and coronary diseases; however, isolated dietary measures have been, frequently, insufficient, becoming necessary the association of those ones with hypolipidemics drugs able to reduce the endogenous synthesis of cholesterol or to improve the efficiency of its removal of the plasma. During the last years, a growing number of studies has associate flavonoids the promising natural pharms, once they have been attributed to the flavonoids the capacity of modifying the eicosanoids biosynthesis (answer antiprostanoid and antiinflammatory), to protect oxidation of cholesterol-LDL (inhibiting formation of atherosclerotic plate), to prevent aggregation platelet (anti-thrombotic effects), and to promote relaxation of smooth muscle (antihypertensive and antiischemic effects). This paper suggests that the protection against cardiovascular conditions associated to rich diets on flavonoids has resulted in a variety of effects produced by different mechanisms, needing a large knowledge and scientific investigation.

KEYWORDS - flavonoids, cholesterol, cardiovascular diseases, atherosclerosis.

INTRODUÇÃO

A aterosclerose é uma doença das artérias de calibre grande e intermediário, caracterizadas pelo desenvolvimento de lesões gordurosas, denominadas placas ateroscleróticas, na superfície interna das paredes arteriais,¹² sendo o tipo mais freqüente a esclerose de artérias.²⁴

O processo da inflamação é atualmente conhecido como o evento etiológico que precede o desenvolvimento e o processo contínuo da aterosclerose.³⁶ Nas dislipidemias, colesterol-LDLox penetram através do endotélio lesado ou disfuncional exercendo estresse de cisalhamento e segue por recrutamento de monócitos pela indução da expressão endotelial de moléculas de adesão celulares. Após a aderência dos monócitos, outras moléculas específicas, como a proteína quimioestática monocitária-1 e o fator estimulante de colônia de macrófagos, atraem e modificam os monócitos no espaço subendotelial. Após penetração na parede vascular, os monócitos diferenciam-se em macrófagos, os quais são responsáveis pela conversão de colesterol-LDL levemente oxidado em colesterol-LDL altamente oxidado que se ligam a receptores de "limpeza" dos macrófagos e penetram em células espumosas.²²

Várias citocinas parecem participar desse processo, particularmente interagindo com monócito. No aterosclerose macrófagos expressam receptores "scavenger" que se ligam e internalizam partículas de lipoproteínas modificadas pela oxidação ou glicação. Esse processo aumenta as células espumosas, o qual resulta na acumulação de lipídeos na íntima e o espessamento provoca o remodelamento, uma dilatação da artéria compensatória ao estreitamento do lúmen. Ciclos repetidos de acúmulo e ativação de células

mononucleares, migração e proliferação das células musculares lisas com produção de colágeno levam ao aumento progressivo da lesão.¹⁹

Essas lesões determinam um estreitamento de artérias que podem levar às suas oclusões, resultando no bloqueio da irrigação do tecido em questão e a sua morte, devido à interrupção do aporte de oxigênio, e, conseqüentemente, da produção de energia, obtida através da oxidação aeróbica de nutrientes na maioria das células. Isso é o que acontece nos casos de infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, embolia pulmonar, entre outros.²⁴

Várias linhas de evidências sugerem associação entre lipídeos e ruptura das placas ateroscleróticas. Hipercolesterolemia é forte preditor de evento coronário agudo decorrente de crescimento e desestabilização de placa determinada pela quebra de colágeno com perda local celular de fonte de síntese de colágeno.³⁴ Sítios de trombose fatal onde as placas se rompem por falha mecânica. As células endoteliais sofrem apoptose sob estímulo inflamatório, ou secretam proteinases estimuladas pelo colesterol-LDLox, favorecendo a lesão da íntima. Assim, o desequilíbrio entre as propriedades pró-trombóticas e fibrinolíticas do endotélio favorece a trombogênese. As células endoteliais expressam fator tissular pró-coagulante e aumentam a produção do inibidor do ativador do plasminogênio. O processo inflamatório presente no endotélio da lesão aterosclerótica diminui sua produção de óxido nítrico; adicionalmente, as espécies de oxigênio reativo podem neutralizar seu efeito vasodilatador provocando vasoespasmo ou diminuir sua ação antiinflamatória, ou, ainda, inibir seus efeitos anti-agregação plaquetária.⁴²

Recebido em 15/05/2008

Aprovado em 17/11/2009

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa / Minas Gerais.

²Departamento de Química da Universidade Federal de Ouro Preto, 35400-000, Ouro Preto / Minas Gerais.

Flavonóides

Os flavonóides são compostos polifenólicos, diversos tanto na estrutura química quanto em suas características; são encontrados somente em plantas,⁴⁸ presentes naturalmente nas frutas, vegetais e bebidas como vinho e chá.⁸

Com mais de 5.000 estruturas já identificadas^{3,6,26,35} essas substâncias possuem núcleo fundamental (Figura 1) com anel aromático e cada tipo pode apresentar modificações, como hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação, ou ramnosilação, resultando numa enorme diversidade de flavonóides na natureza.^{5,27} Entre as principais classes de flavonóides incluem-se os flavonóis, as flavonas, as flavanonas, flavanóis (ou catequinas), as antocianidinas e as isoflavonas.³¹

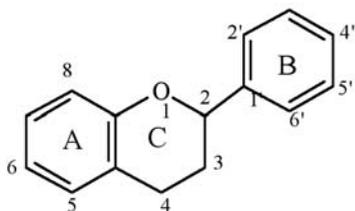


Figura 1: Núcleo fundamental de Flavonóides

Dentro dos subgrupos dos flavonóis, a quercetina é o flavonóide que mais freqüentemente ocorre nos alimentos, assim como o caemferol, miricetina e as flavonas apigenina e luteolina, encontrados em abundância nas cebolas, maçãs e brócolis. As flavanonas, são principalmente encontradas em frutas cítricas, sendo um exemplo desse grupo a naringina. Já as catequinas estão presentes em grande quantidade nos chás verde e preto e no vinho tinto, ao lado das antocianinas que também estão presentes nesses alimentos e em frutas como morango e uvas. As isoflavonas chamadas fitoestrógenos em função de serem considerados moduladores de receptor de estrógeno naturais são consumido em grande quantidade através da soja. E os biflavonóides constituem classe de flavonóides diméricos de flavonas e flavanonas sendo a maioria destes de ocorrência natural.³⁵(Tabela 1)

TABELA I
Representantes mais comuns das diferentes classes de flavonóides

Classes	Representantes mais comuns
Flavonas	Acacetina, Apigenina, Apína, Crisina, Crisoeriol, Diosmetina, Escutelareina, Luteolina, Tricetina, Tricina.
Flavonóis	Astragalina, Camferol, Fisetina, Galangina, Gossipetina, Herbacetina, Isorammetina, Miricetina, Morina, Quercetina, Quercitrina, Ramnetina, Rutina.
Antocianinas	Cianidina, Delfinidina, Etunidina, Malvidina, Peonidina, Pelargonidina.
Flavanonas	Alpinetina, Eriodictiol, Hesperetina, Hesperidina, Naringenina, Naringina, Prumina.
Isoflavonóides	Biochanina-A, Dalbergioidina, Daidzeína, Di-hidrononia, Equol, Genisteína, Genistina, Ononina, Quievitona, Sativam, Vairol, Vestitol, Vestitona.
Biflavonóides	Amentoflavona, Agatisflavona, Cupressoflavona, Hinoquiflavona, Robustaflavona.

EFEITOS CARDIOPROTETORES DE FLAVONOIDES

Atividade sobre os lipídeos sanguíneos

Experimentos realizados em ratos mostraram que flavonóides extraídos de beringela (*Solanum melongena*) apresentaram efeito na redução nos níveis sanguíneos de colesterol total e triacilgliceróis.⁴³ Esse efeito pode ser explicado, em parte, pelo aumento da atividade da enzima LCAT, enzima presente na superfície das HDL, que converte o colesterol presente em quilomícrons, VLDL, LDL e tecidos

periféricos em ésteres de colesterol, transportando-os para o fígado para serem metabolizados e pelo aumento da atividade da enzima lipase lipoprotéica, que remove os ácidos graxos dos triacilgliceróis presentes em quilomícrons e VLDL para o tecido adiposo. Observou-se também nesse experimento um aumento nos níveis de ácidos biliares hepáticos e fecais, bem como esteróis neutros fecais, indicando uma alta taxa de degradação de colesterol e redução na reabsorção intestinal de ácidos biliares.

Da mesma forma Bok *et al.* (1999)², com o objetivo de avaliar o efeito de extrato de casca de tangerina e mistura dos flavonóides naringina e hesperedina em ratos alimentados com dieta contendo 1% de colesterol, mostraram redução significativa dos níveis de colesterol hepático e plasmático, triacilglicerol hepático e esteróis neutros fecais. A redução do colesterol plasmático, resulta em um aumento da absorção de colesterol dietético, o que contribui para uma simultânea diminuição da excreção fecal de colesterol em ratos alimentados com esses flavonóides. A atividade de HMG-CoA redutase está normalmente diminuída em ratos alimentados com dieta alta em colesterol enquanto que a atividade da enzima ACAT e colesterol-7- α -hidroxilase estão aumentadas. Entretanto, a presença desses flavonóides em uma dieta rica em colesterol diminuiu significativamente a atividade de HMG-CoA redutase e ACAT. A redução da atividade da enzima ACAT pode levar a uma redução dos ésteres de colesterol disponíveis para formar VLDL resultando, assim, na redução da secreção dessa lipoproteína pelo fígado. De forma interessante, nem a naringina, nem a hesperedina inibiram HMG-CoA redutase ou ACAT *in vitro*, sugerindo que ambas podem sofrer algumas mudanças estruturais ou ficarem ativas no intestino ou em outro órgão. Uma outra hipótese seria que a expressão de genes dessas enzimas podem ser inibidas pelas naringina e hesperedina em ratos alimentados com dieta rica em colesterol. O efeito de flavonóides sobre os níveis de colesterol sanguíneos em humanos também foram estudados por Hodgson *et al.* (1998)¹⁴ que avaliaram o efeito dos isoflavonóides genisteína e daidzeína sobre os níveis de lipídeos sanguíneos em indivíduos saudáveis. Os isoflavonóides apresentam atividade estrogênica e os estrógenos podem reduzir colesterol-LDL do soro e aumentar os níveis de colesterol-HDL. Durante oito semanas, treze mulheres no período pós-menopausa, não submetidas à terapia de reposição hormonal, e quarenta e seis homens receberam, diariamente, um tablete contendo 55 mg de isoflavonóides (predominantemente na forma de genisteína) ou um tablete de placebo. Os indivíduos mantiveram sua dieta habitual e atividade física durante todo o período de tratamento. Os níveis sanguíneos de colesterol total, colesterol-LDL, colesterol-HDL e subclasses de colesterol-HDL, triacilgliceróis foram avaliados na última semana de tratamento, sendo que nenhuma diferença significativa foi identificada. Embora esse estudo não tenha demonstrado alterações nos níveis de lipídeos sanguíneos em indivíduos normais, esses resultados não eliminam a possibilidade de efeito hipolipidêmico de isoflavonóides em indivíduos hipercolesterolêmicos. Santos *et al.* (1999a)³⁸ verificaram efeito hipolipidêmico dos flavonóides morina e quercetina isoladamente e associados ao ácido nicotínico em ratos. Nagem *et al.* (1999)²⁸ também observaram efeito hipolipidêmico bastante acentuado do flavonóide naringina isoladamente e associado aos corantes naturais antocianina e carmim em ratos. Itaya & Igarashi (1992)¹⁶ também relataram atividade hipolipidêmica dos flavonóides taxifolina, rutina e catequina assim como estudos realizados por Santos *et al.* (1999b)³⁹ também

mostraram o efeito dos flavonóides naringenina, rutina e ácidos nicotínico isoladamente e associados na redução dos lipídeos sanguíneos. Santos *et al.* (1999c)⁴⁰ registraram ações hipolipidêmicas dos flavonóides naringenina, rutina e dos corantes naturais monascus e antocianina isoladamente e associados. No entanto, para que no futuro essas substâncias possam ser utilizadas como medicamentos, torna-se necessário o seu estudo farmacológico e toxicológico em diferentes espécies de animais.

Matsumoto *et al.* (1998)²⁵ observaram a influência de polifenóis presentes no chá preto sobre os níveis de lipídeos do soro em ratos alimentados com dieta contendo 15% de banha e 1% de colesterol. A dieta foi suplementada com 1% de polifenóis extraídos de chá preto. Os animais alimentados com dieta contendo banha e colesterol apresentaram um aumento nos níveis de colesterol do fígado e plasma, quando comparados com os animais do grupo controle. A suplementação com polifenóis extraídos do chá preto na dieta contendo colesterol e banha diminuíram os níveis de lipídeos no plasma e aumentaram a excreção fecal de lipídeos totais e colesterol.

Nos adipócitos, hormônios lipolíticos como catecolaminas, glucagon e corticotropina atuam na mobilização de ácidos graxos estocados na forma de triacilgliceróis. Muitos agentes terapêuticos têm apresentado efeito lipolítico através da inibição da enzima fosfodiesterase. Kuppusamy & Das (1992)²⁰ avaliaram o efeito de vários flavonóides sobre a enzima fosfodiesterase do cAMP e mobilização de lipídeos nos adipócitos de ratos. Os flavonóides quercetina, luteonina, escutelareína, fletetina e genisteína apresentaram significativa inibição sobre a enzima fosfodiesterase quando comparado com o 3-isobutil-2-metilxantina, um potente inibidor dessa enzima. Os flavonóides fisetina, quercetina, fletetina e buteína, potentes inibidores competitivos de fosfodiesterase, apresentaram um intenso efeito lipolítico, embora nem todos os inibidores da fosfodiesterase demonstram a mesma resposta.

Kirk *et al.* (1998)¹⁸ avaliaram o efeito dos flavonóides genisteína e daidzeína em camundongos, com e sem receptores de colesterol-LDL. Nesse estudo, observou-se que nos animais com receptores de colesterol-LDL, os flavonóides testados aumentaram a atividade dos receptores. O colesterol-LDL transporta o colesterol para os tecidos periféricos, e os flavonóides ao ativarem os receptores de colesterol-LDL no hepatócito, aumentam a endocitose, o que leva à redução dos níveis sanguíneos de colesterol.

Em estudo com coelhos, Juzwiak *et al.* (2005)¹⁷ evidenciam que quercetina possui propriedades hipolipidêmicas e antiaterogênicas ao demonstrar redução de níveis plasmáticos de triacilgliceróis e colesterol elevados por dieta rica em lipídeos após doze semanas de experimento e reduzida formação de placas ateroscleróticas na aorta bem como injúria na artéria carótida com quatro semanas de estudo. Os efeitos hipolipidêmicos de quercetina podem depender da ativação de algumas enzimas microssomais, observadas pela elevação do conteúdo de citocromo P450 e os mecanismos antiateroscleróticos que denotam propriedades antioxidantes sugeridos pela redução da formação de MDA (importante marcador de peroxidação lipídica).

Inibição da oxidação de LDL

Os ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas das células podem ser oxidados por peroxidação enzimática ou auto-oxidativa, mediante reações que envolvam radicais livres. Um excesso desses radicais pode levar à reação em cadeia incontrolada e a peroxidação lipídica. A

peroxidação lipídica ocorre em três estágios: iniciação, propagação e terminação. No estágio de iniciação ocorre interação do ácido graxo insaturado com o oxigênio, formando um radical lipídico. No estágio de propagação, o radical lipídico reage com oxigênio molecular, formando radical peroxila, que pode atacar outra molécula de lipídeo, formando mais radicais livres. No estágio de terminação, os radicais livres reagem com antioxidantes formando produtos inertes. A peroxidação lipídica pode ser suspensa por inativação enzimática dos radicais livres pelos antioxidantes que inibem o estágio de iniciação e/ou aceleram o estágio de terminação.⁵

Os flavonóides inibem a peroxidação lipídica, *in vitro*, no estágio de iniciação, por atuarem como antioxidantes eliminando ânion superóxido e radicais hidroxilas. Propõe-se que flavonóides interrompam a reação em cadeia dos radicais livres, doando átomos de hidrogênio ao radical peroxila, formando um radical de flavonóide. O radical flavonóide, então, reage com o radical livre terminando, assim, a propagação da reação em cadeia.⁵

Galvez *et al.* (1995)¹⁰ avaliaram a atividade antiperoxidativa de vários flavonóides sobre a peroxidação de membrana de células de fígado de rato induzidas pelo sistema não-enzimático (sistema ácido ascórbico-Fe²⁺) e pelo sistema enzimático (ácido araquidônico). Todos os flavonóides testados foram capazes de inibir a peroxidação lipídica induzida pelos dois sistemas.

Produtos de oxidação do colesterol-LDL podem ser detectados como dienos conjugados, TBARS, fluorescência de apolipoproteína B e mudanças na mobilidade eletroforética.⁴⁷ Os efeitos dos flavonóides sobre a susceptibilidade a oxidação de colesterol-LDL foram também avaliados pela inibição de indução de oxidação por Safari & Sheikh (2003)³⁷ ao incubarem em plasma com flavonóides, estimando pela medição de dieno conjugado, peroxidação lipídica e TBARS.

Lim *et al.* (1998)²³ avaliaram o efeito dos flavonóides quercetina e ganhuangenina na inibição da oxidação de colesterol-LDL induzida por Cu²⁺. Tanto a quercetina quanto a ganhuangenina inibiram a modificação oxidativa de colesterol-LDL. A atividade antioxidante desses flavonóides foi evidenciada através da redução de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico, produção de hidroperóxidos de fosfatidilcolina e intensidade de fluorescência de colesterol-LDL oxidado.

Outros estudos demonstraram que catequina e quercetina protegem o colesterol-LDL de oxidação quando incubadas com várias culturas de células, como por exemplo, macrófagos derivados de monócitos humanos, células endoteliais de veia umbilical humana ou células linfóides. Provavelmente, esse efeito foi devido à habilidade dos flavonóides em inibir atividade da enzima lipoxigenase. Além disso, catequina também inibiu a absorção e degradação de colesterol-LDL previamente oxidada por macrófagos humanos, mas este mecanismo não ficou claro.⁴⁴

O aumento do estresse oxidativo pode contribuir para a patogênese da complicação diabética. Quine & Raghu (2005),³² avaliando epicatequina (flavonóide constituinte da raiz de *Pterocarpus marsupium* e folhas e raiz da *Harunga madagascariensis*) em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina, obtiveram efeitos favoráveis ao diminuir TBAR e hidroperóxido, aumentarem a concentração da SOD e catalase, enzimas antioxidantes envolvidas na redução de peróxido de hidrogênio. Logo, os efeitos antioxidantes e antiperoxidativos de epicatequina devem ser devidos à reatividade do radical hidroxila.

Recentemente, Cirico & Omay (2006)⁴ em estudo *in vitro* com compostos fenólicos sobre a capacidade de oxidação de LDL, observaram que efeitos sinérgicos de ácido ferúlico, quercetina, catequina e hesperidina exercem efeitos antioxidantes interdependentes ou mutuamente protegem contra peroxidação lipídica. Ao contrário, foram observados efeitos pró-oxidantes de quercetina e ácido ferúlico, isoladamente, em diferentes concentrações de enriquecimento usados no experimento, o que os levaram a sugerir que a combinação de compostos fenólicos, tal qual obtida na dieta humana, através de uma variedade de fontes alimentares, possibilitava efeitos antioxidantes agindo aditivamente.

Atividade antiinflamatória e melhoria da vasodilatação

Estudos realizados por Pelzer *et al.* (1998)³⁰ sobre o efeito antiinflamatório de trinta flavonóides das classes flavanonas, flavonas e flavonóis, mostraram que as flavanonas eriodictiol e hesperetina, a flavona 7,4'-di-O-metilapigenina, e os flavonóis quercetina, 3-O-metilquercetina e morina, inibiram significativamente o edema provocado pelo processo de inflamação induzido nas patas de rato. Os flavonóides rutina (flavonol) e jaceosidina (flavona) apresentaram os melhores efeitos antiinflamatórios.

O aumento potencial do crescimento de células musculares lisas é uma das principais anormalidades que ocorrem durante o desenvolvimento da aterosclerose. Estudos realizados por Huang *et al.* (1995)¹⁵ mostraram que baicaleína apresenta um forte efeito inibitório sobre a resposta proliferativa de células musculares lisas vasculares estimulada por fator de crescimento derivado de plaquetas. Além do efeito antiproliferativo, esse flavonóide também inibe a enzima lipoxigenase. Já Zhang *et al.* (2000),⁴⁹ além de verificarem atividade antiproliferativa de apigenina, observaram que altas concentrações desse flavonóide relaxam as artérias. Óxido nítrico e cGMP estão envolvidos no relaxamento endotélio dependente, visto que o efeito estimulatório de apigenina sobre o aumento do Ca²⁺ intracelular contribui em parte para o relaxamento endotélio independente.

NO é produzido pela L-arginina por pelo menos três isoformas de NOS.¹ O aumento da produção de NO pela atividade constitutiva de NOS no endotélio vascular (NOS-3) dilata os vasos sanguíneos e inibe adesão de leucócitos e plaquetas na superfície endotelial.¹¹ Já isoformas de (NOS-2) são expressas para ação de estímulo inflamatório incluindo citocinas, endotoxinas ou espécies reativas de oxigênio, gerando grandes quantidades de NO, tóxico para bactéria e células tumorais. Em condições inflamatórias agudas, excesso de NOS-2 contribui para hipotensão e hiporeatividade vascular.^{7,45} Olszanecki *et al.*, (2002)²⁹ concluíram que alguns flavonóides são potentes inibidores da indução de NOS-2 e, ao mesmo tempo, eles podem aumentar atividade de NOS-3.

NO também participa de uma função central na indução de citotoxicidade de macrófagos implicado na patologia de doenças neurológicas e dano tecidual periférico associado às inflamações aguda e crônica. Wei *et al.*, (2005)⁴⁶ sugerem que inibição por flavonóide isolado de *Artocarpus heterophyllus* e *Artocarpus communis* em macrófagos pode ter valor no tratamento terapêutico ou prevenção nas doenças inflamatórias periféricas associadas com o aumento da produção de NO.

Outra ação dos flavonóides está relacionada com a liberação de ácido araquidônico dos fosfolipídeos, presentes nas membranas celulares, por ação da fosfolipase A₂. Alguns trabalhos têm mostrado que quercetina inibe a fosfolipase A₂ de leucócitos em coelhos e humanos.¹³ Os flavonóides inibem também a síntese de eicosanóides através da inibi-

ção da atividade das enzimas lipoxigenase e ciclooxigenase e também pela inibição da peroxidação não enzimática de ácidos graxos poliinsaturados que também atuam na ativação dessas oxigenases.⁸

Diminuição da capacidade de plaquetas coagularem o sangue

O efeito antioxidante dos flavonóides parece estar relacionado com sua ação antitrombótica. A ação antitrombótica e vasoprotetora de quercetina, rutina e outros flavonóides têm sido atribuídas à sua habilidade de ligarem-se à membrana de plaquetas e eliminarem radicais livres. Através de sua ação antioxidante, os flavonóides restabelecem a biossíntese e a ação de prostaciclina endotelial e o fator de relaxamento derivado do endotélio, os quais são inibidos pelos radicais livres.⁵

A atividade plaquetária está aumentada em pacientes com fatores de riscos coronarianos, como elevado nível de colesterol-LDL, hipertensão, diabetes, consumo de cigarro. Os flavonóis quercetina e miricetina apresentaram forte efeito inibidor da agregação de plaquetas humanas induzidas por ácido araquidônico e ADP, mas não foram efetivas, quando a agregação plaquetária foi induzida por colágeno. Em um modelo de agregação "*in vitro*", quercetina e rutina foram capazes de dispersar trombos plaquetários pré-formados, que foram aderidos ao endotélio da aorta de coelho.⁴⁴

Um dos mais potentes mecanismos pelo qual os flavonóides inibem a agregação plaquetária é a mediação do aumento dos níveis de cAMP plaquetário através da estimulação da atividade da enzima adenilato ciclase ou por inibição da fosfodiesterase do cAMP.⁵ Landolfi *et al.* (1984)²¹ estudaram o efeito de vários flavonóides sobre agregação plaquetária bem como sobre cAMP e metabolismo do ácido araquidônico. As flavonas crisina, apigenina e fletetina inibiram a agregação plaquetária por inibirem a via da ciclooxigenase. Crisina e apigenina reduziram o cAMP plaquetário em resposta a PGI₂. Esse efeito foi provavelmente mediado pela inibição da adenilato ciclase. Entretanto, os flavonóides miricetina e quercetina aumentaram o cAMP plaquetário, aumento induzido por PGI₂. A potencialização do efeito da PGI₂ sobre os níveis de cAMP pela quercetina pode ser devido a uma inibição da fosfodiesterase. O efeito oposto exercido por diferentes flavonóides sobre a resposta do cAMP induzida por PGI₂ pode ser devido à inibição preferencial da fosfodiesterase ou adenilato ciclase. É possível sugerir que a inibição da ciclooxigenase desempenha um papel importante sobre o efeito da inibição da agregação plaquetária exercida pelos flavonóides apigenina, crisina e fletetina, e essa inibição é devido a um aumento do cAMP.

A presença de placas nos vasos sanguíneos é característica de lesões ateroscleróticas avançadas em humanos. Essas lesões possuem um núcleo de lipídeos cobertas com uma capa fibrosa que é composta de células de músculo liso, células do sistema imune e matriz extracelular. A placa obstrui o vaso sanguíneo, resultando em isquemia e proteases são ativadas. Ativação sistêmica e local de proteases induz instabilidade plaquetária e danos aos miócitos. Múltiplas proteases podem mediar danos que levam à instabilidade de placa da aorta e à fragmentação plaquetária. Danos causados por proteases como collagenase e elastase e perda de colágeno e proteínas fibrosas de vasos sanguíneos devido à idade contribuem para a formação de aneurisma.³³

Estudos *in vitro* relatam que flavonóides podem diminuir o ataque proteolítico sobre proteínas fibrosas e o acúmulo de proteoglicanas e ácido hialurônico. Antocianidina e extra-

tos de plantas contendo flavonóides inibem a atividade da elastase, tripsina e α -quimotripsina. Além disso, ativação de leucócitos causa liberação de proteases; portanto, inibição dessa ativação pelos flavonóides pode desencadear a redução de danos aos tecidos causados pelas proteases.⁴¹ Em trabalho de Freedman *et al.* (2001),⁹ a incubação de plaquetas com suco de uva roxa diluído (SUR) ou consumo de SUR por voluntários saudáveis levaram a uma inibição dose dependente da agregação plaquetária, aumento do NO e diminuição da produção de superóxido sendo que essas mudanças parecem ser efeitos direto das plaquetas e podem ser parcialmente regulados via PKC. Desse modo, a inibição da função plaquetária e o aumento de superóxido, bem como o aumento do NO representam um mecanismo potencial para efeitos benéficos de produtos de suco de uva roxa, independente do consumo de álcool, em doença cardiovascular.

CONCLUSÃO

Devido à grande diversidade de propriedades farmacológicas dos flavonóides, ao lado dos seus efeitos antioxidantes (direta ou indiretamente estimulando mecanismo de defesa endógena) pode-se diminuir circulação de colesterol-LDL e oxidação lipídica de membrana com suas deletérias conseqüências nas células endoteliais, ocasionando melhoria da função endotelial e inibição da angiogênese e migração, além da proliferação de células vasculares, efeitos antitrombóticos, antiaterogênicos e de outras atividades que demonstram que o emprego terapêutico de plantas contendo flavonóides é vasto e de grande valor para novos alvos para o futuro de drogas e adjuvantes nutricionais. Portanto, esses compostos mostram importantes efeitos sobre os processos regulatórios intrínsecos e, assim, podem marcadamente melhorar as condições de pacientes em vários estágios da progressiva doença cardiovascular.

ABREVIÇÕES

ACAT (Acil-CoA Acetiltransferase); ADP (Adenosina 5'-difosfato); cAMP (Adenosina 3',5' - Monofosfato cíclico); cGMP (Guanosina 3',5' - Monofosfato cíclico); HDL (Lipoproteína de alta densidade); HMG-CoA (3-Hidroxi-3-Metil-Glutaryl-CoA); LCAT (Lecitina Colesterol Acil Transferase); LDL (Lipoproteína de baixa densidade); LDLox (Lipoproteína de baixa densidade oxidada); MDA (Malondialdeído); NO (Óxido nítrico); NOS (Óxido nítrico sintase); PGL₂ (Prostaglandina I₂); PKC (Proteína quinase C); TBARS (Substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico); SOD (Superóxido dismutase); VLDL (Lipoproteína de densidade muito baixa);

REFERÊNCIAS

- 1- ALDERTON, W.K.; COOPER C.E.; KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem.v.357*, p.593-615, 2001.
- 2- BOK, S.H.; LEE, S.H.; PARK, Y.B.; BAE, K.H.; SON, K.H.; JEONG, T.S.; CHOI, M.S. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase and acyl CoA: cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. *Journal of Nutrition v.129*, p.1182-1185, 1999.
- 3- CHEYNIER, V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am. J. Clin. Nutr. v.81*, p.223S-229S, 2005.
- 4- CIRICO, T.L.; OMAJE, S.T. Additive or synergetic effects of phenolic compounds on human low density lipoprotein oxidation. *Food and Chemical Toxicology v.44*, p.510-516, 2006.

- 5- COOK, N.C.; SAMMAN, S. Flavonoids – chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources – review. *The Journal of Nutrition Biochemistry v.7*, p.66-76, 1996.
- 6- DUBICK, M.A.; OMAJE, S.T. Modification of atherogenesis and heart disease by grape wine and tea polyphenols. In: REC. WILDMAN, (Ed.), *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*, CRC Press 2001, p. 235-260.
- 7- FEIHL, F.; WAEBER, B.; LIAUDET, L. Is nitric oxide overproduction the target of choice for the management of septic shock? *Pharmacol Ther v. 91*, p.179-213, 2001.
- 8- FORMICA, J.V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chemistry Toxicology v.33*, p.1061-1080, 1995.
- 9- FREEDMAN, J.E.; PARKER, C.3rd; LI, L.; PERLMAN, J.A.; FREI, B.; IVANOV, V.; DEAK, L.R.; IAFRATI, M.D.; FOLTS, J.D. Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circulation v. 12*, p.2792-8, 2001.
- 10- GALVEZ, J. DE LA CRUZ, J.P.; ZARZUELO, A.; DE LA CUESTA, F.S. Flavonoid inhibition of enzymic and nonenzymic lipid peroxidation in rat liver differs from its influence on the glutathione-related enzymes. *Pharmacology v.51*, p.127-133, 1995.
- 11- GEWALTIG, M.T.; KOJDA, G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc Res v.55*, p.250-260, 2002.
- 12- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. *Tratado de Fisiologia Médica 9a ed.*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 1997, 1014p.
- 13- HARBORNE, J.B. *The flavonoids: Advances in Research Science 1986*. 5. Ed. London: Chapman e Hall 1994, 676p.
- 14- HODGSON, J.M.; PUDDEY, I.B.; BEILIN, L.J.; MORI, T.A.; CROFT, K.D. Supplementation with isoflavonoid phytoestrogens does not alter serum lipid concentrations: a randomized controlled trial in humans. *Journal of Nutrition v.128*, p.728-732, 1998.
- 15- HUANG, H.C.; WANG, H.R.; HSICH, L.M. Antiproliferative effect of baicalein, a flavonoid from a chinese herb, on vascular smooth muscle cell. *European Journal of Pharmacology v.251*, p.91-93, 1995.
- 16- ITAYA, S.; IGARASHI, K. Effects of taxifolin on the serum cholesterol level in rats. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry v.56*, p.1492-94, 1992.
- 17- JUZWIAK, S.; WOZCICKI, J.; MOKRZYCKI, K.; MARCHLEWICZ, M.; BIALECKA, M.; WENDA-ROZEWICKA, L.; GAWRONSKA-SZKLARZ, B.; DROZDZIK, M. Effect of quercetin on experimental hyperlipidemia and atherosclerosis in rabbits. *Pharmacol Rep. v.57*, p.604-9, 2005.
- 18- KIRK, E.A.; SUTHERLAND, P.; WANG, S.A.; CHAIT, A.; LEBOEUF, R.C. Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL-receptor deficient mice. *Journal of Nutrition v.128*, p.954-64, 1998.
- 19- KLEEMAN, R.; KOOISTRA, T. HMG-Coa reductase inhibitors: effects on chronic sub acute inflammation and onset of atherosclerosis induced by dietary cholesterol. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord. v.5*, p.441-53, 2005.
- 20- KUPPUSAMY, U.R.; DAS, N.P. Effects of flavonoids on cyclic AMP phosphodiesterase and lipid mobilization in rat adipocytes. *Biochemical Pharmacology v.44*, p.1307-1315, 1992.
- 21- LANDOLFI, R.; MOWER, R.L.; STEINER, M. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. *Biochemical Pharmacology v.33*, p.1525-1530, 1984.
- 22- LIBBY, P.; RIDKER, P.M.; MASERI, A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation v.105*, p.1135-43, 2002.
- 23- LIM, B.O.; YU, B.P.; CHO, S.H.; HER, E.; PARK, D.K. The inhibition by quercetin and ganhuangenin on oxidatively modified low density lipoprotein. *Phytotherapy Research v.12*, p.340-45, 1998.
- 24- MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. *Bioquímica Básica 2. ed.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 1999, 360p.
- 25- MATSUMOTO, N.; OKUSHIO, K.; HARA, Y. Effect of black tea polyphenols on plasma lipids in cholesterol-fed rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology v.44*, p.337-342, 1998.
- 26- MIDDLETON, Jr.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev. v.52*, p.673-751, 2000.
- 27- MORTON, L.W.; CACCETTA, R.A.A.; PUDDEY, I.B.; CROFT, K.D. *Chemistry*

- and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* v.27, p.152-9, 2000.
- 28- NAGEM, T.J.; PEREIRA, W.L.; OLIVEIRA, T.T.; PINTO, A.S.; OLIVEIRA, M.G.A.; STRINGHETA, P.C. Efeitos de naringina e corantes naturais antocianina e carmin no metabolismo lipídico. *Revista Brasileira de Farmacologia* v.80, p.25-28, 1999.
- 29- OLSZANECKI, R.; GEBSKA, A.; KOZLOVSKI, V.I.; GRYGLEWSKI, R.J.; Flavonoids and nitric oxide synthase. *Journal of Physiology and Pharmacology* v.53, p.571-84, 2002.
- 30- PELZER, L.E.; GUARDIA, T.; JUAREZ, O.A.; GURREIRO, E. Acute and chronic anti-inflammatory effects of plant flavonoids. *IL Farmaco*, v.53, p.421-4, 1998.
- 31- PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research* v.18, p.1995-2018, 1998.
- 32- QUINE, S.D.; RAGHU, P.S. Effects of (-)-epicatechin, a flavonoid on lipid peroxidation and antioxidants in streptozotocin-induced diabetic liver, kidney and heart. *Pharmacol Rep.* v.57, p.610-5, 2005.
- 33- QUINTÃO, E.C.R. Colesterol e Aterosclerose. Rio de Janeiro: Qualitymark 1992, 276p.
- 34- REKHTER, M.D.; HICKS, G.W.; BRAMMER, D.W.; HALLAK, H.; KINDT, E.; CHEN, J.; ROSEBURY, W.S.; ANDERSON, M.K.; KUIPERS, P.J.; RYAN, M.J. Hypercholesterolemia causes mechanical weakening of rabbit atheroma. *Cir Res* v. 86, p. 101-108, 2000.
- 35- ROSS, J.A.; KASUM, C.M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu. Rev. Nutr.* v.22, p.19-34, 2002.
- 36- ROSS, R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* v.340, p.115-126, 1999.
- 37- SAFARI, M.R.; SHEIKH, N. Effects of flavonoids on the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative modification. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* v.69, p.73-77, 2003.
- 38- SANTOS, K.F.R.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S.; OLIVEIRA M.G.A.; SOARES, J.F. Efeitos das associações de morina-ácido nicotínico e quercetina-ácido nicotínico no controle de lipídeos. *Revista Brasileira de Análises Clínicas* v.31, p.5-7, 1999a.
- 39- SANTOS, K.F.R.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S.; OLIVEIRA, G.A. Hypolipidaemic effects of naringenin, rutin, nicotinic acid and their associations. *Pharmacological Research* v.40, p.41-46, 1999b.
- 40- SANTOS, K.F.R.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S.; STRINGHETA, P.C. Associations of flavonoids and natural dyes in the control of lipidic metabolism. *Acta Farmaceutica Bonaerense* v.18, p.127-30, 1999c.
- 41- SCHRAMM, D.D.; GERMAN, J.B. Potential effects of flavonoids on the etiology of vascular disease. *Journal Nutrition Biochemistry* v.9, p.560-66, 1998.
- 42- SIQUEIRA, A.F.; ABDALLA, D.S.; FERREIRA, S.R. LDL: from metabolic syndrome to instability of the atherosclerotic plaque. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006;50(2):334-43.
- 43- SUDHEESH, S.; PRESANNAKUMAR, G.; VIJAYAKUMAR, S., VIJAYALAKSHMI, N.R. Hypolipidemic effect of flavonoids from *Solanum melogena*. *Plant Foods for Human Nutrition* v.51, p.321-330, 1997.
- 44- TIJBURG, L.B.M.; MATTERN, T.; FOLTS, J.D.; WEISGERBER, U.M.; KATAN, M.B. Tea flavonoids and cardiovascular diseases: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* v.37, p.771-85, 1997.
- 45- XIE, Q.; NATHAN, C. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *J Leukoc Biol* v.56, p.576-682, 1994.
- 46- WEI, B.L.; WENG, J.R.; CHIU, P.H.; HUNG, C.F.; WANG, J.P.; LIN, C.M. Anti-inflammatory flavonoids from *Artocarpus heterophyllus* and *Artocarpus communis*. *J Agric Food Chem.* v.53, p.3867-71, 2005.
- 47- WISEMAN, S.A.; BALENTINE, D.A., FREI, B. Antioxidants in tea. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* v.37, p.705-718, 1997.
- 48- YOKAZAWA, T.; DONG, E.; LIU, Z.W.; SHIMIZU, M. Antioxidative activity of flavones and flavonols in vitro. *Phytotherapy Research* v.11, p.446-1997 446-449.
- 49- ZHANG, Y.H.; PARK, Y.S.; KIM, T.J.; FANG, L.H.; AHN, H.Y.; HONG, J.T.; KIM, Y.; LEE, C.K.; YUN, Y.P. Endothelium-dependent vasorelaxant and antiproliferative effects of apigenin. *Gen Pharmacol.* v.35, p.341-7, 2000.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Dr. Tanus Jorge Naguem
 Dep. Química UFOP
 CEP: 35400-000 Ouro Preto - MG
 E-mail: tanus@ufop.br

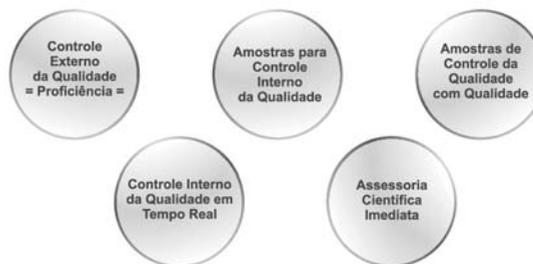


Programa Nacional de Controle de Qualidade

Participe!

www.pncq.org.br
pncq@pncq.org.br

Tradição com a Qualidade



(21)2569-6867

Efeito da pasteurização sobre os níveis de IgA secretora do leite humano maduro*

Effect of pasteurization on secretory IgA levels from breast human milk

Fabrcio Andrade Martins Esteves¹; Vanessa de Albuquerque Silva¹ & Larissa Marques Maciel¹

RESUMO - Introdução: A IgA é a imunoglobulina predominante nas secreções externas humanas e se apresenta como barreira humoral primária fornecendo proteção aos epitélios mucosos contra infecções por micro-organismos enteropatógenos ambientais. Materiais e Métodos: Foram obtidas 40 amostras de 5 mL de leite materno maduro doados de forma aleatória e voluntária por 20 mães rotineiramente atendidas pelo Banco de Leite Humano do Instituto Materno Infantil de Pernambuco. Cada mãe doou, portanto, 10 ml de leite sendo 5 ml antes da pasteurização e 5ml após a pasteurização. A avaliação dos níveis de IgA nas referidas amostras foram determinadas por meio de ELISA quantitativo. Resultados: A pasteurização do leite humano maduro provocou perda de IgA secretora em todas as amostras de leite humano maduro analisadas. Discussão: A perda do conteúdo de IgA secretora em todas as amostras analisadas diminuiu a sua atividade imunomoduladora e anti-infecciosa do leite maduro para o lactente. Este fato ganha importância ao observarmos que a amamentação é também um mecanismo de proteção passiva para o neonato e protege a criança contra infecções por enteropatógenos ambientais aos quais, por possuir seu sistema imunológico imaturo e ainda em desenvolvimento, estão particularmente susceptíveis. Conclusões: A IgA secretora, ao impedir a colonização da mucosa intestinal por agentes infecciosos causadores de diarréia particularmente graves na infância deve ser preservada e a pasteurização provoca perda desta imunoglobulina.

PALAVRAS-CHAVE - Imunoglobulina A; Pasteurização; Banco de Leite

SUMMARY - Background: The secretory IgA is the most frequent immunoglobulin found in human secretions and acts like humoral barrier on mucosal epithelium against infection by environmental enteropathogenic microorganisms. Methods and Materials: Twenty voluntary mothers donated 10 ml of breast milk which 5 ml before the pasteurization and 5 ml after the pasteurization. The secretory IgA levels of the 20 breast milk samples were evaluate by quantitative ELISA. Results: There was a reduction of the secretory IgA levels in all analyzed samples. Discussion: The secretory IgA levels reduction, caused by pasteurization, affects the anti-infective properties of breast human milk to neonates. Children need to receive protective immunological factors by the breast-feeding because their immune system is still in development and are highly unprotected against enteropathogens. Conclusion: The secretory IgA, prohibiting the colonization intestinal mucosal epithelium by enteropathogenic microorganisms prevents the infantile diarrhea and should be preserved from pasteurization which causes loss of this immunoglobulin.

KEYWORDS - Immunoglobulin A; breast human milk; Milk Bank

INTRODUÇÃO

A IgA é a imunoglobulina predominante nas secreções externas humanas e se apresenta como barreira humoral primária fornecendo proteção aos epitélios mucosos contra infecções por micro-organismos patógenos ambientais (9). Particularmente no leite materno, a IgA é produzida em quantidade aproximada de 0,5 – 1,0 g/dia por meio das glândulas mamárias (7). É relevante, portanto, notar a importância da presença da IgA no leite humano atuando como componente imunológico de proteção contra a infecção de recém-nascidos e lactentes por micro-organismos patógenos, uma vez que neonatos não apresentam respostas imunológicas maduras (6) em virtude principalmente da baixa produção de IgAs (4). Vale salientar que a ocorrência de diarréias infecciosas causadas por micro-organismos enteropatogênicos em recém-nascidos pode provocar quadro de desnutrição e desidratação graves, chegando a ocasionar seqüelas permanentes no sistema nervoso central (5). Existem, porém, fatores de proteção não-imunológicos que, em conjunto com a IgA, impedem a infecção por micro-organismos enteropatógenos: a flora bacteriana normal, que inibe o crescimento de patógenos potenciais; o peristaltismo que mantém o fluxo dos constituintes luminiais reduzindo, assim, a interação dos potenciais patógenos com as células do epitélio; substâncias como o suco gástrico e os sais biliares intestinais que fornecem um micro-ambiente desfavorável ao crescimento de patógenos; secreções mucosas que se apresentam como barreira impedindo a interação entre patógenos e epitélio e a presença de substâncias como a lisozima, a lactoferrina e a

lactoperoxidase que possuem efeito inibitório contra alguns micro-organismos (8).

Sendo a pasteurização a forma mais comumente utilizada como processo físico de inativação de micro-organismos patogênicos que porventura estejam presentes no leite humano ordenhado e, sendo esta uma técnica largamente utilizada em Bancos de Leite Humano, avaliamos o efeito da pasteurização de amostras de leite humano sobre a IgA secretora.

Este estudo avaliou o efeito da pasteurização, processo físico de esterilização rotineiramente utilizado em bancos de leite humano, a IgA secretora do leite humano maduro.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram obtidas 40 amostras de 5 ml de leite materno maduro do Banco de Leite Humano do Instituto Materno Infantil Professor Fernando Figueira (IMIP) coletadas em tubos estéreis e doadas voluntariamente por 20 pacientes. Cada mãe doou, portanto, 10 ml de leite sendo 5 ml antes da pasteurização e 5ml após a pasteurização.

Inicialmente foi obtida uma equação linear que correlacionou diferentes concentrações de IgA secretora e suas respectivas absorvâncias a 492 nm por meio de ensaio imunoenzimático quantitativo.

O conteúdo lipídico das amostras de leite humano maduro foi removido após ser centrifugado por 2 horas a 105000 g a 2°C em ultracentrífuga HIMAC-CENTRIFUGE (HITACHI). Após a centrifugação, formou-se uma película de consistência semi-sólida na parte superior do colostro, correspondente aos lipídios, que foi desprezado após a retirada cuidadosa da fase líquida com auxílio de uma pipeta

Recebido em 15/07/2008
Aprovado em 17/11/2009

*Instituto Materno Infantil Professor Fernando Figueira (IMIP)

Pasteur. O leite humano livre de lipídios foi então diluído 1:2 em NaCl 0,15M e teve o seu pH ajustado para 4,6 com tampão acetato/ácido acético 2M. A remoção da caseína presente no nas amostras de leite humano foi feita submetendo-se a mistura desprovida de lipídios a centrifugação por 2 horas, a 40000 rpm (105400G) a 2°C, na mesma ultracentrífuga acima citada. Foi obtido, assim, um precipitado esbranquiçado de caseína que foi desprezado após a retirada cuidadosa do sobrenadante. O sobrenadante livre de lipídios e caseína, foi concentrado sob pressão negativa e dialisado contra tampão Tris-HCl 0,01M, pH 8,0. (10). Uma alíquota de 50µl de cada amostra, previamente desprovida de lipídios e caseína, era coletada antes do processo de pasteurização e uma nova alíquota também de 50µl, após a pasteurização a fim de se determinar as absorbâncias em ELISA quantitativo que, uma vez inseridas na equação da curva padrão anteriormente obtida, revelavam a concentração de IgA secretora (µg/ml) presente na amostra.

RESULTADOS

A figura 1 demonstra a relação entre diferentes concentrações de IgA versus as respectivas absorbâncias em ensaio imunoenzimático (ELISA) quantitativo.

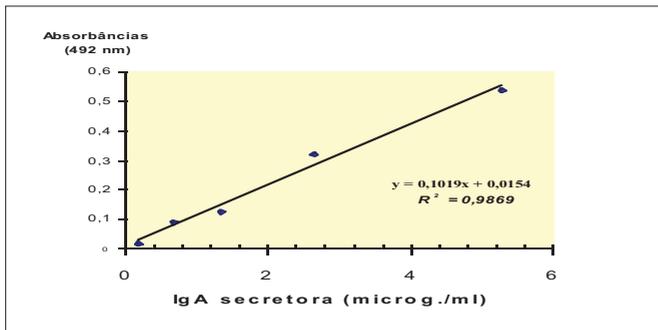


Figura 1: Curva padrão de diferentes concentrações de IgAs (µg/ml) versus absorbâncias (492 nm), em ELISA quantitativo.

A figura 2 demonstra o efeito da pasteurização sobre a concentração de IgA total nas 20 amostras de leite humano analisadas por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA) no qual, as densidades ópticas obtidas a 492 nm, interpoladas na equação da curva padrão [Absorbâncias_{492nm}] versus [IgA secretora].

Houve decréscimo de grau variado no conteúdo de IgA secretora em todas as amostras analisadas.

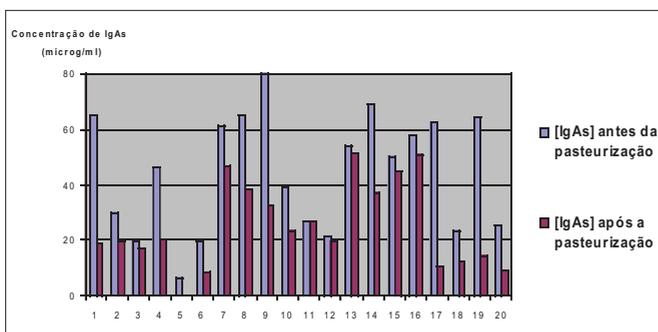


Figura 2: Concentração de IgA total (µg/ml) nas amostras de leite humano antes e após a pasteurização.

O leite humano é o produto da secreção das glândulas mamárias quando estas são estimuladas pelo hormônio prolactina. Cada mama é formada por cerca de 20 a 25 lóbulos de tecido glandular, cada um destes com milhões de alvéolos capazes de armazenar o leite secretado após ser produzido pelas células do epitélio glandular mamário. O primeiro leite a ser produzido é o colostro e este se apresenta como um líquido viscoso, espesso e de cor variável, porém, predominantemente amarelada. Após cerca de 3 a 7 dias após o parto, a secreção mamária aumenta sua fluidez, seu volume e sua cor varia progressivamente do branco cremoso ao branco azulado. Forma-se assim, o leite de transição que se transforma em leite maduro definitivo no período aproximado de 10 a 15 dias após o parto (8).

O leite humano maduro, portanto, é o produto da secreção láctea da nutriz, livre de colostro e obtido a partir do 15º dia pós-parto, em média (9).

Devido à sua complexidade biológica, o leite humano é considerado uma substância viva, com atividade protetora e imunomoduladora não somente promovendo proteção contra infecções e alergias, mas também estimulando o desenvolvimento adequado do sistema imunológico e a maturação do sistema digestivo e neurológico do recém-nascido (1).

Segundo Almeida, a pasteurização promove uma redução aproximada de 35,4% do conteúdo de IgA secretora. Admitindo este referencial, a queda percentual média do conteúdo de IgAs das amostras de leite humano obtida neste trabalho foi ligeiramente superior (42,31%) .

Tendo em vista o relevante papel de proteção imunológica da IgA secretora do leite humano para o lactente no combate e prevenção de infecções por micro-organismos enteropatógenicos, ressaltamos a importância da busca de procedimentos alternativos à pasteurização que também proporcionem a inativação de micro-organismos no intuito de melhor preservar o conteúdo do referido anticorpo durante o aleitamento de crianças em fase de lactação.

Observamos que a pasteurização do leite humano maduro provocou perda do conteúdo de IgA secretora em todas as amostras analisadas diminuindo, assim, a sua atividade imunomoduladora e anti-infecciosa para o lactente. Este fato ganha importância ao observarmos que a amamentação é também um mecanismo de proteção passiva para o neonato e protege a criança contra infecções por enteropatógenos ambientais aos quais, por possuir seu sistema imunológico imaturo e ainda em desenvolvimento, estão particularmente susceptíveis.

A IgA secretora pode impedir a colonização da mucosa intestinal por agentes infecciosos causadores de diarreia, particularmente, graves na infância tais como *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* e *Giardia lamblia* deve ser preservada. Sabe-se que há mudança de composição protéico-calórica no decorrer da mamada onde o leite do início ou leite anterior é rico em proteínas e pobre em lipídios enquanto que o leite do fim (ou leite posterior) é rico em lipídios e pobre em proteínas, dentre estas, ressaltamos a pouca presença de IgA secretora. Observamos em nosso estudo que os níveis de IgA secretora nas amostras analisadas demonstrou variações importantes. Em algumas amostras os níveis de IgA secretora foram quase indetectáveis por meio de ELISA quantitativo. Associamos esse fato à presença de leite maduro posterior entre as amostras analisadas. Neste caso, torna-se ainda mais importante a adoção de processos de esterilização que possam preservar a IgA secretora ao máximo uma vez que boa parte do leite humano doado

para os Bancos de Leite, ao serem pasteurizados, são destinados a recém-nascidos pré-termo e em UTIs neonatais. Consideramos importante a realização de mais estudos que possam avaliar a funcionalidade da IgA secretora do leite humano que persiste após o processo de pasteurização uma vez que a manutenção da integridade desta biomolécula garante também a proteção tão necessária ao recém-nascido.

CONCLUSÕES

A pasteurização promove perda do conteúdo de IgA secretora do leite humano maduro diminuindo, assim, a sua propriedade imunoprotetora para o recém-nascido que, por sua vez, possui seu sistema imunológico em desenvolvimento e está particularmente susceptível à infecções por enteropatógenos ambientais causadores de diarreia.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a todas as participantes que generosamente participaram e tornaram possível a realização desta pesquisa e a Dra. Vilneide Braga por permitir que este trabalho fosse realizado no ambiente no Banco de Leite Humano do Instituto Materno Infantil Professor Fernando Figueira (IMIP).

REFERÊNCIAS

1. AKRÉ, J. (10); Alimentação Infantil: bases fisiológicas. São Paulo. Instituto de Saúde. Versão em português, 1994.
2. ALMEIDA, J. A.G. (9); O papel dos Bancos de Leite Humano no Incentivo ao aleitamento materno. In: José Dias Rego. Aleitamento Materno. Rio de Janeiro. 1a.Edição. Editora Atheneu, 2000.

3. BRANDTZAEG PER. (8); Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed infant. Elsevier Science; 2003.
4. CRAVIOTO, A. (5); Presencia de factores específicos em leite materna contra cepas de Escherichia coli causantes de diarreia em humanos. Gaceta Médica de México. México. V.126,n.1, p.35-46, 1990.
5. KODA, Y.K.L. (4); Alergia alimentar. Diarreia Crônica na Infância. Edição única. São Paulo – SP: Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda, 1986, 111-130p, v.28.
6. ARDYTHE L Morrow, PhD, JOSEFA M. Rangel (3); Human Milk Protection Against Infectious Diarrhea: Implications for Prevention and Clinical Care. Seminars in Pediatric Infectious Diseases; p. 223-228, 2004.
7. SERVA V.M.S.B.D. (2); Nutrição. In: Aleitamento Materno; 151-158p.
8. STROBER, W.; Fuss, I. J. (6); O Sistema Imunológico das Mucosas. In: Stites P.D., Terr A.I. & Parslow. Imunologia Médica. Nona edição. Rio de Janeiro – RJ: Editora Guanabara Koogan S.A., 2000.
9. UNDERDOWN, B.J, Schiff JM. (1); Immunoglobulin A: Strategic Defense Initiative at the Mucosal Surface. In: Paul W. E.. Annual Review of Immunology. 1a. Edição. Palo Alto, Califórnia-USA: Annual Reviews Inc., 1986.
10. ZAHA, M.M. (7); Purificação de IgA secretora (IgAs) de colostro humano e padronização de imunodifusão radial para a obtenção de valores "críticos" mínimos de IgAs na saliva de crianças brasileiras em diferentes grupos etários. Revista Brasileira de Análises Clínicas, Porto Alegre, v.18, n.3, 67-86p, 1986.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Associação Caruaruense de Ensino Superior – ASCES
Avenida Portugal, 584 – Santa Maria Gorete
CEP: 55016-901 Caruaru, PE
Telefone para contato: (81) 21032000
Email: andrade.fab@gmail.com

TEAC

Título de Especialista em Análises Clínicas

A avaliação prática do conhecimento em análises clínicas.

Valorize a sua profissão
e sua carreira

Inscreva-se!!!

www.sbac.org.br

Realização:



Prospecção de leveduras em secreção vaginal e correlação com hemograma e dosagem de glicose

Prospection of yeasts in vaginal secretion and correlation with hemograma and dosage of glucose

Bruno Severo Gomes^{1,5}, Adriana Nunes de Lima³, Rejane Pereira Neves², Oliane Maria Correia Magalhães², Viviana Giampaoli⁶, Ana Lúcia Figueiredo Porto^{4,5} & Lusinete Aciole de Queiroz²

RESUMO - No período compreendido entre outubro de 2003 e agosto de 2004, foram realizadas coletas de secreção vaginal para exame micológico em 146 mulheres: 12 grávidas, 11 com sintomas e 1 sem sintomas; 134 não grávidas, 117 com sintomas e 17 sem sintomas de levedurose vaginal, atendidas no ambulatório de ginecologia do Centro de Saúde Manuel Caldas de Araújo, Cidade do Paulista-PE. Em 60% das amostras de secreção vaginal, foram detectadas leveduras ao exame direto e foi obtida cultura. Em 27 % não foram observadas estruturas fúngicas ao exame direto e cultura não foi obtida. Em 13 % foram observadas estruturas fúngicas ao exame direto e cultura não foi obtida. Foram isoladas leveduras pertencentes aos gêneros *Candida* (82%), *Trichosporon* (9%), *Rhodotorula* (8%) e *Kloeckera* (1%). Através da análise estatística o número de hemácias foi a única variável no hemograma que demonstrou correlação com a presença de leveduras na secreção vaginal.

PALAVRAS-CHAVE - Leveduras, leveduroses, secreção vaginal, hemograma, glicose.

SUMMARY - Between October 2003 and august 2004 collection of vaginal secretion were preceded to mycological exam in 146 women: 12 pregnant, from which 11 with symptoms and 1 without symptoms; 134 non-pregnant, from which 117 with symptoms and 17 without symptoms of vaginal levedurose, attended at gynecology ambulatory from Manuel Caldas de Araújo Hearth Center, Paulista-PE. In 60% off the samples of vaginal secretion, yeasts were detected by direct exam and culture. In 27% fungi structures were not observed by direct exam and culture was not obtained. In 13% were observed fungi structures by direct exam and culture was not obtained. Yeasts belonging to the genera *Candida* (82%), *Trichosporon* (9%), *Rhodotorula* (8%) and *Kloeckera*(1%) were isolated. Through the analysis statistics the number of hemácias was the only variable in the hemograma that demonstrated correlation with the presence of yeasts in the vaginal secretion.

KEYWORDS - yeasts, micoses, vaginal secretion, blood examination, glucose.

INTRODUÇÃO

Leveduras são fungos unicelulares que se reproduzem predominantemente por brotação e ou fissão. Estão amplamente distribuídas em natureza e têm sido isoladas do homem, animais, alimentos, vegetais, ar, solos e águas^{1,15, 17, 19}. As leveduroses compreendem todas as micoses determinadas por fungos do grupo das leveduras. Essas infecções, em especial as candidoses, vêm assumindo hoje papel de grande relevância na patologia humana. Diversas espécies de leveduras tem sido isoladas da vulva e da vagina, em casos normais e de vulvovaginite¹⁷.

A vagina é uma passagem tubular que conecta a vulva à cérvix uterina e é limpa diariamente pelas secreções que lubrificam o trato vaginal. O corrimento vaginal normal, referido como leucorréia, consiste de aproximadamente 1.5 ml do fluido diário vaginal, que é sem odor, claro, branco e viscoso. Este corrimento fisiológico consiste de muco endocervical, soro transudato dos canais capilares vaginais, microbiota vaginal endógena e células epiteliais. Um aumento nas secreções é normal durante a ovulação, durante a gravidez, seguindo a menstruação e com o excitação sexual ou alterações emocionais²⁹.

A vagina normalmente tem pH entre 3,8 e 4,0 que constitui barreira de defesa do sistema genital, pois esta acidez é hostil a certos microrganismos, com exceção dos fungos. A microbiota do trato genital pode evitar colonização por patógenos e respectivas doenças, no entanto, devido a certas circunstâncias os membros da microbiota podem causar várias ginecopatias³.

O trato genital feminino pode ser acometido por processos inflamatórios e infecciosos, os quais são diagnosticados pela análise da secreção vaginal⁹.

Sintomas vaginais estão entre as preocupações mais comuns relacionados com a saúde das mulheres principalmente que estão na idade reprodutiva. Estes sintomas podem ocorrer em mulheres que são casadas ou solteiras, sexualmente ativas ou abstinentes, bem como as de pré ou pós-menopausa²⁹.

Em 1840 Wilkinson demonstrou a presença de levedura na vagina, contudo, ainda se discute o papel que esses fungos desempenham na etiopatogenia das vulvovaginites uma vez que é comum a presença de espécies de *Candida* na secreção vaginal, mesmo sem corrimento^{16, 17}.

Gravidez, diabetes, uso de antibióticos, corticóides e contraceptivos orais, baixa do pH vaginal, anemia e dieta rica em carboidratos estão entre os fatores que aumentam a susceptibilidade a candidose vaginal¹⁸.

A candidose vulvovaginal tem recebido escassa atenção das autoridades de saúde pública, agências de fomentos e pesquisadores. Dados epidemiológicos sobre fatores de risco e mecanismos de patogenicidade continuam sendo inadequadamente estudados e mais importante ainda, critérios de cuidados e terapia continuam indefinidos³².

Em levedurose vaginal pode haver ou não correlação entre quantidade de células de levedura e intensidade sintomática²². Na literatura disponível não foram encontrados trabalhos correlacionando os resultados de detecção de leveduras na vagina de mulheres grávidas com e sem sintomas, com mulheres não grávidas com e sem sintomas. Outro aspecto é

Recebido em 01/08/2008

Aprovado em 17/11/2009

¹Doutorando em Ciências Biológicas, área de concentração microbiologia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

²Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

³Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

⁴Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE

⁵Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

⁶Departamento de Estatística - Universidade de São Paulo, São Paulo-SP

a falta de informações sobre alterações hematológicas e taxas de glicose em mulheres acometidas por levedurose vaginal. Segundo Pagana; Pagana²³ o hemograma completo consiste em uma série de testes efetuados com amostras de sangue, que fornecem inúmeras informações sobre o sistema hematológico e muitos outros sistemas orgânicos.

Portanto, este trabalho teve como objetivos: Detectar leveduras em secreção vaginal de mulheres grávidas e de mulheres não grávidas com e sem sintomas, atendidas pela rede pública de saúde da Cidade do Paulista-PE, correlacionar os resultados com o hemograma e dosagem de glicose. Promover uma divulgação científica para esclarecimento, controle, prevenção e profilaxia de leveduroses vaginais; oferecer através dos resultados suporte científico e informações à equipe médica do serviço público de saúde da Cidade do Paulista, possibilitando prevenção e tratamento de leveduroses vaginais.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Descrição da área da casuística

A Cidade do Paulista localiza-se na Mesorregião Metropolitana. Microrregião do Recife a 15 km ao norte da capital de Pernambuco. Segundo dados do Censo 2000 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE a população total é de 262.072 habitantes, sendo 124.889 homens e 137.183 mulheres.

Pacientes

Entre os meses de outubro de 2003 e agosto de 2004, no Centro de Saúde Manuel Caldas de Araújo, localizado no bairro de Arthur Lundgren I na Cidade do Paulista-PE, foram atendidas mulheres grávidas e mulheres não grávidas com e sem sintomas, para averiguação de levedurose vulvovaginal. As pacientes eram provenientes da ginecologia, clínica médica e pediatria. Foram solicitados das mesmas mulheres o hemograma e a dosagem de glicose.

As pacientes foram agrupadas cronologicamente segundo a data de coleta dos dados, sendo atribuído a cada uma delas um número de identificação, para posterior análise estatística. Foi criado um banco de dados em planilha, no programa *Excel/Office* 2000 com todas as variáveis descritas anteriormente.

Locais das coletas

A coleta de secreção vaginal foi realizada no Centro de Saúde Manuel Caldas de Araújo. Arthur Lundgren I Paulista -PE, e a realização do hemograma e dosagem de glicose no Centro de Endemias e Análises Médicas do Paulista (CEAMP). Arthur lundgren I Paulista -PE.

Instruções antes das coletas

As indicações dos médicos eram para fins clínicos e de pesquisa. As pacientes recebiam os resultados dos exames micológico da secreção vaginal, hemograma e dosagem de glicose e voltavam ao médico para nova consulta. Os dados obtidos foram utilizados para pesquisa, ficando todas as pacientes em anonimato. Antes da coleta, as pacientes receberam explicações acerca da investigação e consentiram em sua inclusão na pesquisa assinando um termo de consentimento livre e esclarecido para realização do estudo. Em pacientes menores de idade, um responsável, em geral, a mãe sempre acompanhava todo o procedimento. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, protocolo nº 304/2003-CEP/CCS. A

paciente foi previamente instruída para que a coleta fosse realizada no dia certo e nas seguintes condições para coleta de secreção vaginal: Não fazer uso de creme vaginal por 15 dias, abstinência sexual de pelo menos 72 horas antes da coleta, não usar talco na região pubiana, não estar menstruada e fazer higiene adequada com água e sabão.

Coleta de secreção vaginal e procedimentos laboratoriais

A coleta da secreção vaginal foi realizada após consulta com médicos, os quais encaminharam as pacientes para a realização do exame micológico.

A coleta foi realizada, utilizando "swab" registrado no ministério da saúde, próprio para coleta de secreções em geral, dentro do prazo de validade e aberto somente na hora do uso. O "swab" era esterilizado e umedecido em soro fisiológico adicionado de 50mg de cloranfenicol/L contido em tubos de ensaio. Não existiram riscos para o sujeito da pesquisa, pois a coleta foi realizada na entrada do canal vaginal, não necessitando desta forma uso de espelho ou outro instrumento que possa causar dano ou agressão à mucosa vaginal. No entanto o procedimento causava inibição, por parte de determinadas pacientes.

Após os procedimentos laboratoriais, amostras clínicas, instrumentos para manipulação das amostras clínicas, foram esterilizados em autoclave, e descartada dentro das normas de material hospitalar.

Exame direto da secreção vaginal

O exame direto foi realizado a fresco e quando necessário clarificado com solução aquosa a 20 % de hidróxido de potássio (KOH).

Obtenção de cultura primária, purificação e identificação de leveduras

Para a obtenção de cultura, as amostras de secreção vaginal foram semeadas por estrias transversais e longitudinais na superfície de ágar de Sabouraud adicionado de 0,5 % de extrato de levedura e de 50 mg de cloranfenicol/L contido em placas que foram mantidas à temperatura ambiente (TA = 28°C ± 1° C) por até 15 dias.

A medida que surgiam eram determinadas as unidades formadoras de colônia (UFC). Para purificação as colônias foram suspensas em água destilada esterilizada adicionada de 50mg/L de cloranfenicol; destas 0,2 ml foram semeados por espalhamento radial na superfície do meio de Sabouraud + cloranfenicol contidos em placa. Depois de purificadas as culturas foram mantidas em ágar Sabouraud adicionado de 0,5 % de extrato de levedura, contido em tubos e mantidas a temperatura ambiente (TA = 28°C ± 1° C).

Para identificação de leveduras foram adotados os critérios preconizados por Lodder¹⁹, Kreger-van Rij¹⁵ e Barnett *et al.*¹, os quais se baseiam em provas morfológicas e fisiológicas. Os meios de cultura foram preparados segundo Lacaz *et al.*¹⁷ e mantidos à temperatura ambiente durante 72 horas para controle de esterilização.

Hemograma e dosagem de glicose

No Centro de Endemias e Análises Médicas do Paulista - CEAMP, o sangue foi coletado para realização do hemograma cujos resultados foram obtidos automaticamente pelo aparelho ABX Micros 60 da Biosystems e através da análise do filme sangüíneo e dosagem de glicose pelo método enzimático. Foram repetidos os hemogramas e as dosagens de glicose quando os valores dos resultados obtidos estavam fora dos padrões de normalidade.

Análise estatística

Foi realizado um estudo observacional, com variável discreta, onde as amostras de secreção vaginal, sangue e dados do questionário epidemiológico foram obtidos aleatoriamente, no qual foram consideradas mulheres grávidas e não grávidas, tendo se verificado a presença ou ausência de sintomas em cada grupo. Também foram analisados possíveis fatores de risco, como situação sócio-econômica, índices hematológicos, dosagem de glicose e outros dados. Foi escolhido para análise estatística do exame direto e cultura, o modelo de regressão logística que inclui as variáveis analisadas. A análise estatística foi realizada no Departamento de Estatística da Universidade Federal de Pernambuco.

RESULTADOS

Exame direto e cultura

Foram realizadas coletas de secreção vaginal para exame micológico em 146 mulheres: 12 grávidas, 11 com sintomas e 1 sem sintomas; 134 não grávidas, 117 com sintomas e 17 sem sintomas de levedura vaginal.

O exame micológico das amostras de secreção vaginal, através do exame direto e cultura forneceu os seguintes resultados: Em 60% das amostras de secreção vaginal, foram observadas estruturas fúngicas ao exame direto e foi obtida cultura. Em 27 % não foram observadas estruturas fúngicas ao exame direto e cultura não foi obtida. Em 13 % foram observadas estruturas fúngicas ao exame direto e cultura não foi obtida.

Não foi obtida cultura das amostras de secreção vaginal cujo exame direto foi negativo. Os resultados demonstram a importância e relevância do exame microscópico direto na detecção de leveduras em secreção vaginal.

Em 9 amostras de secreção vaginal de mulheres grávidas com sintomas, foram observadas estruturas fúngicas ao exame direto e obtidas 8 culturas. Em 1 amostra de secreção vaginal de mulher grávida sem sintomas foram observadas estruturas fúngicas ao exame direto com obtenção de cultura. Em 11 amostras de secreção vaginal de mulheres não grávidas sem sintomas, foram observadas estruturas fúngicas ao exame direto com obtenção de cultura; em 86 amostras de secreção vaginal de mulheres não grávidas com sintomas foram observadas estruturas fúngicas ao exame direto com 73 culturas obtidas.

O exame direto da secreção vaginal revelou a presença de células de leveduras com brotação simples, múltipla e pseudomicélio.

A presença de pseudomicélio observado ao exame direto da secreção vaginal indica que a razão de chances de se obter cultura é 10.272.31 vezes maior do que da secreção vaginal na qual o pseudomicélio não foi observado.

No exame direto, o número de células por campo variou de 0,0 a 15 células por campo, com média de 4,29 células por campo. Da secreção vaginal de mulheres grávidas com sintomas foram obtidas 592 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) e das mulheres sem sintomas 84 (UFC); da secreção vaginal das não grávidas com sintomas foram obtidas 3.366 (UFC) e daquelas sem sintomas 432 (UFC). O número de (UFC) foi de 0,0 até 85, com média geral de 7.69 (UFC).

Da secreção vaginal de 75% das mulheres grávidas foram isoladas 9 amostras de leveduras sendo 8 de mulheres com sintomas e 1 de mulher sem sintomas; da secreção vaginal de 59% das mulheres não grávidas foram isoladas 84 amostras de leveduras sendo 73 de mulheres com sintomas e 11 de mulheres sem sintomas.

Em relação a obtenção de cultura de secreção vaginal de

mulheres grávidas e não grávidas, foi observado que a razão de chances de se obter cultura de levedura de secreção vaginal de uma mulher grávida é 0.0043 vezes maior do que a razão de chances de se obter cultura de secreção vaginal de uma mulher não grávida. Esse resultado mostra que a gravidez no grupo estudado se apresenta como um fator predisponente a ocorrência de levedura na secreção vaginal.

Leveduras isoladas

De 146 amostras de secreção vaginal foram isoladas leveduras pertencentes aos gêneros *Candida* (82%); *Trichosporon* (9%); *Rhodotorula* (8%) e *Kloeckera* (1%) (Figura 1). Foram identificadas 23 espécies de leveduras:

Candida albicans (Robin) Berkhout (1923)
Candida azyma (van der Walt *et al.*) Meyer; Yarrow (Yarrow; Meyer 1978)
Candida geochares (van der Walt *et al.*) Meyer; Yarrow (Yarrow; Meyer 1978)
Candida guilliermondii (Castellani) Langeron *et* Guerra (1938)
Candida maritima (Siepmann) van Uder; Buckley (Meyer; Ahearn 1983)
Candida membranaefaciens (Lodder; Kreger-van Rij) Wickerham; Burton (1954)
Candida obtusa (Dietrichson) Van Uder *et* Do Carmo-Souza *ex* Van Uder *et* Buckley
Candida parapsilosis (Ashford) Langeron; Talice (1932)
Candida robusta Diddens; Lodder
Candida sake (Saito; Ota) van Uder ;Buckley (Meyer; Ahearn 1983)
Candida salmanticensis (Santa Maria) van Uder; Buckley (Meyer; Ahearn 1983)
Candida shehatae Buckley; van Uden (1967)
Candida tropicalis (Castellani) Berkhout (1923)
Candida tsuchiyae Nakase; Suzuki (1985d)
Candida versatilis (Etchells; Bell) Meyer; Yarrow (Yarrow; Meyer 1978)
Kloeckera apiculata (Reess Emend. Klocker) Janke
Rhodotorula glutinis (Fresenius) Harrison (1928)
Rhodotorula graminis Di Menna (1958 a)
Rhodotorula minuta (Saito) Harrison (1928)
Rhodotorula pallida Lodder (1970)
Rhodotorula rubra (Demme) Lodder
Trichosporon cutaneum (De Beurm, Gougerot *et* Vaucher) Ota
Trichosporon inkin (Oho) Carmo-Souza *et* Van Uden

Entre as espécies isoladas, predominou *C. albicans* 33%; seguida de *C. tropicalis* 15%; *C. parapsilosis* 12%; *T. cutaneum* 5%; *C. shehatae* 4 %; *C. guilliermondii* 4%; *C. versatilis* 3%; *T. inkin* 3%; *R. minuta* 3%; *C. salmanticensis* 2%; *C. maritima*; *C. obtusa*; *C. robusta*; *C. sake*; *C. tsuchiyae*; *C. membranaefaciens*; *C. azyma*; *C. geochares*; *R. rubra*; *R. graminis*; *R. glutinis*; *R. pallida* e *K. apiculata* cada uma com 1%.

Na secreção vaginal das mulheres grávidas com sintomas foram isoladas *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. robusta*. Em grávidas sem sintomas, foi isolada apenas *R. minuta*.

Na secreção vaginal das mulheres não grávidas com sintomas foram isoladas *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. shehatae*, *C. guilliermondii*, *C. versatilis*, *C. Salmanticensis*, *C. sake*, *C. tsuchiyae*, *C. membranaefaciens*, *C. azyma*, *C. geochares*, *T. cutaneum*, *T. inkin*, *R. minuta*, *R. rubra*, *R. glutinis* e *R. pallida*. Em não grávidas sem sintomas foram isoladas *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. maritima*, *C. obtusa*, *R. minuta*, *R. graminis* e *K. apiculata*.

Em cinco ocasiões foram obtidas culturas com mais de uma espécie de levedura demonstrando a possibilidade de culturas mistas neste tipo de material.

Houve casos de associações de duas espécies apenas em mulheres não grávidas com e sem sintomas, nas com sintomas *C. parapsilosis* com *C. guilliermondii*, *R. pallida* com *R. rubra* e outra associação de *C. guilliermondii* com *T. cutaneum*. Nas sem sintomas, *C. obtusa* com *R. minuta* e outra associação de *R. graminis* com *C. parapsilosis*. (Figura 2).

Em relação a detecção das várias espécies de *Candida* em nosso trabalho, pode ser explicado pelo fato de que grande parte dos trabalhos disponíveis na literatura não realizam testes específicos para identificação a nível de espécie, ficando desta forma a identificação a nível de gênero, prejudicando entre outras coisas o conhecimento epidemiológico e o tratamento das leveduras vaginais.

Em relação a detecção de leveduras em secreção vaginal de mulheres grávidas e não grávidas com e sem sintomas, a literatura disponível mostra trabalhos relacionados com espécies de *Candida*. Nota-se uma falta de trabalhos descrevendo detecção de outros gêneros de leveduras, que podem estar na secreção vaginal.

Resultados do Hemograma e dosagem de glicose

Foram analisados no sangue coletado das pacientes os parâmetros, (He) hemácias, (Hb) Hemoglobina, (Ht) hematócrito, (VCM) volume corpuscular médio, (HCM) hemoglobina corpuscular média, (CHCM) concentração hemoglobínica corpuscular média, (PLA) contagem de plaquetas, (RDW) coeficiente de variação do volume eritrocitário médio, (LEU) leucócitos.

Nos hemogramas analisados, foi observado que 85% apresentavam na série vermelha normocitose e normocromia, na série branca 84% apresentavam leucócitos morfologicamente conservados, e na série plaquetária 100% morfologia conservada.

Através da análise estatística o número de hemácias foi a única variável no hemograma que demonstrou correlação com a presença de leveduras na secreção vaginal. Foi observado que 34% das pacientes apresentavam níveis de hemoglobina (< 12 g/dL), cujo valor de referência segundo Pagana; Pagana,²³ é de 12-16 g/dL em mulheres não grávidas e >12 g/dL em mulheres grávidas. A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera como anemia na gravidez os valores da hemoglobina abaixo de 11 g/dL. A anemia reduz a resistência da grávida a infecções e aumenta o risco de complicações da gravidez e do parto²⁶.

No estado não gravídico, o fluxo de ferro está principalmente na direção das células encarregadas da síntese de hemoglobina, esse vetor é modificado durante a gravidez com as células trofoblásticas da placenta, tornando-se o principal alvo do fornecimento de ferro¹³.

Neste estudo 50% das pacientes grávidas apresentavam valores de hemoglobina abaixo do preconizado pela (OMS). Nos outros parâmetros hematológicos não se observou correlação com a presença de leveduras em secreção vaginal. Nenhuma das pacientes tinha histórico clínico de diabetes, mas independente de ser ou não diabética como foi relatado anteriormente, todas as pacientes realizaram dosagem de glicose em jejum. Os níveis de glicose das pacientes em jejum variavam de 60 a 360 mg/dl, com média de 86 mg/dl. Análise estatística demonstrou que não existiu evidência de diabetes nem valor elevado da glicose em jejum com a presença de leveduras na secreção vaginal. Até o momento, a relação entre *diabetes mellitus* e candidose permanece apenas circunstancial, porém o aumento da glicemia e

eventual deficiência imunitária seguramente favorecem o aparecimento de tal infecção⁷.

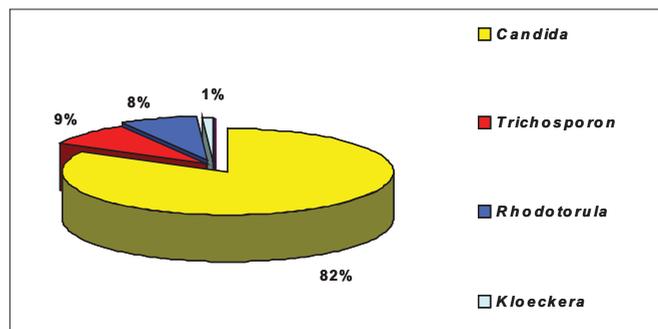


FIGURA 1. Gêneros de leveduras isolados da secreção vaginal das pacientes atendidas no Centro de Saúde Manuel Caldas de Araújo, Paulista-PE.

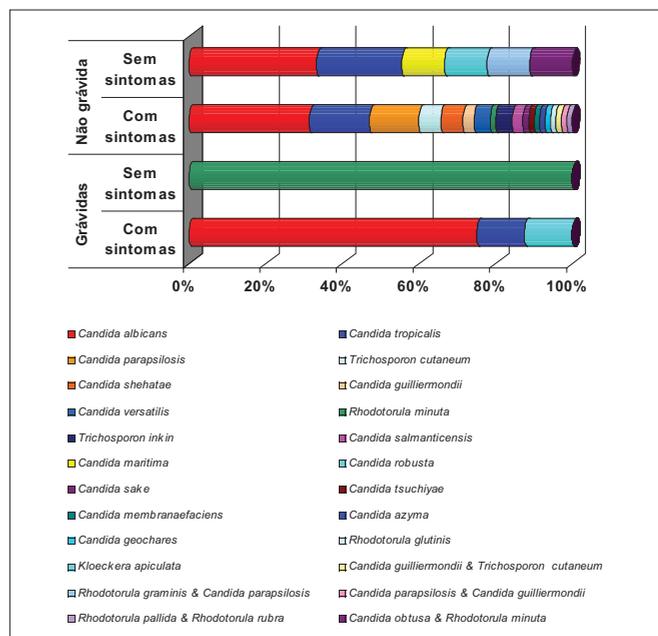


FIGURA 2. Leveduras isoladas de secreção vaginal de mulheres grávidas com e sem sintomas e de mulheres não grávidas com e sem sintomas.

DISCUSSÃO

Em nossos resultados não foi observada correlação entre o número de células de leveduras por campo com sintomas. Esta observação esta corroborada por Muller; Nold,²² que afirmam pode haver ou não correlação entre quantidade de células de levedura e intensidade sintomática.

Hopwood *et al.*¹¹ consideram que o número acima de 10 (UFC) de leveduras, obtidas com "swab" vaginal, como critério confiável para diagnóstico de leveduras. No entanto, alguns autores têm relacionado à presença de sintomas à quantidade de (UFC)³².

Carter; Jones⁴ estudaram a microbiota vaginal de 114 grávidas sem sintomas e 100 mulheres não grávidas sem sintomas. Leveduras foram isoladas de 32% das grávidas e de 14% do segundo grupo. Jones; Marin¹² realizaram estudo micológico em 52 mulheres grávidas e 16 não grávidas, encontrando as mesmas porcentagens dos autores anteriormente citados.

Bonafante,² e Franz,⁸ encontraram prevalência de leveduras em 45% de mulheres grávidas, Hardy *et al.*,¹⁰ em 38%

e Mattos *et al.*,²⁰ em 61%. Esses resultados diferem dos encontrados em nosso trabalho, onde a prevalência foi de 75% nas mulheres grávidas.

Segundo Bonafante,² e Franz,⁸ leveduras são encontradas na secreção vaginal de 11% a 13% de mulheres não grávidas, diferindo de nossos resultados onde a prevalência foi de 59%. Na Inglaterra, Kent,¹⁴ observou aumento dos casos de 28% para 37%, entre 1971 e 1981, monitorado por relatórios anuais em clínicas de Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST), ao passo que na Itália, Spinillo *et al.*³⁴ detectaram *Candida* em 34,1 das amostras clínicas de pacientes atendidas no ambulatório de Ginecologia da Universidade de Pádua.

Leveduras dos gêneros *Candida*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula* e *Trichosporon* têm sido isolados da vagina humana³¹.

Espécies de *Candida* são os agentes etiológicos mais comumente detectados, havendo consenso na literatura que *C. albicans* é o agente etiológico mais comum das vulvovaginites micóticas, ocorrendo em 80% a 95% dos casos³⁶. Contudo tem-se verificado um aumento na incidência de infecções causadas por outras espécies de *Candida*²⁹.

Estudo italiano demonstrou que a prevalência de vaginite fúngica causada por outras espécies de *Candida* cresceu de 9,9%, em 1988, para 17,2% em 1995 Spinillo *et al.*,³⁵. Embora as causas exatas do aumento da prevalência de outras espécies de leveduras sejam desconhecidas, varias evidencias mostram ocorrer seleção por parte dos fungos, diante dos diversos tratamentos²⁴.

Nos trabalhos de Eycler *et al.*,⁶ e Eckert *et al.*,⁵ foi detectada a presença de *C. albicans* em secreção vaginal de 30% a 40% das mulheres grávidas e em 15% a 20% das mulheres não grávidas. Diferindo de nossos resultados, em que *C. albicans* foi detectada na secreção vaginal de 19% das mulheres grávidas e em 81% das mulheres não grávidas.

Foi demonstrado por Moura²¹ que pode ocorrer colonização por mais de uma espécie de levedura em secreção vaginal de pacientes não grávidas com e sem sintomas.

Silva *et al.*,³⁰ relataram associação de *Candida parapsilosis* e *C. guilliermondii* em cultura de secreção vaginal de paciente sem sintomas, diferindo de nossos resultados cuja associação foi observada em paciente com sintomas.

Em estudo realizado com 404 mulheres na Venezuela, Suárez; Lancha³⁶ detectaram em 138 (34,16%) mulheres, leveduras em secreção vaginal, pertencentes aos gêneros *Candida* (88,49%), *Trichosporon* (10,79%) e *Rhodotorula* (0,72%). Porém diferentemente dos nossos resultados a identificação da espécie não foi relatada.

C. tropicalis foi a segunda espécie em frequência em nosso estudo, porém outros trabalhos mostram *C. tropicalis* em terceiro lugar de frequência.²⁸ Segundo Reife,²⁵ e Van Dick *et al.*³⁷ raramente é envolvida com casos de vulvovaginite. O isolamento de espécies de *Trichosporon* em nosso estudo deve ser atentamente observada pois ainda se discute o comportamento deste gênero e é sabido que o mesmo pode se comportar como agente oportunista.²⁷

Observamos em nossos resultados a detecção de muitas espécies de leveduras que não foram mencionadas em trabalhos relacionados com secreção vaginal como *C. shehatae*, *C. geochares*, *C. membranaefaciens*, *C. versatilis*, *C. tsuchiyae*, *C. azyma*, *C. maritima* e *C. sake* *C. glabrata* que é descrita em muitos trabalhos como a segunda espécie em frequência³⁸, não foi detectada em nossa população de estudo.

Com base no conjunto de dados levantados e resultados obtidos da análise estatística conclui-se que os sintomas não estão relacionados ao número de células de leveduras

observadas ao exame direto. A presença de pseudomicélio na secreção vaginal favorece a obtenção de cultura. A gravidez favorece ao isolamento de leveduras de secreção vaginal. Pode haver associação de duas espécies de leveduras na secreção vaginal. A ocorrência de uma determinada espécie de levedura na secreção vaginal, independe da condição fisiológica e clínica. A medida que aumenta o número de hemácias, diminui as possibilidades de isolamento de leveduras de secreção vaginal.

REFERÊNCIAS

1. BARNETT J.A.; YAMADA, T.; NOZAWA, Y. Yeasts: Characteristics and identification. 4ª ed. Cambridge, Cambridge: University Press, p 1002, 2000.
2. BONAFANTE, G.R. The vaginal fungi um pregnant women. Universidad de la Region Centro Occidental. School of Medicine, Barquisimeto, Lara State, Venezuela, 1969.
3. BROOKS, G.F.; BUTEL, J.S.; ORNSTOSN, L.N. Microbiologia médica. 20ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara, 1998.
4. CARTER, B.; JONES, C.P. A study of the vaginal flora in the formal female. Sth. med. J. (Bgham, Ala). 30:298-304, 1937.
5. ECKERT, L.O.; HAWES, S.E.; STEVES, C.E. Vulvovaginal candidiasis: clinical manifestations, risk factors, management algorithm. Obstetric Gynecology, v. 92, p. 757-65, 1998.
6. EYLER, A.E.; PIERSON, C.; REED, B.D. Improved diagnosis of candida vulvovaginitis using Diamond's media modi. ed. J Women's Health, v. 5, p. 79-84, 1996.
7. FISCHER, J.F.; CHEW, W.H.; SHADOWY, S.; DUMA, R.J.; MAYHALL, G.; HOUSE, W.C. Urinary tract infections to *Candida albicans*. Reviews of infectious diseases. 4: 107-11, 1982.
8. FRANZ, F. Häufigkeit des Pilz- und Trichomonadenbenfalls während der Schwangerschaft. Inaugural Dissertation, Wursburg, 1970.
9. GUIMARÃES, R.X.; GUERRA, C.C. Clínica e laboratório. Interpretação clínica das provas laboratoriais. 3ª ed. São Paulo. Sarvier, 1989.
10. HARDY, P.H.; NELL, E.E.; SPENCE, M.R.; HARDY, J.B.; GRAHAM, D.A.; ROSENBAUM, R.C. Prevalence of six sexually transmitted disease agents among pregnant inner-city adolescents and prancy outcome. Lancet, 1984.
11. HOPWOOD, V. Vaginal candidosis: relation between yeast counts and symptoms and clinical signs in non-pregnant womem. Genitourinary Medicine, 64: 331-4, 1988.
12. JONES, C.P.; MARTIN, D.S. Identification of yeastlike organisms isolated from the vaginal tracts of pregnant and nonpregnant women. Amererican Journal Obstetric. Gynecology 35:98-105, 1938.
13. KERRIDGE, C.; NICHOLAS, R.O. Drug resistance in opportunistic pathogens *Candida albicans* end *Candida glabrata*. Journal Antimicrob Chemother, 18 (suppl B), p.39, 1986.
14. KENT, H.L. Epidemiology of vaginitis. American Journal Obstetric Gynecology. 65:1168-76, 1991.
15. KREGER-VAN RIJ, N.J.W. The yeast : a taxonomic study. 3ª ed. Elsevier Sci. Publication: Amsterdam, 1984.
16. LACAZ, C.S. Candidíases. São Paulo. EDUSP. 1980.
17. LACAZ, C.S. Tratado de Micologia Médica. 9ª ed. São Paulo, Sarvier, 2002.
18. LINARES, L.M.; MARIN, C. Frequency of yeast of the genus *Candida* in humans , as pathogens and a part of normal flora. In : Proceedings of the Fourth International coference on the Mycosis. The block an white yeast. Washington, Pan American Health organization, p 124-133, 1978.
19. LODDER, J. The Yeast: a taxonomic study. Oxford: North Holland Publishing Company, p 1385, 1970.
20. MATTOS, A.H.S. Prevalência de leveduras do gênero *Candida* em secreção vaginal. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia. Rio de Janeiro, 163-6, 1993.
21. MOURA, M.E.G.M. Frequência e distribuição de leveduras em amostras de conteúdo vaginal. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 1984.
22. MULLER, J.; NOLD, B. Quantitative Aspekte der vaginalen mykodora und ihre Beziehungen zur Klinischen Symptomatik bei Kolpitis-Patientinnen. In

- Seeliger, HPR (Ed.): Gyno-Travogen monographie:21-30, Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford-Princeton 1981.
23. PAGANA, K.D.; PAGANA, T.J. Manual de testes diagnósticos e laboratoriais. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001.
24. REDONDO-LOPEZ, V.; LYNCH, M.; SCHMITT, C. Torulopsis glabrata vaginitis: clinical aspects and susceptibility to antifungal agents. *Obstetric Gynecology*. 76:651, 1990.
25. REIFE, C.M. Office gynecology for the primary care physician, part I. *Medicine Clinical North American* 80: 299-319, 1996.
26. RESENDE, J.; MONTENEGRO, C.A.B. *Obstetrícia fundamental*. 7ª ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1995.
27. RIPON, J. *Medical Mycology. The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes*. 3ra ed. Philadelphia. W.B. Saunders; 1988.
28. SCHMIDT, A.; NÖLDECHEN, C.F.; MENDLING, W.; HATZMANN, W.; WOLFF, M.H.. Oral contraceptive use and vaginal candida colonization. *Zentralbl Gynakol* 119(11): 545-9, 1997.
29. SHIMP, L.A. Vaginal and vulvovaginal disorders. In: Derard et al. *Handbook of no prescription drugs: an interactive approach to self care*. 13. ed. Washington, D.C. : American Pharmaceutical Association, 2002.
30. SILVA, J.O.; FRANCESCHINI, S.A.; CANDIDO, R.C. Presença de leveduras em mucosas e fezes de indivíduos aparentemente saudáveis e de pessoas com sintomas de infecção fúngica. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. 61(2), 113- 120, 2002.
31. SOBEL, J.D. Vaginitis due to *Saccharomyces cerevisiae*: Epidemiology, clinical aspects, and therapy. *Clinical Infection Disease*. 16: 93-9, 1993.
32. SOBEL, J.D. Candidal Vulvovaginitis. *Clinical Obstetric Gynecology*, Detroit, v. 36, n. 1, p. 153-65, 1993.
33. SOBEL, J.D, FARO, S. ; FORCE, R.W. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. *American Journal Obstetric Gynecology* 178:203-11, 1998.
34. SPINILLO, A.; CAPUZZO, E.; ACCIANNO, S.; SANTOLO, A.; ZARA, F. Effect of antibiotic use on the prevalence of symptomatic vulvovaginal candidiasis. *American Journal Obstetric Gynecology*. 180:14-7, 1999.
35. SPINILLO, A.; CAPUZZO, E.; GULMINETTI, R.; MARONE, P.; COLONNA, L.; PIAZZI, G. Prevalence of and risk factors for fungal vaginitis caused by non-albicans species. *American Journal Obstetric Gynecology* . 176:138-41, 1997.
36. SUAREZ, L.V.; LANCHI, M.R.P. Identificación de levaduras de exudados vaginales: características clínicas asociadas a la candidiasis. *Revista Cubana Medicina Tropical* 56(1):21-5, 2004.
37. VAN DYCK, E.; MEHEUS, A.Z.; PIOT, P. Diagnóstico de laboratório de las enfermedades de transmisión sexual. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 2000.
38. ZIARRUSTA, G.B. Vulvovaginitis candidásica. *Revista Iberoamericana de Micología*. 19: 22-24, 2002.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Bruno Severo Gomes
Rua Barão de Souza Leão, 723 Aptº 102B Boa Viagem.
CEP. 51030-300 Recife, Pernambuco.
Tel: 0XX81 8837-4486
E-mail: brunomicomed@yahoo.com.br

**Educação continuada à distância
é com a SBAC**

Navegue pelo portal SBAC E-Learning

www.sbac.org.br/ead



SBAC
eLEARNING

A mais perfeita tradução de proximidade!

Prevalência de resistência a proteína- C ativada (RPCA) em pacientes atendidos no laboratório médico Santa Luzia – Florianópolis – SC

Prevalence of activated protein C resistance (APCR) in patients attended in the medical laboratory Santa Luzia - Florianópolis – SC

Santos, J.D ¹; Zunino, J.N ¹ & Neiva, T.J.C.²

RESUMO - O avanço no conhecimento dos mecanismos que regulam a hemostasia possibilitou a identificação de alterações na coagulação sanguínea que estão na origem dos fenômenos trombóticos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a prevalência de RPCA em pacientes atendidos no Laboratório Médico Santa Luzia-Florianópolis,SC. Foram avaliados retrospectivamente 365 pacientes com idade variando de 5 a 81 anos, homens e mulheres com distúrbio trombótico. Os resultados mostraram que 12,9% dos pacientes tinham RPCA positivo, com uma maior prevalência em indivíduos do sexo feminino (68,1%) quando comparados com os do sexo masculino (31,9%).

PALAVRAS-CHAVE - Resistência a Proteína- C ativada; coagulação; prevalência

SUMMARY - The advancement in knowledge of the mechanisms governing the hemostasis enabled the identification of changes in blood clotting that are at the root of thrombotic phenomena. The objective of this study was to evaluate the prevalence of APCR in patients in the Medical Laboratory Santa Luzia-Florianópolis, SC. We retrospectively evaluated 365 patients with ages ranging from 5 to 81 years, men and women with thrombotic disorders. The results showed that 12.9% of patients had positive APCR, with a higher prevalence in female subjects (68.1%) compared with males (31.9%).

KEYWORDS - Resistance to activated protein-C; coagulation; prevalence

INTRODUÇÃO

A trombofilia pode ser definida como um grupo de condições genéticas ou adquiridas que predispõem ao desenvolvimento de trombose arterial ou venosa, sendo a doença tromboembólica venosa a manifestação clínica mais comum. Estes distúrbios afetam, a cada ano, cerca de 0,1% da população dos países desenvolvidos sendo uma importante causa de morbidade e mortalidade⁸. No Brasil, são raros os trabalhos publicados sobre a epidemiologia do tromboembolismo venoso⁷. Embora o aparecimento do tromboembolismo seja originário de distúrbio genético, outras condições adquiridas estão associadas ao seu desenvolvimento, tais como câncer, síndromes mieloproliferativas, síndrome antifosfolípideo, hiperhomocisteinemia, gravidez e cirurgias^{5,6}.

O desenvolvimento de trombofilias está intimamente ligado a defeitos nos mecanismos inibitórios da hemostasia secundária. Dentre os inibidores fisiológicos da coagulação temos o inibidor do fator tecidual (iFT), antitrombina e o sistema anticoagulante das proteínas C e S. Um importante passo para a elucidação dos eventos trombóticos foi a descoberta da resistência a proteína C ativada (RPCA)² que constitui cerca de 20 a 40% dos casos de trombose. Assim, constantes estudos são necessários no sentido de diagnosticar as causas destes eventos trombóticos e prevenir suas complicações. O objetivo deste trabalho foi verificar a prevalência de RPCA em pacientes com distúrbios trombóticos atendidos no Laboratório Médico Santa Luzia-Florianópolis,SC.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Casuística

Foram analisados retrospectivamente 365 pacientes que realizaram o exame de RPCA no Laboratório Médico Santa Luzia entre janeiro de 2003 e setembro de 2006.

Amostras

A coleta de sangue foi realizada em tubo contendo citrato de sódio a 0,32% final. A amostra foi imediatamente submetida a centrifugação durante 10 minutos a 2.000g a temperatura ambiente, o plasma obtido foi separado e congelado a -30°C até o momento de realização do teste.

Metodologia:

A determinação da Resistência a Proteína C ativada (RPCA) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Dahlbäck e cols² utilizando-se coagulômetro Behring Coagulation Timer® (Dade Behring Marburg).

RESULTADOS

Os resultados mostraram que 12,9% dos pacientes avaliados tinham RPCA positivo, com uma maior prevalência em indivíduos do sexo feminino (68,1%) quando comparados com os do sexo masculino (31,9%) (Tabela-1). A ocorrência de resultados positivos prevaleceu na faixa etária acima de 40 anos (figuras 1 a 3). A correlação de RPCA para as variáveis idade e sexo (figuras 4 e 5) não demonstraram variações significativas ($p > 0.05$).

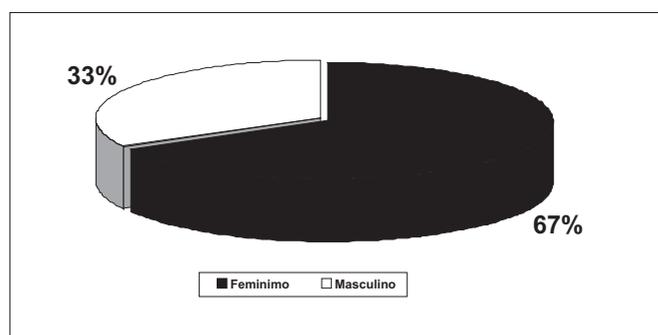


Figura-1: Distribuição dos Pacientes segundo o Sexo.

Recebido em 13/08/2008

Aprovado em 17/11/2009

¹Laboratório Médico Santa Luzia-Florianópolis-SC

²Curso de Especialização em Hematologia, Departamento de Análises Clínicas-CCS-UFSC

DISCUSSÃO

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a prevalência de RPCA em pacientes com distúrbios tromboticos a esclarecer atendidos no Laboratório Médico Santa Luzia – Florianópolis - SC. A população estudada constituiu-se de 365 pacientes cuja distribuição segundo o sexo foi 67% do sexo feminino e 33% do sexo masculino (Figura 1). Com relação a distribuição por idade, 89% dos pacientes tinham idade inferior a 65 anos enquanto 11% tinham idade superior a 65 anos (Figura 2). Os resultados obtidos demonstraram uma prevalência de RPCA 12,9 % na população estudada (Figura 3). Dos resultados positivos para RPCa, 68,1% eram do sexo feminino e 31,9% masculino (Tabela 1).

Estudos indicam que a prevalência deste fenômeno na população de pacientes com distúrbios tromboticos varia em aproximadamente 20% nos casos de trombose em indivíduos sem história prévia e, até 40% quando levado em consideração os casos dos pacientes que possuem história familiar^{8,10,11}. Convém lembrar que a RPCA é, em cerca de 92% dos casos, conseqüência de uma mutação do fator V da coagulação conhecida como fator V Leiden¹¹ contudo, outros fatores podem contribuir para o desenvolvimento de RPCA tais como: anticoncepcionais, gravidez, câncer, reposição hormonal e presença de anticorpos antifosfolídeos^{5,6,7}. Embora trabalhos demonstrem que a presença do fator V de Leiden, tanto em homozigose quanto em heterozigose, é detectado satisfatoriamente pelo teste de RPCA, um teste alterado não deve ser interpretado como sendo única e exclusivamente causado pela presença da mutação. De fato, a presença de RPCA é caracterizada como fator de risco para o desenvolvimento de eventos tromboticos independentemente da presença do fator V de Leiden.⁴

Em nosso estudo, a maior frequência de RPCA positivos foi observada na população de sexo feminino, (Tabela 1). Este número elevado pode ser devido a uma maior exposição a fatores ambientais. Neste sentido, vários estudos demonstram que o aumento no desenvolvimento de RPCA na ausência de fator V de Leiden em mulheres está frequentemente ligado a alterações hormonais que ocorrem na gravidez, uso de anticoncepcionais orais e durante terapia de reposição hormonal.^{1,5,7,9}. No caso dos anticoncepcionais orais, esta resistência parece estar associada a diminuição da concentração no plasma da glicosilceramida³. Deguchi³, em um estudo piloto, obtiveram resultados que sugerem que a diminuição das concentrações plasmáticas da glicosilceramida, causada pelo uso de anticoncepcionais, está diretamente ligada ao aumento da RPCA. Embora o aumento do risco de eventos tromboticos em mulheres que fazem o uso de anticoncepcionais, principalmente os de terceira geração, e que possuem a mutação para o fator V de Leiden seja conhecido, não é rotina a realização de testes nas mulheres assintomáticas que não possuem história familiar de trombose. No presente trabalho foi avaliado a correlação entre idade e a presença de RPCA. De acordo com nossos resultados, para os 47 casos de RPCA positivos não houve correlação significativa entre estas variáveis (figuras 4 e 5). De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que a prevalência de RPCa em pacientes com distúrbios tromboticos atendidos no laboratório Médico Santa Luzia foi de 12,9%, os dados obtidos demonstram também que não houve correlação significativa entre estes resultados com as variáveis sexo e a idade dos pacientes. Estudos futuros para a pesquisa genética do fator V de Leiden são necessários na complementação do diagnóstico, para distinguir as alterações decorrentes de presença mutação ou de resistência adquirida.

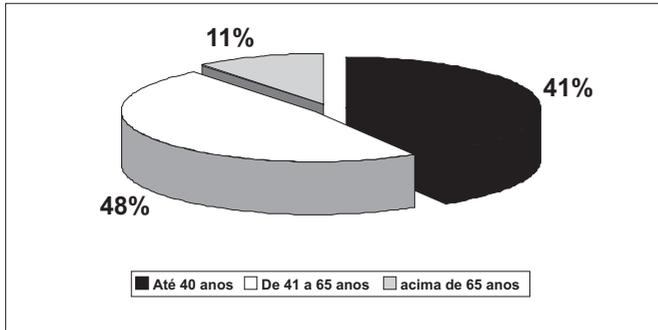


Figura-2: Distribuição dos Pacientes Segundo a Idade (%)

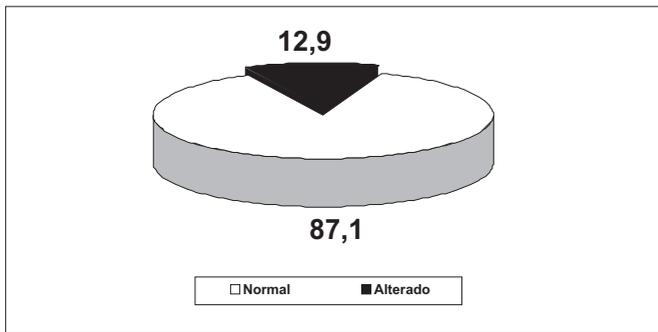


Figura-3: Prevalência de RPCA

TABELA I

Distribuição dos pacientes alterados segundo sexo e idade.

Sexo	N	%	Idade		N	%
			Até 40 anos	De 40 a 65 anos		
Feminino	32	68,1	Até 40 anos	De 40 a 65 anos	18	38,3
			Acima de 65 anos	3	6,4	
			Até 40 anos	5	10,6	
Masculino	15	31,9	De 40 a 65 anos	6	12,8	
			Acima de 65 anos	4	8,5	
			-	-	-	
Total	47	100	-	-	47	100

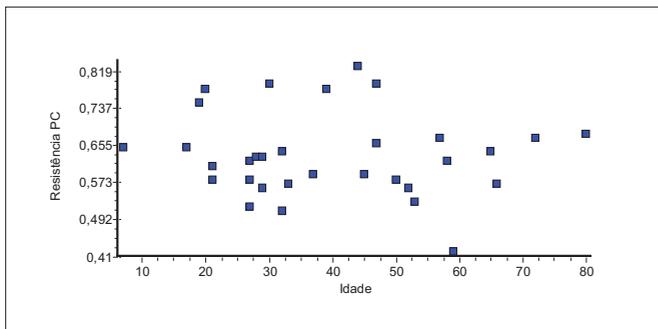


Figura 4: Correlação de RPCA segundo a idade em pacientes do sexo feminino. n= 32; r= -0.09503; p> 0,05

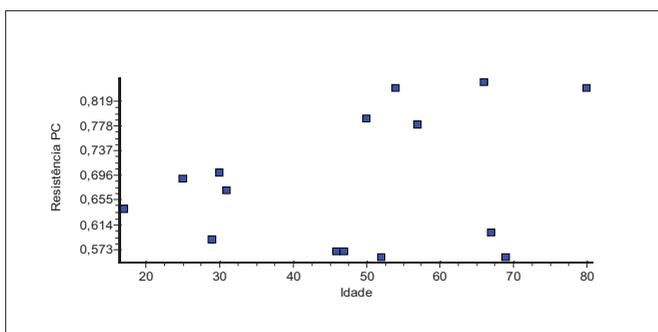


Figura 5: Correlação de RPCA segundo a idade em pacientes do sexo masculino. n= 15; r= 0.3009; p> 0,05

presença mutação ou de resistência adquirida.

REFERÊNCIAS

1. ALHENC-GELAS, M.; PLU-BUREAU G.; GUILLONNEAU S.; KIRZIN J.-M.; AIACH M.; OCHAT N.; SCARABIN P.-Y.; Impact of progestagens on activated protein C (APC) resistance among users of oral contraceptives. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.*; 2(9):594-600, 2004.
2. Dahlbäck, B. The discovery of activated protein C resistance. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.*; 1(3):3-9, 2003.
3. Deguchi H, Bouma BN, Middeldorp S, Lee YM, Griffin JH. Decreased plasma sensitivity to activated protein C by oral contraceptives is associated with decreases in plasma glucosylceramide. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.*; 3(5) : 935-938,2005.
4. Lindqvist, P. G.; Svensson, P.; Dahlbäck, B.. Activated protein C resistance - in absence of factor V Leiden - and pregnancy. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.*; 4(2):361-366, 2006.
5. Sallai KK; Nagy E; Bodó I; Mohl A; Gergely P. Thrombosis risk in systemic lupus erythematosus: the role of thrombophilic risk factors. *Scand J Rheumatol.*; 36(3):198-205, 2007.
6. Samonakis DN; Koutroubakis IE; Sfiridaki A; Malliaraki N; Antoniou P; Romanos J; Kouroumalis EA Hypercoagulable states in patients with hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci.*; 49(5):854-558, 2004.
7. Silva, Marcio de Castro. Epidemiologia do tromboembolismo venoso. *Jornal*

Vascular Brasileiro.;1(2):83-84, 2002.

8. Sorensen, H.T. Venous thromboembolism and the concepts of the incidence and mortality. *J Thromb Haemos.*; 5(4):692-699 2007 .
9. Tans Guido (1); Van Hylckama Vlieg Astrid (2 3); Thomassen M. Christella L. G. D. (1); Curvers Joyce (1); Bertina Rogier M. (3); Rosing Jan (1); Rosendaal Frits R. (2 3); Activated protein C resistance determined with a thrombin generation-based test predicts for venous thrombosis in men and women. *British Journal of Haematology.*; 122(3):465-470, 2003.
10. Tripodi, Armando; Mannucci, P.M. Laboratory investigation of thrombophilia. *Clinical Chemistry.*; 47(9):1597-1606, 2001.
11. Vig S; ShitolieA; Bevan D; Dormandy J; Thompson MM; Halliday A. The prevalence of thrombophilia in patients with symptomatic peripheral vascular disease. *Br. J. Surg.*; 93() : 577-581, 2006.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Profa. Dra. Teresinha de Jesus Carvalho Neiva
Universidade federal de Santa Catarina
Departamento de Análises Clínicas-CCS
Florianópolis, SC, Brasil;
Tel 48-37219712/ramal 220
E-mail: neiva@ccs.ufsc.br



Excelência de Conhecimento em Diagnóstico Laboratorial



Centro de Pós-Graduação

✓ CURSOS DE PÓS-GRADUAÇÃO LATO SENSU:

ANÁLISES CLÍNICAS
HEMATOLOGIA CLÍNICA
MICROBIOLOGIA CLÍNICA
CITOLOGIA CLÍNICA
GESTÃO EM LABORATÓRIO CLÍNICO



✓ CURSOS DE TREINAMENTO PROFISSIONAL:

MICROBIOLOGIA
HEMATOLOGIA
IMUNOLOGIA

INFORMAÇÕES E INSCRIÇÕES:

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
Rua Vicente Licínio, 99 Tijuca
Rio de Janeiro - RJ CEP: 20.270-902

Fone: 21 2187 - 0800
Fax: 21 2187 - 0805

Site: www.sbac.org.br
E-mail: cpg@sbac.org.br

Efeito de flavonóides e de corantes do urucum sobre a hiperlipidemia induzida em coelhos*

Flavonoids and natural urucum dyes on induced hyperlipidemic rabbits

Leonardo Ramos Paes de Lima¹, Tânia Toledo de Oliveira², Tanus Jorge Nagem³ & Sergio Pacheco⁴

RESUMO - Induziu-se hipercolesterolemia em coelhos da raça Nova Zelândia e compararam-se os efeitos hipolipidêmicos, por via oral, dos flavonóides baicaleína, morina, naringenina, naringina, quercetina, rutina, crisina, luteolina e apigenina, os corantes naturais extraídos do urucum norbixina e bixina e o medicamento comercial hipolipidêmico colestiramina. Todos os flavonóides estudados e o corante bixina foram significativamente mais hipocolesterolêmicos que o medicamento colestiramina, sendo que as melhores reduções foram observadas com naringenina (54,04%), naringina (49,26%), quercetina (49,78%), rutina (48,89%), crisina (55,56%), luteolina (52,58%) e apigenina (49,88). As substâncias que mais aumentaram o HDL foram os flavonóides baicaleína (122,21%), apigenina (281,63%), morina (10,79%) e luteolina (21,14%) e o medicamento colestiramina (37,26%). A maior parte dos flavonóides estudados reduziu mais o triacilglicerol do que o medicamento colestiramina, sendo a baicaleína (-56,91% do que o controle sadio) e a rutina os mais eficientes. Verificou-se também, *in vitro*, que bixina, norbixina, apigenina e luteolina aumentaram a atividade da lipase. Tais resultados indicam que os compostos estudados poderiam ser utilizados como medicamento se devidamente testados no homem. Os cortes histológicos do arco aórtico e da artéria aorta não mostraram diferenças entre os grupos tratados e os controles, enquanto que algumas diferenças histológicas foram observadas nos hepatócitos dos grupos tratados em relação aos coelhos hiperlipidêmicos.

PALAVRAS-CHAVE - flavonóides, bixina, norbixina, colestiramina, colesterol, HDL-colesterol.

SUMMARY - The effects of some flavonoids (quercetin, rutin, morin, naringin, naringenin, baicalein, cricin, luteolin and apigenin) and the natural urucum dyes bixin and norbixin, besides the commercial drug colestiramin were tested on lipid metabolism of hiperlipidemic New Zealand rabbits. All flavonoids and bixin significantly decreased serum cholesterol levels, being more efficient than colestiramin. Baicalein, apigenin, morin, luteolin and colestiramin were the most efficient drugs in increasing HDL-cholesterol levels. Most of the flavonoids studied were more efficient in decreasing triacylglycerols than colestiramin. By using *in vitro* assays, it was possible to show that bixin, norbixin, apigenin and luteolin increased lipase activity, thus providing a possible explanation to their action on *in vivo* lipid metabolism. Histological studies did not show any differences concerning aortic structures, although they did show some differences between treated and hiperlipidemic hepatocytes.

KEYWORDS - flavonoids, bixin, norbixin, colestiramin, cholesterol, HDL-cholesterol.

INTRODUÇÃO

Alimentação de coelhos, suplementada com colesterol, produz severas lesões ateroscleróticas vasculares, hipercolesterolemia e um aumento no estresse oxidativo de vários tecidos (3;7;8;21;28). Entretanto, alguns trabalhos sugerem que esses efeitos podem ser neutralizados ou atenuados com o uso de flavonóides e também de corantes extraídos do urucum (*Bixa orellana* L.).

Flavonóides são grupos de compostos naturais que ocorrem nos vegetais e possuem em sua estrutura três anéis aromáticos, constituindo unidades de um esqueleto de carbono C₆-C₃-C₆. Há alimentos ricos em flavonóides, como soja, maçã, uva, cebola, repolho, brócolis, chicória, aipo, chá e vinho tinto. Os flavonóides inibem as enzimas da rota do ácido araquidônico, o que lhes confere propriedades antiinflamatórias e anti-aterogênicas (10). Inibem também a oxidação de LDL sendo, portanto, cardioprotetores (14;22). Demonstrou-se que dietas ricas em flavonóides podem reduzir os danos miocárdiais pós-isquêmicos em ratos (9). O efeito vasodilatador do endotélio foi descrito para alguns tipos de flavonóides. A diocleína, um flavonóide isolado da leguminosa *Dioclea grandiflora*, foi investigada em aorta de ratos, apresentando efeito vaso relaxante sobre o endotélio e indução de formação de óxido nítrico, com elevação de GMP cíclico. Tal conjunto de efeitos pode resultar na inibição do processo de trombose (17).

Um estudo com ratos hiperlipidêmicos, utilizando os flavonóides baicaleína, morina, naringenina, naringina, quercetina e rutina, mostrou que estes compostos reduzem consideravelmente a quantidade de colesterol sanguíneo (12).

A naringina foi avaliada como anticancerígeno potente (1) e agente hipolipidêmico (26), exibindo também atividade antioxidativa (16) e nenhuma atividade mutagênica (11). Alguns autores mostraram ainda os efeitos da naringina no LDL-colesterol, pela inibição da HMG-CoA redutase em ratos hipercolesterolêmicos (25;26).

KIM *et al.* (13) mostraram que a naringina reduz as concentrações de colesterol plasmático pela inibição da atividade da HMG-CoA redutase hepática, pelo aumento da atividade de enzimas antioxidantes hepáticas contra stress oxidativo e pelo aumento da excreção fecal de esteróis em modelos animais hipercolesterolêmicos.

O urucuzeiro (*Bixa orellana* L.) é cultivado em quase todos os estados brasileiros. A partir das suas sementes obtêm-se vários tipos de corantes, diferentes entre si na solubilidade e pigmentação. As indústrias de corantes os exportam ou comercializam no mercado interno para as indústrias alimentícias (principalmente laticínios, salsicharias, massas, etc.), cosméticas e farmacêuticas.

A bixina é o pigmento natural da semente de urucum, representando 80% de todos os carotenóides presentes. A partir dele, são obtidos os demais pigmentos, como a norbixina (lipossolúvel), o sal da norbixina (hidrossolúvel) e

Recebido em 13/08/2008

Aprovado em 26/11/2009

¹Doutorando do Departamento de Bioquímica Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais

²Professor Associado I, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

³Professor Titular, Departamento de Química da Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais.

⁴Prof. Titular Voluntário, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

*Trabalho realizado no Laboratório de Biofármacos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa.

produtos de degradação térmica, que têm como características a lipossolubilidade e uma coloração amarela mais estável, ideal para o uso em massa.

LUDUVING (20) relata que, após testes com cães, ratos e coelhos, comprovou-se a eficiência da água do urucum, obtida por maceração das sementes (composto por mais de 80% de bixina como pigmento), na redução significativa dos índices de colesterol e triacilglicerol, possivelmente acelerando o metabolismo das gorduras, sem agir sobre o HDL colesterol.

O presente trabalho tem por objetivo avaliar a ação de alguns flavonóides e corantes do urucum no tratamento da hiperlipidemia em coelhos, além de fornecer algumas indicações sobre seus possíveis mecanismos de ação *in vitro*.

MATERIAIS E MÉTODOS

COMPARAÇÃO ENTRE OS EFEITOS DA APLICAÇÃO DE 10 MG DE FLAVONÓIDES E CORANTES NO METABOLISMO LIPÍDICO DE COELHOS HIPERLIPIDÊMICOS

Para a comparação dos efeitos de alguns flavonóides e corantes sobre o metabolismo lipídico, foram utilizados coelhos albinos, machos, da raça Nova Zelândia, com peso médio 2.264 ± 120 g e idade média de 56 dias, acondicionados em gaiolas individuais, com temperatura controlada ($26 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro de 12 horas. Todos os animais receberam a ração comercial e água *ad libitum*. Os coelhos foram distribuídos ao acaso em 14 grupos experimentais, contendo seis animais cada, que receberam os seguintes tratamentos:

Grupo 1 – Ração (controle normal)

Grupo 2 – Ração + Colesterol (1%) + Ácido cólico (0,1%) (controle hiperlipidêmico)

Grupo 3 – idem grupo 2+ baicaleína (10 mg)

Grupo 4 – idem grupo 2 + morina (10 mg)

Grupo 5 – idem grupo 2 + naringenina (10 mg)

Grupo 6 – idem grupo 2 + naringina (10 mg)

Grupo 7 – idem grupo 2 + quercetina (10 mg)

Grupo 8 – idem grupo 2 + rutina (10 mg)

Grupo 9 – idem grupo 2 + crisina (10 mg)

Grupo 10 – idem grupo 2 + luteolina (10 mg)

Grupo 11 – idem grupo 2 + apigenina (10 mg)

Grupo 12 – idem grupo 2 + norbixina (10 mg)

Grupo 13 – idem grupo 2 + bixina (10 mg)

Grupo 14 – idem grupo 2 + colestiramina (10 mg)

Para induzir a hiperlipidemia, foi administrado diariamente, juntamente com a ração, 1% de colesterol + 0,1% de ácido cólico em relação ao peso da ração diária, num período de 30 dias.

As doses de medicamentos foram fornecidas em cápsulas, diariamente, por via oral, durante 30 dias.

No trigésimo dia foram coletadas amostras de sangue pelo plexo venoso retro orbital, utilizando-se tubo capilar, com os animais sob jejum de doze horas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a $7100 \times g$, durante 15 minutos, para a obtenção do soro. As dosagens sorológicas foram efetuadas no equipamento de dosagens multiparamétrico Bioquímica (Alizé), utilizando-se os “kits” Biolab. Os resultados foram expressos em mg/dL de colesterol, colesterol-HDL e triacilgliceróis.

EFEITO DE MODIFICADORES QUÍMICOS SOBRE A ATIVIDADE DA LIPASE

Os flavonóides luteolina e apigenina e os corantes bixina e norbixina foram testados em presença de lipase.

A atividade enzimática foi determinada *in vitro* através do método de CHERRY (6), utilizando-se o “kit” enzimático da Biobrás, em presença de éster de glicerol (balbi 6,7 g/L; lauril sulfato de sódio 5,8 g/L) como substrato a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, em tampão tris-HCl 12,1 g/L, pH 8,55; azida sódica 0,5 g/L. As velocidades iniciais foram determinadas pela liberação de um cromóforo visível a 412 nm. Os estudos do efeito dos modificadores químicos foram realizados em presença e ausência dos compostos citados, variando-se a concentração destes modificadores para concentrações fixas do substrato. A ação enzimática foi acompanhada pela medida da absorvância a 412 nm.

Foi feita uma solução estoque de concentração 5×10^{-3} mol/L das substâncias a serem analisadas, sendo que a luteolina, a apigenina e a bixina foram solubilizadas com propileno glicol, enquanto a norbixina foi solubilizada com água destilada.

O estudo cinético foi realizado com o branco, o controle e os modificadores. A ordem de entrada dos reagentes na reação de cor foi criteriosamente seguida, de acordo com o esquema da tabela 1.

Após homogeneização e incubação por 2 minutos em banho-maria a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, adicionou-se o substrato apenas aos tubos controle e modificadores. Seguiu-se nova homogeneização e incubação por exatamente 30 minutos, a uma temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Em seguida, 1000 μL de lauril sulfato de sódio a 8 g/L foram adicionados a todos os tubos, para interromper a reação. As leituras fotométricas foram realizadas a 412 nm, aferindo-se o aparelho com o branco.

Este experimento foi realizado com cada amostra, em três repetições. Assim, não foi possível proceder à análise de variância dos dados de atividade enzimática, procedendo-se, ao invés, ao estudo da dispersão dos mesmos.

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Após o término dos experimentos, foram coletadas amostras de fígado e arco aórtico dos animais, numa repetição de quatro amostras para os grupos naringina, rutina e baicaleína, escolhidos ao acaso, a fim de proceder à análise histopatológica, para se verificar se houve o acúmulo de gordura hepática e alterações nas camadas da íntima do arco aórtico.

Para a confecção das lâminas, os fragmentos foram coletados e desidratados em álcoois de 70 à 95%, passando após por álcool absoluto por três vezes e, a seguir, por uma mistura de álcool + xilol e por xilol três vezes. O tempo de permanência em cada solução alcoólica foi de 30 minutos para os álcoois 70 a 95%, 1 hora para cada banho de álcool absoluto, 30 minutos para a mistura de álcool + xilol e 50 minutos para cada banho de xilol. Após desidratação, os fragmentos foram imersos em parafina duas vezes, por 1 h, e depois novamente em parafina, por aproximadamente 12h. Os cortes foram realizados com micrótomo rotativo manual (American Optical Company), com espessura de 5 μm , e colocados nas lâminas. Procedeu-se à desparafinização e hidratação com xilol (2 banhos de 10 minutos), álcool absoluto 95%, 80% e 70% (3 minutos em cada) e água (5 minutos). As lâminas foram coradas com hematoxilina durante um minuto e eosina durante 30 segundos. O excesso de corante foi removido em água corrente. Após montagem e secagem, as lâminas foram analisadas ao microscópio Olympus BX 40, qualitativamente, de acordo com a quantidade de gotículas de gordura depositadas nos tecidos, comparando-se os grupos tratados com medicamentos entre si e com os grupos controle.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Realizou-se experimentos casualizados e os dados foram submetidos ao teste de Tukey para comparação entre as médias dos grupos que receberam medicamento ($P > 0,05$), teste de Dunnett para comparação de cada grupo com os grupos controles ($P < 0,05$) e teste F para comparação entre os grupos controles ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

COMPARAÇÃO ENTRE OS EFEITOS DA APLICAÇÃO DE 10 MG DE FLAVONÓIDES E CORANTES NO METABOLISMO LIPÍDICO DE COELHOS HIPERLIPIDÊMICOS

Efeitos sobre os níveis de colesterol total

De acordo com a tabela 2, houve um aumento de 722,77% de colesterol do grupo hipercolesterolêmico em relação ao grupo controle normal, sendo este valor estatisticamente significativo pelo teste F. Todos os grupos tratados mostraram níveis significativamente elevados de colesterol em relação ao grupo normal pelo teste de Dunnett.

Entretanto, todos os tratamentos reduziram significativamente as concentrações de colesterol em relação ao grupo controle hipercolesterolêmico pelo teste de Dunnett. As melhores reduções foram observadas nos tratamentos que receberam as substâncias naringenina, 54,04%, naringina, 49,26%, quercetina, 49,78%, rutina, 48,89%, crisina, 55,56%, luteolina, 52,58% e apigenina, 49,88%.

Todos os flavonóides estudados e o corante bixina reduziram significativamente as concentrações de colesterol a valores inferiores ao do medicamento colestiramina, pelo teste de Tukey.

Os flavonóides promovem uma redução no colesterol sanguíneo através de uma redução na atividade da HMGCoA-redutase, acarretando um incremento na degradação e no consumo do colesterol e uma inibição na colesterologênese (2). Alguns estudos citam ainda a propriedade dos flavonóides de promoverem um decréscimo na atividade da hidroximetilglutaril-CoA redutase e do esterol o-aciltransferase, duas enzimas chaves para o metabolismo do colesterol (15). De acordo com BEST & JENKINS (4), a ênfase futura para a correção de anormalidades lipídicas, com decréscimo de desordens cardiovasculares, serão preferencialmente focadas na redução do LDL-colesterol, por meio de substâncias naturais, como os flavonóides e seus derivados.

O mecanismo de ação dos flavonóides na redução do LDL-colesterol foi postulado por WILCOX *et al.* (29). Segundo estes autores, os flavonóides promovem um decréscimo na secreção de apo B devido a uma redução da atividade e expressão da enzima acil-CoA colesterol acil transferase. Adicionalmente, os flavonóides reduziram a atividade e a expressão da proteína de transferência de triacilgliceróis microsomais, promovendo um aumento na expressão dos receptores para LDL, o que resulta em um acréscimo na recaptção e degradação do LDL-colesterol. Tais eventos proporcionam uma redução na biodisponibilidade de lipídeos que contém a proteína apo B em sua estrutura.

Efeitos sobre os níveis de HDL-colesterol

O grupo controle hipercolesterolêmico apresentou níveis significativamente elevados de HDL-colesterol em relação ao grupo controle normal, de 486,81%, de acordo com a tabela 3. Tais resultados refletem o aumento já relatado nas concentrações de colesterol total, acompanhado de suas frações lipídicas.

Das drogas testadas, a apigenina, a baicaleína, o medicamento colestiramina, a luteolina e a morina aumentaram os

níveis de HDL-colesterol acima dos níveis dos controles hiper-HDL de 281,63%, 122,21%, 37,26%, 21,14% e 10,79%, respectivamente, sendo os efeitos dos dois primeiros e da colestiramina estatisticamente significativos pelo teste de Dunnett.

Os flavonóides naringina e naringenina e os corantes naturais bixina e norbixina tiveram efeitos hipo-HDL não significativos, sendo que os níveis de redução em comparação com o grupo controle hiper-HDL foram de 5,67%, 16,84%, 15,22% e 11,43%, respectivamente. Já os efeitos hipo-HDL apresentados pelos flavonóides quercetina (-58,44%), crisina (-57,49%) e rutina (-22,72%) foram mais acentuados e estatisticamente significativos em relação ao grupo controle hiper-HDL pelo teste de Dunnett.

O efeito hipo-HDL destes compostos evidencia seus efeitos nas reduções das taxas de colesterol total. Tais compostos, ao reduzirem as concentrações de colesterol total sanguíneo, reduzem também, conseqüentemente, os níveis de HDL-colesterol.

Estudos epidemiológicos estabeleceram que uma baixa concentração de HDL-colesterol no plasma sanguíneo é um fator de risco independente para desordens coronárias. Uma baixa concentração nas taxas de HDL é uma anormalidade lipídica comum em pacientes com desordens coronárias. O "Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Trial" apresentou fortes evidências em favor de que uma alta concentração de HDL-colesterol poderia reduzir o risco de desordens coronárias e a mortalidade em pacientes com anormalidades lipídicas (5).

Efeitos sobre os níveis de triglicérides

O grupo controle hipertrigliceridêmico apresentou níveis estatisticamente elevados de triacilgliceróis quando comparado ao grupo controle normal (tabela 4). Os grupos tratados com baicaleína, quercetina, crisina, naringenina e rutina obtiveram uma redução significativa na concentração de triacilglicerol quando comparados com o grupo hipertrigliceridêmico, pelo teste de Dunnett, sendo estes valores de -84,85%, -77,51%, -59,93%, -24,26%, e -19,48%, respectivamente.

Os melhores efeitos observados na redução dos triacilgliceróis plasmáticos foram conseguidos pelos flavonóides baicaleína, quercetina e crisina. A baicaleína e a quercetina diminuíram os níveis de triacilglicerol a valores inferiores ao do grupo controle normal, sendo que os valores conseguidos pela baicaleína (-56,91%) foram estatisticamente significativos em relação a este controle pelo teste de Dunnett.

Cerca de metade dos flavonóides estudados tiveram um melhor efeito hipotrigliceridêmico do que o medicamento colestiramina e não produziram efeitos tóxicos aparentes nas concentrações estudadas.

Diversos experimentos com a utilização de flavonóides têm mostrado um efeito hipotrigliceridêmico. Uma das possíveis explicações para este fato seria a de causarem um aumento na atividade da lipase. Esta enzima hidrolisa os triacilgliceróis, ocasionando uma maior mobilização dos ácidos graxos sanguíneos para o fígado, tecido muscular e adiposo (19).

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Não se observaram diferenças marcantes na análise histopatológica entre os grupos tratados com os flavonóides naringina, rutina e baicaleína em relação ao grupo hiperlipidêmico, ou seja, todos os grupos que receberam flavonóides também apresentaram vacúolos, de forma acentuada, nos hepatócitos. Porém, os vacúolos do grupo controle apresentaram uma distribuição centro lobular, enquanto

que os grupos tratados apresentaram uma distribuição centro lobular e em direção à periferia do lóbulo (Figura 1). Os cortes da artéria aorta dos animais não apresentaram nenhuma alteração histológica, quando comparados com o grupo sadio. Os cortes da parede do arco aórtico dos animais tratados não apresentaram alterações histológicas quando comparados com o grupo sadio (figura 1).

EFEITO DE MODIFICADORES QUÍMICOS SOBRE A ATIVIDADE DE LIPASE

Após análise da dispersão dos dados, não foi possível ajustar equações de regressão, tendo como variável dependente a atividade enzimática e independente a concentração do modificador.

Os resultados obtidos na determinação da atividade de lipase em presença dos corantes (bixina e norbixina) extraídos do urucum e dos flavonóides (apigenina e luteolina) são apresentados na tabela 5 e na figura 2.

De acordo com a tabela 5 e a figura 2, observou-se que o melhor resultado apresentado pela apigenina foi obtido com uma concentração de $5,4 \times 10^{-5}$ mol/L, sendo esta atividade de 39,36 UI, o que proporciona um aumento de 43,13% em relação ao controle.

A melhor ativação para a bixina foi de 67,40 UI, na concentração de $5,4 \times 10^{-5}$ mol/L, obtendo-se uma porcentagem de ativação de 145% em relação ao experimento controle.

Já para a luteolina, a concentração na qual o melhor resultado foi obtido foi a de $4,8 \times 10^{-5}$ mol/L, sendo esta ativação de 67,37 UI, ou seja, um aumento de 145% em relação ao controle.

A norbixina, por sua vez, apresentou uma atividade de 47,05 UI, na concentração de $5,4 \times 10^{-5}$ mol/L, o que proporciona uma ativação de 71% em comparação com o controle.

Notou-se que, em todos os gráficos, a variação na atividade da lipase permanece praticamente inalterada em concentrações abaixo de $4,8 \times 10^{-5}$ mol/L. A partir desta concentração, a atividade começa a aumentar, atingindo o ápice em torno de $5,4 \times 10^{-5}$ mol/L, com exceção da luteolina. A seguir, ocorre um decréscimo de atividade com o aumento da concentração.

Os melhores resultados, indubitavelmente, foram os da bixina e da luteolina, que alcançaram um aumento de 145% na atividade da lipase em relação aos testes feitos sem a adição dos modificadores. Isto poderia ser explicado pelo fato das estruturas químicas da bixina e norbixina serem muito semelhantes às dos ácidos graxos (que são substrato da lipase) que, portanto, poderiam ocupar regiões do centro ativo da enzima, modificando sua conformação e otimizando a catálise.

A bixina, composto lipossolúvel, apresentou maior atividade do que a norbixina. Esses resultados mostram que um corante lipossolúvel tem maior efeito no aumento da atividade da lipase do que um hidrossolúvel.

Flavonóides podem estar apenas associados à molécula da enzima, modificando sua conformação. Eles podem interagir em regiões hidrofóbicas da enzima e, portanto, serem aí estabilizados por pontes de hidrogênio.

Estes resultados mostram que os flavonóides e corantes testados modificam a atividade da lipase, uma enzima que, no organismo, degrada os triacilgliceróis, liberando ácido graxo e glicerol. Para explicar este mecanismo de ação, sugeriu-se que poderia haver a formação de quelatos entre a enzima e esses compostos. Esses quelatos induziriam a mudança conformacional da enzima, modificando seu centro ativo (23). LIMA *et al.* (19) observaram uma estreita correlação entre a redução dos níveis de triacilgliceróis no soro e fígado de ratos hiperlipidêmicos e a ativação da

enzima lipase pelos flavonóides, mostrando uma inter-relação entre o aumento da atividade da lipase e maior hidrólise dos triacilgliceróis.

TABELA I
Esquema da ordem de entrada dos reagentes no meio reacional.

REAGENTES	BRANCO (B)	CONTROLE (C)	BRANCOS DOS MODIFICADORES (BM)	MODIFICADORES (M)
Tampão	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
Solução de lipase (1 µg/mL)*	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL
Inibidor (PMSF 3,4 g/L)	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
Reagente de cor**	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
Substâncias a serem testadas	-	-	Variou-se o volume de 2-20 µL	Variou-se o volume de 2-20 µL

* A solução de lipase foi preparada dissolvendo-se 1 mg de lipase pancreática em 10 mL da solução tampão.

Depois de misturados, retirou-se 1 mL desta solução e diluiu-se para 100ml com o tampão.

** O reagente de cor: solução de acetato de sódio 2,0 g/L DTNB 1,2 g/L e azida sódica 0,5 g/L.

** O reagente de cor: solução de acetato de sódio 2,0 g/L DTNB 1,2 g/L e azida sódica 0,5 g/L.

TABELA II
Valores médios do colesterol total no soro sanguíneo de coelhos, avaliados aos 30 dias, e seus respectivos percentuais de variação.

Tratamentos (grupos)	Colesterol (mg/d ± erro-padrão) (L)	% de variação em relação ao grupo:	
		controle	hipercolestrolêmico
1 - controle normal	115,47 ± 15,07	-	
2 - controle hiperlipidêmico	950,05 ± 382,43	+722,77 #	
3 - baicaleína	518,54 ± 58,04 b	+349,07 *	-45,42 *
4 - morina	551,98 ± 14,72 b	+378,03 *	-41,90 *
5 - naringenina	436,64 ± 35,93 c	+278,14 *	-54,04 *
6 - naringina	482,05 ± 59,84 c	+317,47 *	-49,26 *
7 - quercetina	494,22 ± 44,95 c	+328,01 *	-47,98 *
8 - rutina	485,57 ± 50,98 c	+320,52 *	-48,89 *
9 - crisina	422,20 ± 78,86 c	+265,64 *	-55,56 *
10 - luteolina	450,42 ± 41,29 c	+290,07 *	-52,59 *
11 - apigenina	476,16 ± 21,67 c	+312,37 *	-49,88 *
12 - norbixina	709,21 ± 195,54 a	+514,20 *	-25,35 *
13 - bixina	531,74 ± 144,83 b	+460,50 *	-44,03 *
14 - colestiramina	760,99 ± 320,47 a	+559,04 *	-19,90 *

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

* Teste de Dunnett (P<0,05). # Teste F (P<0,05)

TABELA III
Valores médios do colesterol-HDL no soro sanguíneo de coelhos, avaliados aos 30 dias, e seus respectivos percentuais de variação.

Tratamentos	Colesterol-HDL (mg/dL ± erro-padrão)	% de variação em relação aos grupos:	
		normal	Hiper-HDL
1 - controle normal	30,75 ± 11,74		
2 - controle hiper-HDL	180,44 ± 60,70	+486,81#	
3 - baicaleína	400,96 ± 13,34 b	+1203,92 *	+122,21 *
4 - morina	199,91 ± 55,79 d	+550,11 *	+10,79
5 - naringenina	170,21 ± 45,67 e	+453,52 *	-5,67
6 - naringina	150,05 ± 8,64 e	+387,98 *	-16,84
7 - quercetina	74,99 ± 49,45 g	+143,87 *	-58,44 *
8 - rutina	139,44 ± 37,88 f	+353,48 *	-22,72 *
9 - crisina	76,70 ± 3,96 g	+149,45 *	-57,49 *
10 - luteolina	218,58 ± 13,80 cd	+610,85 *	+21,14
11 - apigenina	688,61 ± 1,82 a	+2139,39 *	+281,63 *
12 - norbixina	152,98 ± 21,84 e	+397,49 *	-15,22
13 - bixina	159,82 ± 8,71 e	+419,73 *	-11,43
14 - colestiramina	247,67 ± 57,45 c	+705,44 *	+37,26 *

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

* Teste de Dunnett (P<0,05). # Teste F (P<0,05)

TABELA IV
Valores médios do triacilglicerol no soro sanguíneo de coelhos, avaliados aos 30 dias e seus respectivos percentuais de variação.

Tratamentos	Triacilglicerol (mg/dL ± erro-padrão)	% de variação em relação ao grupo:	
		normal	hipertriglicéridêmico
1 – controle normal	64,70 ± 12,68		
2 – controle hipertriglicérido	184,01 ± 0,69	+184,40 #	
3 – baicaleína	27,88 ± 22,11 f	-56,91 *	-84,85 *
4 – morina	172,05 ± 6,50 b	+165,92 *	-6,50
5 – naringenina	138,82 ± 4,56 d	+114,55 *	-24,56 *
6 – naringina	176,91 ± 27,37 b	+173,43 *	-3,86
7 – quercetina	41,38 ± 2,65 e	-36,04	-77,51 *
8 – rutina	148,16 ± 5,56 c	+129,00 *	-19,48 *
9 – crisina	73,73 ± 15,64 e	+13,96	-59,93 *
10 – luteolina	187,51 ± 51,83 a	+189,81 *	+1,90
11 – apigenina	194,33 ± 10,93 a	+200,36 *	+5,61
12 – norbixina	201,67 ± 25,22 a	+211,71 *	+9,60
13 – bixina	157,84 ± 29,21 c	+143,96 *	-14,22
14 – colestiramina	152,21 ± 35,66 c	+135,26 *	-17,28

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).
* Teste de Dunnett (P<0,05). # Teste F (P<0,05)

TABELA V
Atividade de lipase em presença dos modificadores apigenina, bixina, luteolina e norbixina.

Concentração do modificador [M]	Apigenina (UI)	Luteolina (UI)	Bixina a 95% (UI)	Norbixina (UI)
0	27,50 ± 0,96	27,50 ± 0,96	27,50 ± 0,96	27,50 ± 0,96
0,6 x 10 ⁻⁵	23,09 ± 2,38	23,38 ± 0,27	28,76 ± 1,70	24,81 ± 2,76
1,2 x 10 ⁻⁵	26,98 ± 2,79	28,36 ± 2,21	24,82 ± 0,55	27,97 ± 1,20
1,8 x 10 ⁻⁵	29,54 ± 8,69	25,19 ± 5,07	29,08 ± 6,67	28,11 ± 4,26
2,4 x 10 ⁻⁵	26,60 ± 2,27	29,99 ± 1,02	38,83 ± 1,34	33,37 ± 1,39
3,0 x 10 ⁻⁵	29,85 ± 3,48	34,56 ± 6,32	31,12 ± 1,63	29,02 ± 2,53
3,6 x 10 ⁻⁵	20,77 ± 0,35	27,93 ± 0,72	25,69 ± 1,86	30,81 ± 6,71
4,2 x 10 ⁻⁵	30,81 ± 5,23	30,86 ± 0,25	26,34 ± 0,95	23,46 ± 0,29
4,8 x 10 ⁻⁵	32,97 ± 5,27	67,37 ± 6,06	41,46 ± 2,99	38,80 ± 9,13
5,4 x 10 ⁻⁵	39,36 ± 3,46	45,54 ± 2,78	67,40 ± 10,24	47,05 ± 3,65
6,0 x 10 ⁻⁵	25,56 ± 1,06	50,73 ± 12,18	57,23 ± 18,03	23,15 ± 4,45

Média ± erro-padrão.

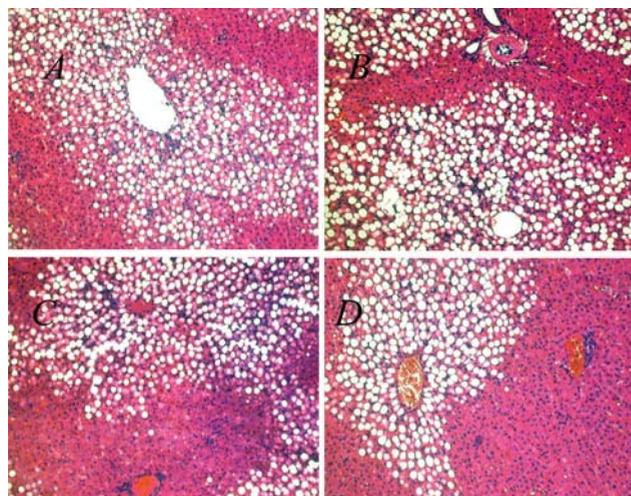


Figura 1 – Histologia do fígado de coelhos após trinta dias de experimentação. A, grupo 2 (ração, colesterol e ácido cólico). B, grupo 6 (naringina). C, grupo 8 (rutina). D, grupo 3 (baicaleína). (70X). HE.

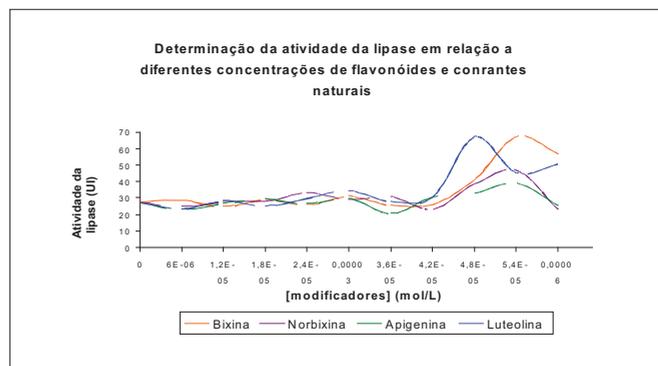


Figura 2 - Determinação da atividade da lipase na presença de várias concentrações de modificadores.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho indicaram uma eficaz ação dos flavonóides e corantes naturais sob o metabolismo lipídico de coelhos e sua ação ativadora sobre a lipase *in vitro*. Em trabalho prospectivo anterior (18), observamos que os coelhos, *Oryctolagus cuniculus*, da variedade Nova Zelândia, respondem rapidamente a uma dieta contendo 0,1% de ácido cólico e 1% de colesterol do peso médio da ração consumido diariamente, tornando-se hiperlipidêmicos. No presente estudo, optou-se então por utilizar coelhos da raça Nova Zelândia na determinação dos efeitos farmacológicos de alguns flavonóides e corantes naturais, que são utilizados atualmente como agentes hipolipidêmicos.

Foram comparados os efeitos dos flavonóides baicaleína, morina, naringenina, naringina, quercetina, rutina, crisina, luteolina e apigenina, os corantes naturais extraídos do urucum norbixina e bixina e o medicamento comercial hipolipidêmico colestiramina na dosagem de 10 mg/kg de peso corporal, por via oral.

Todas as substâncias reduziram as concentrações de colesterol no soro sanguíneo dos coelhos. As melhores reduções foram observadas com as substâncias naringenina, 54,04%, naringina, 49,26%, quercetina, 49,78%, rutina, 48,89%, crisina, 55,56%, luteolina, 52,58% e apigenina, 49,88.

Todos os flavonóides estudados e o corante bixina reduziram as concentrações de colesterol a valores inferiores ao do medicamento colestiramina e suas médias foram estatisticamente significantes em relação à média deste medicamento, pelo teste de Tukey. Isto é um resultado promissor, dado que a colestiramina vêm sendo substituída por apresentar vários efeitos colaterais.

Os melhores efeitos observados na redução do triacilglicerol plasmático foram conseguidos pelos flavonóides baicaleína, quercetina e crisina. A baicaleína e a crisina diminuíram os níveis de triacilglicerol a valores inferiores ao do grupo controle normal, sendo que os valores conseguidos pela baicaleína (-56,91%) diferiram significativamente dos desse grupo pelo teste de Dunnett. Cerca da metade dos flavonóides estudados reduziu mais o triacilglicerol do que o medicamento colestiramina.

As substâncias que promoveram aumento no nível de colesterol-HDL, em relação ao grupo já hiper-HDL, foram os flavonóides baicaleína, apigenina, morina e luteolina e o medicamento colestiramina (122,21%, 281,63%, 10,79%, 21,14% e 37,26%, respectivamente). Por outro lado, as significativamente hipo-HDL foram quercetina, crisina e rutina (58%, 57% e 22%, respectivamente).

O fígado é o principal órgão responsável pelo metabolismo

de triacilgliceróis e colesterol, assim como pela síntese de lipoproteínas. Um desequilíbrio permanente entre o influxo de ácidos graxos e a utilização e secreção de VLDL gera um acúmulo de triacilgliceróis e ésteres de colesterol nos hepatócitos, que pode levar à esteatose hepática (27). Isto ocorreu também no presente estudo e não foi revertido pela adição dos compostos medicamentosos. Portanto, os fatores envolvidos no desenvolvimento da esteatose deverão ser mais bem investigados.

De uma maneira geral, foi possível observar que as substâncias estudadas apresentaram uma ação farmacológica bastante acentuada no metabolismo lipídico de coelhos hiperlipidêmicos, sem, contudo, causar efeitos tóxicos aparentes. No ensaio *in vitro*, procurou-se caracterizar o efeito dos flavonóides luteolina e apigenina e dos corantes bixina e norbixina sobre a atividade da lipase, variando-se as concentrações das substâncias em estudo.

Todos os compostos testados apresentaram ação ativadora sobre a lipase nas concentrações de 4,8 a 5,4 x 10⁻⁵ mol/L, sendo os melhores resultados apresentados pela bixina e luteolina.

O aumento da atividade da lipase por essas substâncias poderia explicar, em parte, os níveis reduzidos de triacilgliceróis encontrados nos ensaios biológicos. Entretanto, não se podem comparar as concentrações utilizadas no ensaio *in vitro* com as utilizadas *in vivo*, uma vez que a forma de expressar as concentrações é diferente e que as concentrações ideais em ambos os experimentos podem diferir acentuadamente.

Este trabalho demonstrou os efeitos benéficos de alguns flavonóides e corantes naturais sob o metabolismo lipídico de coelhos. Porém, novas pesquisas devem ser realizadas para que estes compostos possam ser utilizados como medicamentos humanos, principalmente quanto à bioquímica e a toxicologia destas substâncias.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da FAPEMIG e da Rede de Toxicologia e Farmacologia da FAPEMIG.

REFERÊNCIAS

- 1 - ABOOBAKER, V.S.; BALGI, A.D.; BHATTACHARYA, R.K - In vivo effect of dietary factors on the molecular action of aflatoxin B1: Role of non-nutrient phenolic compounds on the catalytic activity of liver fraction. *In Vivo* 8: 673-84, 1994.
- 2 - ANILA, L.; VIJAYALAKSHMI, N.R. - Flavonoids from *Emblica officinalis* and *Mangifera indica*-effectiveness for dyslipidemia. *J. Ethnopharmacol.* 79(1): 81-7, 2002.
- 3 - BALKAN, J.; KANBAGH, O.; HATIPOGLU, A.; KÜÇÜK, M.; ÇEVİKBAS, U.; AYKAÇ-TOKER, G.; UYSAL, M. - Improving effect of dietary taurine supplementation on the oxidative stress and lipid levels in the plasma, liver and aorta of rabbits fed on a high-cholesterol diet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66:1755-1758, 2002.
- 4 - BEST, J.D.; JENKINS, A.J. - Novel agents for managing dyslipidaemia. *Expert Opin. Inv. Drugs* 10(11):1901-11, 2001.
- 5 - BROUSSEAU, M.E.; SCHAEFER, E.J. - New developments in the prevention of atherosclerosis in patients with low-density lipoprotein cholesterol. *Curr. Atheros. Repr.* 3(5): 365-72, 2001.
- 6 - CHERRY, J.S. - *Am. J. Physiol.* 100: 266, 1932.
- 7 - DE LA CRUZ, J.P.; QUINTERO, L.; VILLALOBOS, M.A.; DE LA CUESTA, F.S. - Lipid peroxidation and glutathione system in hyperlipemic rabbits: influence of olive oil administration. *Biochim. Biophys. Acta* 1485: 36-44, 2000.
- 8 - DEL BOCCIO G.; LAPENNA D.; PORRECA, E.; PENNELI, A.; SAVINI, F.; FELICIANI, P.; RICCI, G.; CUCCURULLO, F. - Aortic antioxidant defense mechanisms: time-related changes in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 81: 127-35, 1990.
- 9 - FACINO, R.M.; CARINI, M.; ALDINI, G.; BERTI, F.; ROSSONI, G.; BOMBARDELLI, E.; MORAZZONI, P. - Diet enriched with procyanidins enhances antioxidant activity and reduces myocardial post-ischaemic damage in rats. *Life Sci.* 64: 627-642, 1999.
- 10 - FERRANDIZ, M.L.; ALCARAZ, M.J. - Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agent Actions* 32: 283-288, 1991.
- 11 - FISHER, K.D. - Evaluation of the health aspects of hesperidin, naringin, and citrus flavonoid extract as food ingredients. Washington, Bureau of Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services, Contract No FDA. 223-78-2100. 1982.
- 12 - GOMES, S.M. - Efeitos de flavonóides sobre o metabolismo lipídico. 1998, 129 pag.. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- 13 - KIM, H.J.; OH, G.T.; PARK, Y.B.; LEE, M.K.; SEO, H.J.; CHOI, M.S. Naringenin alters the cholesterol biosynthesis and antioxidant enzyme activities in LDL receptor-knockout mice under cholesterol fed condition. *Life Sci.* 74:1621-34, 2004.
- 14 - KONDO, K.; HIRANO, R.; MATSUMOTO, A.; IGARASHI, O.; ITAKURA, H. - Inhibition of LDL oxidation by cocoa. *Lancet* 348:1514-1518, 1996.
- 15 - KUROWSKA, E.M.; SPENCE, J.D.; JORDAN, J.; WETMORE, S.; FREEMAN, D.J.; PICHÉ, L.A.; SERRATONE, P. - HDL-cholesterol-raising effect of orange juice in subjects with hypercholesterolemia. *Am. J. Clin. Nutr.* 72(5):1095-100, 2000.
- 16 - LAMBEV, I.; KRUSHKOV, I.; ZHELIAZKOV, D.; NIKOLOV, N. - Antiexudative effect of naringenin in experimental pulmonary edema and peritonitis. *Ekspierimentalna Meditsina I Morfologija* 19: 207-212, 1980.
- 17 - LEMOS, V.S.; FREITAS, M.R.; MULLER, B.; LINO, Y.D.; QUEIROGA, C.E.G.; CÔRTEZ, S.F. - Dioclein, a new nitric oxide and endothelium-dependent vasodilator flavonoid. *Eur. J. Pharmacol.* 386: 41-46, 1999.
- 18 - LIMA, L.R.P. - Estudos comparativos de modelos animais submetidos a disfunções lipídicas (hiperlipidemia) pela ação de compostos naturais (flavonóides e corantes). 2004, 144 pag. Dissertação (Doutorado em Bioquímica Agrícola) - Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- 19 - LIMA, L.R.P.; OLIVEIRA, T.T.; OLIVEIRA, M.G.A.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S.; GOMES, S.M.; FILHO, J.T.S. - Determinação da atividade de lipase na presença de Morina, Naringenina, Naringina e Rutina. *Ciência Agrotécnica de Lavras* 23(3): 626-631, 1999.
- 20 - LUDUVING, M.M. - Conheça os inimigos do colesterol. Saúde! É vital! São Paulo Azul p. 169, 1997.
- 21 - MAHLFOUZ, M.M.; KUMMEROW, F.A. - Cholesterol-rich diets have different effects on lipid peroxidation, cholesterol oxides, and antioxidant enzymes in rats and rabbits. *J. Nutr. Biochem.* 11: 293-302, 2000.
- 22 - MAZUR, A.; BAYLE, D.; LAB, C.; ROCK, E.; RAYSSIGUIER, Y. - Inhibitory effect of procyanidin-rich extracts on LDL oxidation in vitro. *Atherosclerosis* 145: 421-422, 1999.
- 23 - MOULIN, A.; TEISSERE, M.; BERNARD, C.; PIERONI, G. - Lipases of the Euphorbiaceae family: purification of a lipase from *Euphorbia characias*. latex and structure function relationships with the B chain of ricin. *Proc. Nat. Acad. of Sci.* 91: 24, 1994.
- 24 - SHIN, Y.W.; BOK, S.H.; JEONG, T.S.; BAE, K.H.; JEOUNG, N.H.; CHOI, M.S.; LEE S.H.; PARK, Y.B. - Hypocholesterolemic effect of naringin associated with hepatic cholesterol regulating enzyme changes in rats. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* 69(5): 341-347, 1999.
- 25 - SO, F.V.; GUTHRIE, N.; CHAMBERS, A.F.; MOUSSA, M.; CARROL, K.K. - Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. *Nutr. and Cancer* 26:167-181, 1996.
- 26 - STUDENIK, P. - Lipid disorders in liver diseases. *Vnitř. Lek.* 46:547-8, 2000.
- 27 - YAMAKOSHI, J.; KATAOKA, S.; KOGA, T.; ARIGA, T. - Proanthocyanidin-rich extract from grape seeds attenuates the development of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*142:139-149, 1999.
- 28 - WILCOX, L.J.; BORRADALE, N.M.; DE DREU, L.E.; HUFF, M.W. - Secretion of hepatocyte apoB is inhibited by the flavonoids, naringenin and hesperetin, via reduced activity and expression of ACAT2 and MTP. *J. Lipid Res.* 42(5): 725-43, 2001.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Profª. Drª Tânia Toledo de Oliveira
Laboratório de Biofármacos, Departamento de Bioquímica e
Biologia Molecular, Vila Gianetti nº 26, Universidade Federal de Viçosa
CEP 36570-000. Viçosa, MG.
E-mail: ttoledo@ufv.br