

# BIOTECNOLOGIA NA SAÚDE

## VOLUME 3

Ana Lúcia Figueiredo Porto  
Daniela de Araújo Viana Marques  
José Pedro Martins Barbosa Filho  
Juanize Matias da Silva Batista  
Kethylen Barbara Barbosa Cardoso  
Maria Rafele Oliveira Bezerra da Silva  
Maria Clara do Nascimento  
Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa  
Thiago Pajeú Nascimento

**LABTECBIO**  
Laboratório de Tecnologia de Bioativos  
**LABIOPROT**  
LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA DE PROTEÍNAS

**LIBAS**  
LABORATÓRIO INTEGRADO EM BIOTECNOLOGIA APLICADA

**UPE**  
UNIVERSIDADE  
DE PERNAMBUCO



*Rfb*  
**Editora**



# Biotecnologia na saúde



Todo o conteúdo apresentado neste livro é de  
responsabilidade do(s) autor(es).  
Esta obra está licenciada com uma Licença  
Creative Commons Atribuição-SemDerivações  
4.0 Internacional.

## Conselho Editorial

Prof. Dr. Ednilson Sergio Ramalho de Souza - UFOPA  
(Editor-Chefe)  
Prof. Dr. Laecio Nobre de Macedo-UFMA  
Prof. Dr. Aldrin Vianna de Santana-UNIFAP  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raquel Silvano Almeida-Unespar  
Prof. Dr. Carlos Erick Brito de Sousa-UFMA  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ilka Kassandra Pereira Belfort-Faculdade Laboro  
Prof<sup>a</sup>. Dr. Renata Cristina Lopes Andrade-FURG  
Prof. Dr. Elias Rocha Gonçalves-IFF  
Prof. Dr. Clézio dos Santos-UFRRJ  
Prof. Dr. Rodrigo Luiz Fabri-UFJF  
Prof. Dr. Manoel dos Santos Costa-IEMA  
Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Isabella Macário Ferro Cavalcanti-UFPE  
Prof. Dr. Rodolfo Maduro Almeida-UFOPA  
Prof. Dr. Deivid Alex dos Santos-UEL  
Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Maria de Fatima Vilhena da Silva-UFPA  
Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Dayse Marinho Martins-IEMA  
Prof. Dr. Daniel Tarciso Martins Pereira-UFAM  
Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Elane da Silva Barbosa-UERN  
Prof. Dr. Piter Anderson Severino de Jesus-Université Aix Marseille

Nossa missão é a difusão do conhecimento gerado no âmbito acadêmico por meio da organização e da publicação de livros científicos de fácil acesso, de baixo custo financeiro e de alta qualidade!

Nossa inspiração é acreditar que a ampla divulgação do conhecimento científico pode mudar para melhor o mundo em que vivemos!

*Equipe RFB Editora*

Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa  
Ana Lúcia Figueiredo Porto  
Daniela de Araújo Viana Marques  
José Pedro Martins Barbosa Filho  
Juanize Matias da Silva Batista  
Kethylen Barbara Barbosa Cardoso  
Maria Ráfaele Oliveira Bezerra da Silva  
Maria Clara do Nascimento  
Thiago Pajeú Nascimento

(Organizadores)

Volume 3

# Biotecnologia na saúde

1ª Edição

Belém-PA  
RFB Editora  
2023

© 2023 Edição brasileira  
by RFB Editora  
© 2023 Texto  
by Autor  
Todos os direitos reservados

RFB Editora  
CNPJ: 39.242.488/0001-07  
Home Page: [www.rfbeditora.com](http://www.rfbeditora.com)  
Email: [adm@rfbeditora.com](mailto:adm@rfbeditora.com)  
Telefone: 91988857730  
Belém, Pará, Brasil

**Editor-Chefe:**  
Prof. Dr. Ednilson Souza  
**Diagramação:**  
Worges Editoração  
**Revisão de texto e capa:**  
Organizadores

**Bibliotecária:**  
Janaina Karina Alves Trigo  
Ramos-CRB 8/9166  
**Produtor editorial:**  
Nazareno Da Luz

Dados Internacionais de Catalogação na publicação (CIP)



B616

Biotechnology in health / Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa *et al.*  
(Organizador). – Belém: RFB, 2023.

(Biotechnology in health-Volume 3)

Outros organizadores:

Ana Lúcia Figueiredo Porto  
Daniela de Araújo Viana Marques  
José Pedro Martins Barbosa Filho  
Juanize Matias da Silva Batista  
Kethylen Barbara Barbosa Cardoso  
Maria Rafaela Oliveira Bezerra da Silva  
Maria Clara do Nascimento  
Thiago Pajeú Nascimento

Livro em PDF

ISBN 978-65-5889-589-3

DOI 10.46898/rfb.97bbdb0e-c3f2-4562-9502-0769182ec0bd

1. Caracterização físico-química de agentes trombolíticos produzidos por fungos: uma breve revisão. I. Costa, Romero Marcos Pedrosa Brandão *et al.* (Organizador). II. Título.

CDD 570

Índice para catálogo sistemático

I. Biologia.

# SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO ..... 7

## CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE AGENTES TROMBOLÍTICOS PRODUZIDOS POR FUNGOS: UMA BREVE REVISÃO..... 9

José Arion da Silva Moura  
Thiago Pajeú do Nascimento  
Ana Lúcia Figueiredo Porto  
Pedro José Rolim Neto  
Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa  
DOI: 10.46898/rfb.9786558895893.1

## CAPÍTULO 2

ESTUDOS *in silico* SOBRE A INTERAÇÃO DE INIBIDORES DE ORIGEM VEGETAL COM O MODELO 6lu7 DA PROTEASE MPRO DO CORONAVÍRUS: UMA MINI REVISÃO..... 49

Maria Clara do Nascimento  
Julyanne Victória dos Santos Ferreira  
Anna Carolina Batista e Silva  
Juanize Matias da Silva Batista  
Thiago Pajeú Nascimento  
Ana Lúcia Figueiredo Porto  
Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa  
DOI: 10.46898/rfb.9786558895893.2

## CAPÍTULO 3

POTENCIAL DE APLICABILIDADE BIOMÉDICA DO ASPERGILLUS INSUETUS ..... 59

COSTA, Pedro Sá de Oliveira  
SILVA, Luan Nilton da  
NASCIMENTO, Thiago Pajeú  
MARQUES, Daniela de Araújo Viana  
WANDERLEY, Marcela Silvestre Outtes  
COSTA, Romero Marcos Pedrosa Brandão  
DOI: 10.46898/rfb.9786558895893.3

## **CAPÍTULO 4**

### **ATUAÇÃO DO FARMACÊUTICO NOS DISTÚRBIOS DO SONO EM IDOSOS E O USO IRRACIONAL DOS MEDICAMENTOS BENZODIAZEPÍNICOS: UMA REVISÃO NARRATIVA..... 73**

FREITAS, Kaio Henrique de

BARBOSA FILHO, José Pedro Martins

NASCIMENTO, Thiago Pajeú

SILVA, Maria José Cristiane da

OLIVEIRA, Filipe José Plácido de

SÁ, Rafaela Damasceno

OLIVEIRA, Giovanna Thaís Campos de

SANTANA, Beatriz de Fátima Maia de

MAGGI, Silvana Cabral

DOI: 10.46898/rfb.9786558895893.4

**ÍNDICE REMISSIVO..... 102**

**SOBRE OS ORGANIZADORES ..... 103**

# APRESENTAÇÃO

Caros Leitores e leitoras,

É com enorme satisfação que venho apresentar o volume III dessa coleção de livros. Abordando os principais temas e pesquisas na área de Biotecnologia Farmacêutica, com relação as principais pesquisas realizadas no LABIOPROT (Laboratório de Avanços em Biotecnologia de Peptídeos e Proteínas) Tecnologia de Bioativos) localizado na Universidade de Pernambuco, em parceria com a Universidade Federal Rural de Pernambuco, Universidade Federal Rural de Pernambuco e Universidade Federal do Piauí. Essa coleção será publicada pela RFB Editora.

A coleção abordará toda a área de Ciências da Saúde, que segundo a Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), englobam: Medicina, Odontologia, Farmácia, Enfermagem, Nutrição, Saúde Coletiva, Fonoaudiologia, Fisioterapia e Terapia ocupacional e Educação Física.

Desse modo, todos os capítulos apresentados neste livro - em sua maioria são originários de pesquisa, trabalhos acadêmicos, TCC, monografia, dissertação, tese realizados pelo grupo de pesquisa.

Todos os temas possuem grande relevância e traz alto impacto no desenvolvimento social e científico. De antemão os autores agradecem a todo o aporte financeiro concedido pelo APQ - 0623 - 5.01/21 para a manutenção das pesquisas no Laboratório.

Espero que desfrutem de todo o conhecimento científico abordado no livro.

Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa  
Professor da Universidade de Pernambuco



# CAPÍTULO 1

## **CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE AGENTES TROMBOLÍTICOS PRODUZIDOS POR FUNGOS: UMA BREVE REVISÃO**

### *PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF THROMBOLYTIC AGENTS PRODUCED BY FUNGI: A BRIEF REVIEW*

José Arion da Silva Moura<sup>1</sup>  
Thiago Pajeú do Nascimento<sup>2</sup>  
Ana Lúcia Figueiredo Porto<sup>3</sup>  
Pedro José Rolim Neto<sup>4</sup>  
Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa

DOI: 10.46898/rfb.9786558895893.1

1 Universidade Federal de Pernambuco. Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-2700-1065>

2 Universidade Federal do Piauí. Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-3480-6734>

3 Universidade Federal Rural de Pernambuco. Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-0723-2587>

4 Universidade Federal Rural de Pernambuco. Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-5561-5158>

## RESUMO

As doenças cardiovasculares são um grande problema de saúde pública. Por sua vez, as doenças trombolíticas são uma derivação desse grupo, como consequências apresenta-se os acidentes vasculares, podendo ocasionar infartos e trombozes, levando o paciente a apresentar sequelas e óbito. A terapêutica utilizada atualmente utiliza a ação fibrinolítica de drogas, como a enzima estreptoquinase, ação anticoagulante como a varfarina ou a ação antiplaquetária como o dipiridamol. As enzimas fibrinolíticas são grandes potenciais à novos fármacos, sobretudo as derivadas de fungos, por serem de fácil produção e extração. Porém, para sua utilização como novo insumo farmacêutico ativo é necessário a caracterização físico-química para obter o conhecimento do insumo antes de desenvolver uma formulação, principalmente quando se refere ao estado sólido, por ser mais vantajoso economicamente e estavelmente. Dessa forma, foi revisada a literatura científica sobre as características físico-químicas e caracterização de fármacos. Para isso foi realizada uma busca no PubMed, Biblioteca Virtual em Saúde e Wiley online Library do ano 2010 a 2021 utilizando as palavras-chave fibrinolytic enzyme e fungi além de adoção de critérios de inclusão e exclusão, resultando em 21 estudos. Foram encontradas informações sobre a pureza, peso molecular, fase física, ponto isoelétrico, pH e temperatura ótimas e estabilidade. Contudo foi observado que não é abordado estudos mais aprofundados de caracterização dessas moléculas, sendo uma nova área de estudo promissora, pois as características físico-químicas dos fármacos afetam as propriedades do medicamento e seu desenvolvimento independente da via de administração escolhida sendo de importância para seu uso industrial.

**Palavras-chave:** Doenças cardiovasculares. Enzimas fibrinolíticas. Insumo farmacêutico ativo.

## ABSTRACT

Cardiovascular diseases are a major public health problem. Therefore, thrombolytic diseases are a derivation of this group, as consequences are vascular accidents, which can cause infarctions and thrombosis, thus leading the patient to have sequelae and death. The therapy currently used uses the fibrinolytic action of drugs such as the streptokinase enzyme, anticoagulant action such as warfarin or antiplatelet action such as dipyridamole. Fibrinolytic enzymes are great potential for new drugs, especially those derived from fungi, as they are easy to produce and extract. However, for its use as a new active pharmaceutical ingredient, physicochemical characterization is necessary to obtain knowledge of the input before developing a formulation, especially when referring to the solid state, as it is more economically and stably advantageous. Thus, the scientific literature on the physicochemical characteristics and characterization of drugs was reviewed. For this, a search was carried out in PubMed, Virtual Health Library and Wiley online Library from 2010 to 2021 using the keywords fibrinolytic enzyme and fungi, in addition to adopting inclusion and exclusion criteria, resulting in 21 studies. Information was found on purity, molecular weight, physical phase, isoelectric point, optimal pH and temperature, and stability. However, it was observed that further studies on the characterization of these molecules are not addressed, being a promising new area of study, since the physicochemical characteristics of the drugs affect the properties of the drug and its development regardless of the chosen route of administration, being of importance for its industrial use.

**Keywords:** Cardiovascular diseases. Fibrinolytic enzyme. Fungi. Characterization. Active pharmaceutical input.

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) são o grupo de patologias que apresentam maior morbimortalidade em todo o mundo (VASAN; BENJAMIN, 2016). É estimado que em 2030, o número de acometidos pelas DCV aumentem cerca de 10% em relação aos dados do ano de 2010 e 40,3% da população poderá ter alguma forma de DCV (HEIDENREICH et al., 2011, American Heart Association). Vários fatores estão relacionados na causa dessas doenças, como obesidade, nutrição, sedentarismo, predisposição genética, diabetes Mellitus, dentre outras (MOZAFFARIAN et al., 2016).

Dentre do grupo das DCV, as doenças trombolíticas (DTL) são de grande importância, elas podem ser o fator desencadeador de outras patologias, como o infarto agudo, embolia pulmonar e trombose (LOWE, 2004; OMS 2021). Essas doenças têm como princípio o mecanismo fisiológico da conversão de fibrinogênio em fibrina a qual é insolúvel no plasma, e que quando polimerizada forma a rede de fibrina (CHOI et al., 2011).

Em relação ao tratamento farmacológico das DVC se divide em três classes, os antiplaquetários, anticoagulantes, e agentes trombolíticos. Dentre os agentes trombolíticos se destaca o ativador de plasminogênio tecidual (tPA) recombinante, e em segundo plano a estreptoquinase e uroquinase (WEITZ, 2019). Outras enzimas de caráter farmacológico são relatadas na literatura, sendo derivadas de animais como cobras (CINTRA et al., 2012), minhoca (LI et al., 2012), bactérias (WANG; YEH, 2006), plantas (KIM et al., 2015), microalgas (BARROS et al., 2020), fungos (NASCIMENTO et al., 2017) dentre outros.

O principal efeito adverso decorrente da utilização dos fármacos para o tratamento das DCVs é a hemorragia, necessitando

de constante monitoramento (ADEBOYEJE et al., 2018; WEITZ, 2019). Os eventos hemorrágicos através dos agentes trombolíticos podem ocorrer através da desestabilização do tampão hemostático devido a quebra de fibrina onde ocorreu a lesão vascular, ou pela fibrinogênólise provinda da formação sistêmica de plasmina, podendo destruir fatores da coagulação como V e VIII. Ademais, se esses medicamentos forem usados em associação, a possibilidade de hemorragias aumenta, como a associação de heparina com tPA podendo ocorrer hemorragia em 2 a 4% dos pacientes (WEITZ, 2019).

Algumas enzimas fibrinolíticas se destacam dentre as demais, pois, apresenta parâmetros de atividade e estabilidade compatíveis com o organismo humano. Portanto, é de grande interesse o desenvolvimento da caracterização físico-química da forma sólida dessas enzimas, visto que os sólidos tendem a ser mais estáveis que os líquidos, com visão de ser um novo Insumo Farmacêutico Ativo (IFA). Também é visto que caracterizando esse candidato a IFA, é possível delinear a melhor forma farmacêutica que poderá ser produzida, monitorar eventualidades das formulações e correlacionar essas propriedades com a forma sólida, seja cristalina ou amorfa.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 As doenças cardiovasculares**

As doenças crônicas não transmissíveis ocasionam cerca de 41 milhões de mortes ao ano (POLANCZYK, 2020). Fazendo parte desse grupo, as DCV, representam um grande conjunto de patologias, que englobam as doenças coronarianas, doença cerebrovascular, doença arterial periférica, doença cardíaca reumática, cardiopatia congênita, trombose venosa profunda e embolia pulmonar. Esse grupo de patologias foi responsável por 17,9 milhões das mortes no mundo no

ano de 2016, dentre elas se destacaram os ataques cardíacos e acidentes vasculares cerebrais segundo a Organização Pan-Americana de Saúde (OMS 2021).

As DCV representam de 21,7% a 31,8% das mortes no Brasil, sendo a principal causa de óbitos superando os acidentes de trânsito e neoplasias (MASSA; DUARTE; CHIAVEGATTO FILHO, 2019). No ano de 2012, 20% das mortes de adultos maiores de 30 anos, no Brasil foi devido à essas patologias, apresentando em destaque as regiões Sudeste e Sul, ademais é previsto que em 2030, cerca de 23,6 milhões sejam portadores de DCV no país (MANSUR; FAVARATO, 2012). Já em 2016, a Sociedade Brasileira de Cardiologia, registrou 362.091 mortes e em 2017 foram estimados 383.961 óbitos por DCV (SBC, 2021).

Os fatores de risco das DCV são diversos, abrangendo hábitos comportamentais, como consumo excessivo de álcool, sedentarismo, tabaco, dieta inadequada (OMS 2021). Além disso, diversos vírus podem predispor o surgimento de DCV (GOEIJENBIER; 2012), como o vírus da Hepatite C (HCV) (BLÜM *et al.*, 2016), Citomegalovírus (CMV) (KELKAR *et al.*, 2020) e a Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2 (SARS-CoV-2) (CASTRO; FRISHMAN, 2020) essa última tem se destacado por promover em alguns casos a geração de coágulos, ocasionando casos de trombozes. A assistência aos acometidos por DCVs, exerce grande impacto financeiro no país, movimentando cerca de 56,2 milhões de reais, apenas no ano de 2015 (STEVENS *et al.*, 2018). Portanto, devido à grande problemática na saúde pública mundial, tanto de acometidos, quanto de custo de tratamento, é evidente a necessidade de desenvolvimento de novos medicamentos e formulações, que possam diminuir o custo do tratamento e oferecendo uma melhor terapêutica e um aumento na qualidade de vida dos indivíduos.

## 2.2 Terapêuticas das doenças cardiovasculares

O principal componente dos coágulos sanguíneos é a fibrina. Ela é uma proteína resultante da ação da trombina sobre o fibrinogênio. O fibrinogênio polimerizado apresenta característica insolúvel, portanto existem mecanismos fisiológicos que desencadeiam a fibrinólise. Contudo, quando há desequilíbrio, ocorre o desenvolvimento às doenças trombóticas e uma desarmonia na agregação de fibrina intravascular desencadeando as doenças cardiovasculares (CHOI *et al.*, 2011; SILVA L. *et al.*, 2013).

O plasminogênio, é o principal fator endógeno que regula negativamente a presença de fibrina no sistema cardiovascular pois, quando transformado em plasmina, quebra a rede de fibrina (Figura 2). Portanto, é necessário de fatores de conversão de plasmina, como ativador de plasminogênio, tPA, ativador de plasminogênio sanguíneo, uroquinase, fator de Hageman e o complexo plasminogênio-estrep-toquinase (CHOI *et al.*, 2011; LISMAN; MEDCALF; KWAAN, 2017) que possam atuar degradando a rede de fibrina formada em situações patológicas.

Os medicamentos antitrombóticos presentes no mercado, apresentam três classes, na Figura 2 estão esquematizados exemplos de cada uma. Os antiplaquetários, agir inibindo a ativação ou agregação plaquetária, como Ácido acetilsalicílico (Figura 2.A), Dipyridamol (Figura 2.B) e Clopidogrel (Figura 2.C). Os anticoagulantes, que vão agir diminuindo a formação de fibrina, como a Heparina (Figura 2.H), de uso parenteral e a Varfarina (Figura 2.D), de uso oral, e por fim os agentes fibrinolíticos, que vão degradar a fibrina, através da ativação de plasmina como a Estreptoquinase (Figura 2.E), Uroquinase (Figura 2.F) e o mais utilizado, o tPA recombinante (Figura 2.G) (WEITZ, 2019;

WANG, 1998), comercialmente chamados de Alteplase, Reteplase e Tenecteplase.

Na literatura é relatado a diversidade de agentes trombolíticos, sobretudo enzimas fibrinolíticas que fazem parte do grupo das proteases (SILVA *et al.*, 2020), dessa maneira apresentam a função de degradar coágulos de fibrina, podendo ser produzidas por microorganismos, como *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 (BATISTA *et al.*, 2017), *Lyophyllum shimeji* (MOON *et al.*, 2014), *Bacillus subtilis* TKU007 (WANG; YEH, 2006), *Paenibacillus polymyxa* (LU *et al.*, 2010), *Mucor subtilissimus* (NASCIMENTO *et al.*, 2020; NASCIMENTO *et al.*, 2016) por animais como cobra, *Bothrops atrox* (CINTRA *et al.*, 2012), minhoca *Lumbricus rubellus* (MIHARA *et al.*, 1991), ferrões de arraias das espécies *Dasyatis sephen* e *Aetobatis narinari* (KUMAR *et al.*, 2010) além dessas enzimas podem ser encontradas em plantas, como no látex de *Euphorbia hirta* (PATEL; KAWALE; SHARMA, 2012), e nas folhas de *Petasites japonicus* (KIM *et al.*, 2015) entre outras.

### 2.3 Caracterização de IFA

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 57, de novembro de 2009, relata sobre o registro de Insumo Farmacêutico Ativo (IFA), objetivando indicar os requisitos para registro com desígnio de garantir a qualidade do produto elaborado. Portanto, são solicitadas informações básicas para registro de IFA, por exemplo nomenclatura, nome químico, fórmula molecular e estrutura, e peso molecular. Também são solicitadas características físico-químicas sobre a molécula, por exemplo solubilidade, perfil cristalino e amorfo, tamanho de partícula, pKa, pH e ponto de fusão ou ebulição.

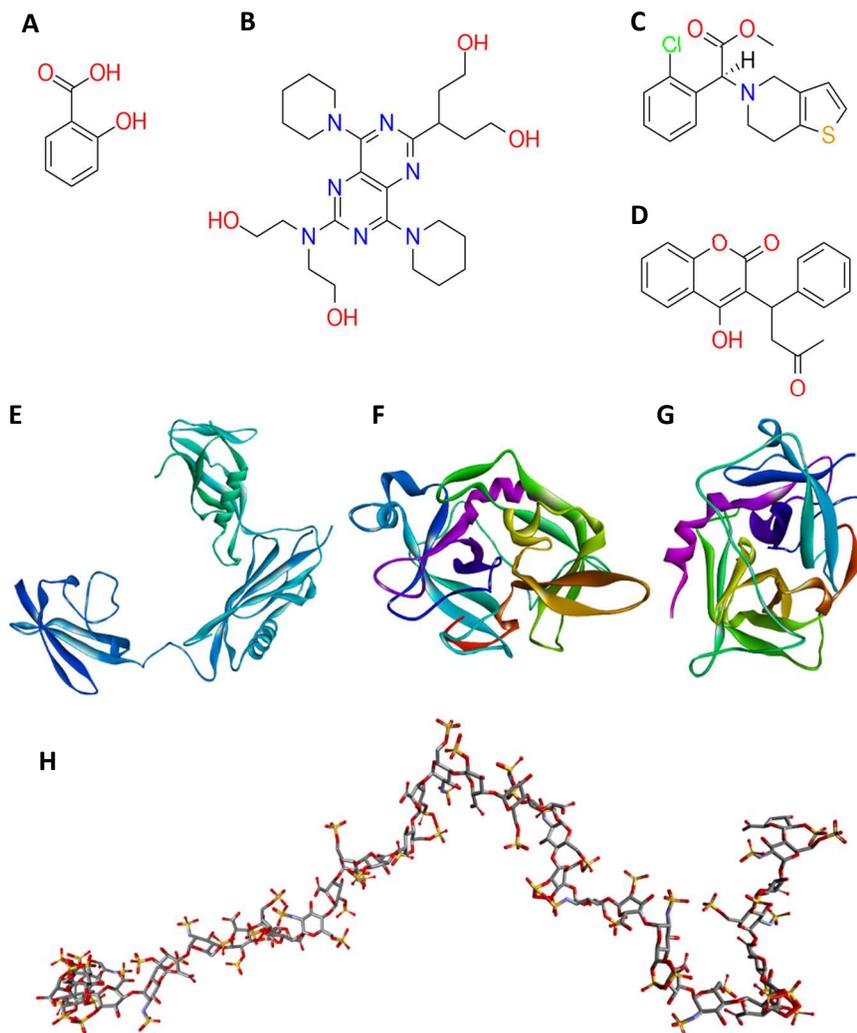
No Brasil para o controle de qualidade do IFA, são exigidas o aspecto, identificação, doseamento, impurezas, propriedades fí-

sico-químicas, distribuição granulométrica, e seu polimorfismo juntamente com sua metodologia analítica e resultados para prováveis polimorfos, teor de estéreo isômeros, quando aplicado, assim como rotação específica, umidade, e limites microbiológicos (BRASIL, 2009).

As características físico-químicas de um IFA podem interferir na biodisponibilidade local e/ou sistêmica da droga. Quando o IFA tem o objetivo de ser veiculado em uma formulação para a via oral, os parâmetros de área de superfície polar, as regras de Lipinski, que correspondem a não apresentar doadores de ligação de hidrogênio demonstrados em grupamentos que contenham OHs e NHs em quantidade maior que cinco, assim como não mais de dez aceptores de ligação de hidrogênio em termos de nitrogênio e oxigênio, peso molecular maior que 500Da e lipofilicidade descrita em logP que não seja maior que 5 (LIPINSKI *et al.*, 2012), pH e pKa, tamanho de partícula, forma de sal, formas cristalinas polimórficas e amorfa, complexação da droga, são os principais a serem avaliados anteriormente à formulação (HURST *et al.*, 2007).

Em relação à forma sólida, o polimorfismo cristalino é bastante estudado, características como estabilidade física, estabilidade química, capacidade de fabricação e absorção oral, podem ser modificadas de acordo com o polimorfo (SINGHAL, 2004). Eventos térmicos são de grande importância, pois avalia a estabilidade térmica, assim como eventos cinéticos, que podem ser utilizados no controle de qualidade do IFA assim como em sua rota sintética (FERREIRA *et al.*, 2016). Entretanto, a Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) a qual é utilizada para avaliar eventos térmicos (FAROONGSARNG, 2016), pode descrever características estruturais de dobramentos e estabilidade de proteínas (JOHNSON, 2013).

**Figura 1** - Fármacos utilizados no tratamento das DCV. Ácido acetilsalicílico (A), Dipiridamol (B), Clopidogrel (C), Varfarina (D), Estreptoquinase (E), Uroquinase (F), tPA (G), Heparina (H). Estruturas em duas dimensões plotadas através do ChemDraw Ultra 12.0 e as em três dimensões visualizadas através de BIOVIA Discovery Studio



Fonte: Grosser, Smyth, FitzGerald 2012 (modificado); Gawade *et al.*, 2021; Weitz, 2012 (modificado); Wang e Zang, 1999 (modificado); Kang *et al.*, 2012 (modificado); Bode e Lamba 1997 (modificado); Khan *et al.*, 2009.

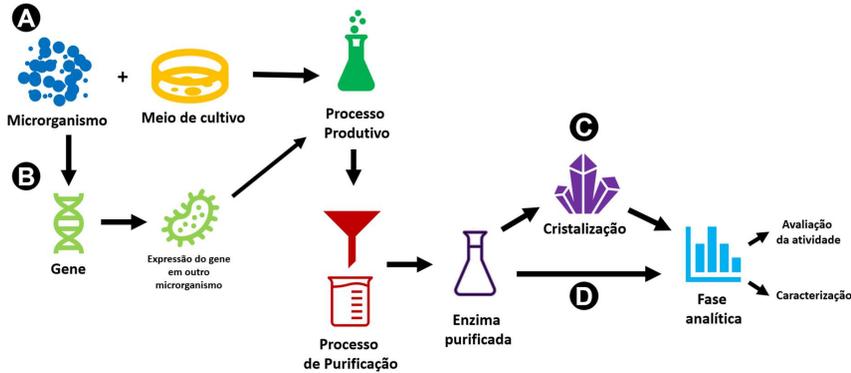
## 2.4 Métodos de obtenção de enzimas fibrinolíticas fúngicas

O processo de produção de enzimas fibrinolíticas se origem fúngica é descrito de acordo com a Figura 4A, no qual, inicialmente é definido o microrganismo, que pode não apresentar modificação genética (LIU *et al.*, 2017<sup>a</sup>) ou ser modificado geneticamente para melhoria de processos produtivos (FAZARY *et al.*, 2010). Com o inóculo do microrganismo definido, é utilizado um meio de cultivo para desenvolvimento do processo fermentativo, como a fermentação submersa, onde o inóculo é adicionado a um caldo nutritivo em um reator com presença de oxigênio e sistema fechado (DORIYA *et al.*, 2016), e a fermentação em estado sólido, que apresenta aspectos econômicos de produção, como a menor utilização de água que a fermentação em estado submerso e a utilização de resíduos agroindustriais (BANAT *et al.*, 2021).

Em seguida, é realizado a purificação do extrato contendo a enzima, podendo utilizar processos cromatográficos (LIU *et al.*, 2017) com ou sem dialise (SHIRASAKA *et al.* 2012) ou sistema de purificação de duas fases aquosas (NASCIMENTO *et al.*, 2016). Após a fração purificada ser definida, a enzima pode sofrer processos de secagem, onde usualmente é utilizado a liofilização, ou ser concentrada e passar para a fase analítica, como observado na Figura 4.

Um dos grandes desafios no processo produtivo dessas biomoléculas é a redução do custo do processo produtivo assim como de purificação, que irá interferir diretamente no valor do produto. Dessa forma é evidente a necessidade de diminuir o custo produtivo desses agentes, além de melhorar características não fundamentais para a atividade como meia vida *in vivo*, estabilidade, custo de produção, resposta imune, dentre outros (TANDON *et al.*, 2021).

Figura 2 - Processos de obtenção de enzimas fibrinolíticas derivadas de fungos



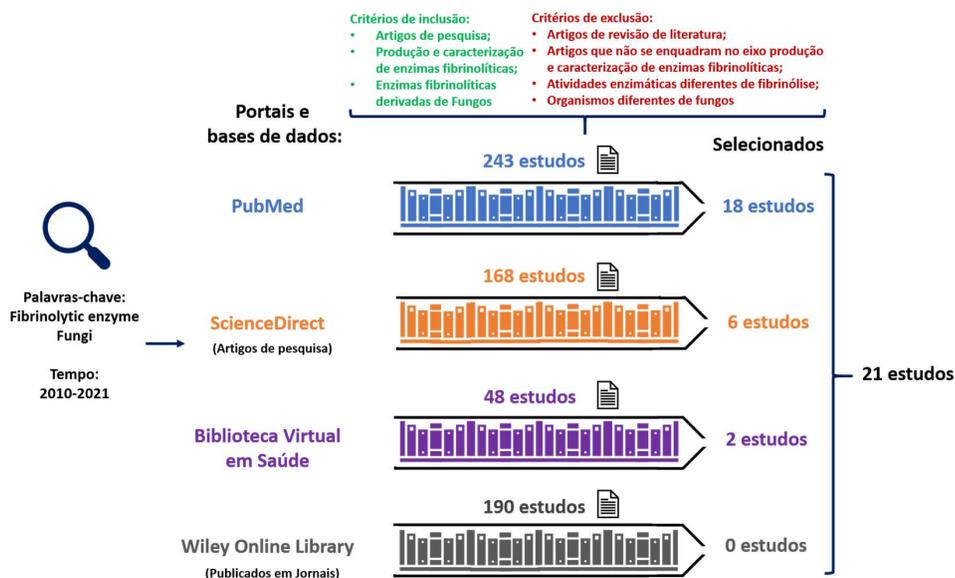
Fonte: Autor, 2022

### 3 METODOLOGIA

A pesquisa foi realizada com base em estudos científicos que relatassem as características físico-químicas das enzimas fibrinolíticas produzidas por fungos. Abrangeu os portais de periódicos PubMed, Biblioteca Virtual em Saúde e Wiley Online Library, além do banco de dados Science Direct. As palavras-chave utilizadas foram fibrinolytic enzyme e fungi, com o período de 2010 a 2021, sendo extraídos apenas artigos científicos de pesquisa. Em seguida, foi adotado critérios de inclusão e exclusão ao ler os títulos e resumo dos artigos. Os critérios de inclusão adotados foram artigos de pesquisa, produção e caracterização de enzimas fibrinolíticas e enzimas fibrinolíticas derivadas de fungos. Já os critérios de exclusão empregados foram artigos de revisão de literatura, artigos que não se enquadraram no eixo produção e caracterização de enzimas fibrinolíticas, atividades enzimáticas diferentes de fibrinólise, e organismos diferentes de fungos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Ao utilizar esses filtros iniciais, foram obtidos no *PubMed* 243 estudos, *ScienceDirect* 168 estudos, Biblioteca Virtual em Saúde 48 estudos e *Wiley Online Library* 190 estudos. Utilizando os critérios de inclusão e exclusão através da leitura dos títulos e resumos, foram obtidos do *PubMed* 18 estudos, *ScienceDirect* 6 estudos, Biblioteca Virtual em Saúde 2 estudos e *Wiley Online Library* 0. Posteriormente ao comparar os estudos repetidos, resultaram em 21 estudos a serem discutidos.



Fonte: Autor, 2022

### 4.1 Características das enzimas fibrinolíticas fúngicas

O peso molecular das enzimas fibrinolíticas produzidas por fungos encontrados na literatura se apresenta na faixa de 30kDa, como a produzida por *Aspergillus oryzae* com aproximadamente 30kDa (SHIRASAKA *et al.*, 2012), e das enzimas derivadas de *Xylaria curta* com aproximadamente 33kDa (MESHRAM *et al.* 2016; MESHRAM,

SAXENA e PAUL, 2016). Apesar disso, foi possível observar enzimas com pesos moleculares maiores, como, a produzida por *Mucor subtilissimus* com 97kDa (NASCIMENTO *et al.*, 2016) e com pesos menores como a produzida por *Paecilomyces tenuipes* com 14kDa (CHA *et al.*, 2010), observados na Tabela 1.

**Tabela 1** – Processos de purificação de forma física final das enzimas fibrinolíticas

Microrganismo	PM (kDa)	Método de purificação	Fase física final da enzima		Referência
			Líquida	Sólida	
<i>Neurospora sitophila</i>	34	Coluna de fluxo rápido Octil Sepharose, coluna Sephadex G-25, coluna SP-Sepharose HP, Superdex 75	Solução	-	Liu <i>et al.</i> (2016)
<i>Neurospora sitophila</i>	30 e 17.5* 49**	Coluna de fluxo rápido Octil Sepharose, coluna Sephadex G-25, coluna de alta performance SP-Sepharose, coluna Superdex 16/60, coluna pre-empacotada	Solução concentrada	-	Deng <i>et al.</i> (2018)
<i>Mucor subtilissimus</i> UCP 1262	97	SDFA (PEG/sulfato)	Solução	-	Nascimento <i>et al.</i> (2016)
<i>Mucor subtilissimus</i> UCP 1262	20	DEAE-Sephadex A-50, diálise, coluna Superdex 75 HR 10/300 GL	Solução concentrada	-	Nascimento <i>et al.</i> (2017)
<i>Mucor subtilissimus</i> UCP 1262	52	SDFA (PEG/sulfato)	Solução	-	Clementino <i>et al.</i> (2019)
<i>Xylaria curta</i>	~33.76	Diálise, resina trocadora de ânion Q-sefarose, cromatografia de média pressão, coluna Sephactyl S-300	Solução concentrada	-	Meshram, Saxena e Paul (2016)
<i>Xylaria curta</i>	~33	Diálise, cromatografia de média pressão, cromatografia de filtração com Sephacryl S-300	Solução concentrada	-	Meshram <i>et al.</i> (2016)
<i>Paecilomyces tenuipes</i>	14	Coluna de CM-celulose, coluna DEAE-Sepharose CL-6B, coluna Sephadex G-75, coluna de troca iônica POROS 20 HQ	Solução	-	Kim <i>et al.</i> (2011)
<i>Auricularia polytricha</i> (Mont.) Sacc	66	SDFA (PEG/sulfato)		Liofilizado	Ali <i>et al.</i> (2014)
<i>Aspergillus oryzae</i> KSK-3	~30	Diálise, coluna DEAE-Toyopearl 650C, coluna Sephacryl S-100, coluna Superdex 75 10/300 GL	Solução concentrada	-	Shirasaka <i>et al.</i> (2012)
<i>Cordyceps militaris</i>	28 e 24.5	Sephadex G-25, coluna Fenil Sepharose HP, coluna de fluxo rápido CM-Sepharose, coluna Superdex 75	-	Liofilizado	Liu <i>et al.</i> (2017)*
<i>Agrocybe aegerita</i>	31.4 e 21.2**	Coluna Sephadex G-25, coluna de fluxo rápido CM-Sepharose, coluna Fonte 15PHE, coluna Mono S 5/50	-	Liofilizado	Li <i>et al.</i> (2021)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	13.6 e 18.2*	Coluna de fluxo rápido Octil-Sepharose, coluna Fenil Sepharose HP, diálise	-	Liofilizado	Liu <i>et al.</i> (2014)
<i>Schizophyllum commune</i>	17	Diálise, coluna DEAE-Sephadex A-50, coluna Sephadex G-75, coluna Sephadex G-50, coluna Sephadex G-75	-	Liofilizado	Park <i>et al.</i> (2010)
<i>Pleurotus eryngii</i>	14	Diálise, ultrafiltração em membrana Amicon YM 10, coluna de troca iônica fluxo rápido DEAE-Sepharose, coluna PD-10, coluna Sephacryl S-300 HR, cromatografia líquida rápida de proteína, coluna Sephacryl S-300 HR	Solução concentrada	-	Cha <i>et al.</i> (2010)
<i>Hericium erinaceum</i>	51	Coluna CM celulose, coluna DEAE-celulose, coluna Sephadex G-75, cromatografia líquida rápida de proteína usando HiLoad 16/60 Superdex 75	Solução concentrada	-	Choi <i>et al.</i> (2013)
<i>Lyophyllum shimeji</i>	21	Cromatografia líquida rápida de proteína usando troca aniônica coluna Mono Q 5/5 e coluna Superdex 200 100/300	Solução concentrada	-	Moon <i>et al.</i> (2014)
<i>Cordyceps militaris</i>	34	Diálise, coluna de fluxo rápido DEAE-Sepharose, coluna PD-10, Cromatografia líquida rápida de proteína com coluna HiLoad 16/60 Superdex 200, HiLoad 16/60, coluna Superdex 75	Solução concentrada	-	Choi <i>et al.</i> (2011)
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>tuberosus</i>	24.5	Diálise, coluna de fluxo rápido DEAE-Sepharose, coluna Sephadex G-75	Solução	-	Zhang <i>et al.</i> (2015)

<i>Pleurotus ferulae</i>	20	Coluna CM celulose, coluna DEAE-Sepharose CL6B 100, diálise, coluna Sephadex G-20, cromatografia líquida de proteína rápida usando coluna HiPrep 26/10	Solução concentrada	-	Choi <i>et al.</i> (2017)
<i>Cordyceps militaris</i>	32	Coluna Sephadex G-25, coluna HP Fenil-Sepharose, coluna de troca catiônica CM-Sepharose de fluxo rápido, coluna de filtração a gel Superdex 75,	-	Liofilizado	Liu <i>et al.</i> (2015)

\*Peso molecular avaliado a partir de duas metodologias diferentes;

\*\*Peso molecular de mais de uma subunidade enzimática; ~ lê-se aproximadamente; SP lê-se sulfopropil; HP lê-se alta performance; DEAE lê-se dietilaminoetil; Q lê-se amônio quartenário; CM lê-se carboximetil; PHE lê-se fenil; PM lê-se peso molecular.

Fonte: Autor, 2022

O peso molecular do IFA apresenta grande importância na definição da forma farmacêutica a ser proposta. O peso molecular de moléculas de caráter proteico dificulta a absorção e permeabilidade segundo um dos parâmetros das regras de Lipinski, o qual não pode passar de 500Da. Além disso essa regra relata que para boa absorção e permeabilidade os candidatos a fármacos não devem apresentar mais que cinco doadores de ligações de hidrogênio e não mais que dez receptores dessas ligações (LIPINSKI *et al.*, 2012). Entretanto, foi observado que a enzima Nattoquinase administrada oralmente em cápsulas gelatinosas mole, apresentou atividade fibrinolítica em um ensaio clínico (KUROSAWA *et al.*, 2015), podendo ser administrada pela via oral, contudo essa enzima pode demonstrar dificuldade enquanto à absorção devido essas barreiras.

Portanto, as enzimas fibrinolíticas apresentariam grandes problemas se vinculadas pela via oral, por causa de suas propriedades físico-químicas, sem levar em conta os desafios fisiológicos que deveriam enfrentar, sendo mais apropriado o uso parenteral dessas possíveis formulações. Além disso, o peso molecular interfere o processo de distribuição dessa classe de moléculas na corrente sanguínea propriamente dita, para os vasos sanguíneos periféricos (JING *et al.*, 2019).

## 4.2 Pureza de enzimas fibrinolíticas

A pureza de um fármaco interfere diretamente na sua segurança e eficácia clínica. Dessa forma é imprescindível a definição de sua pureza, sendo ideal a mais alta pureza para uma molécula destinada a propósitos terapêuticos (JUNQUEIRA, 2012). O processo de purificação de IFAs têm grande impacto na produção do medicamento, pois é um dos pilares de segurança e eficácia do produto farmacêutico. Dessa forma, alguns processos podem apresentar alto custo, como os processos cromatográficos que são bastante aplicados na purificação de biomoléculas.

Dessa maneira, grande parte das enzimas fibrinolíticas reportadas na literatura são purificadas por métodos cromatográficos. Dentre os métodos, as enzimas podem ser purificadas por cromatografia de troca iônica, catiônica ou aniônica, utilizando resinas como Sulfopropil (SP) Sepharose (LIU *et al.* 2016) e Dietilaminoetil (DEAE) Sepharose (ZHANG *et al.*, 2015), além de que podem sofrer cromatografia com resinas de interações hidrofóbicas como Octil Sepharose (DENG *et al.*, 2016), dentre outras, como a cromatografia por afinidade utilizando Carboximetil (CM) Sepharose (LI *et al.*, 2021), como apresentado na Tabela 2. Uma alternativa para purificação é o sistema de duas fases aquosas (SDFA) (NASCIMENTO *et al.* 2016; ALI *et al.* 2014), que é um processo de menor custo que os cromatográficos, visto que não necessita de diferentes fases estacionárias de alto custo, grande quantidade de fases móveis, e equipamento especializado, sendo utilizado na purificação de biomoléculas como anticorpos monoclonais, células, DNA, proteínas entre outras (TORRES-ACOSTA *et al.*, 2019).

Anteriormente aos processos cromatográficos, a precipitação proteica é um método de separação das proteínas do meio rico

em outras moléculas, como o efeito *salting-out*. Essa precipitação é mediada por agentes salinos, como sulfato de amônio que em baixas concentrações tendem a neutralizar as cargas das proteínas, já em altas concentrações consegue polarizar a estrutura favorecendo sua agregação (DUONG-LY; GABELLI, 2014). Além disso o pH que pode induzir que a enzima precipite em seu Ponto Isoelétrico (pI) e solventes orgânicos como etanol e acetona (MOON *et al.* 2014; KIM *et al.* 2011; ALI *et al.* 2014).

A identificação da pureza da atividade da enzima se mostra predominante, ou seja, se for encontrado mais de uma atividade em uma preparação que se demonstra pura nos ensaios de verificação de massa a preparação não é considerada pura (SCOTT; WILLIAMS, 2012). Dessa forma para identificar a pureza das enzimas fibrinolíticas os ensaios presentes na literatura foram eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) para avaliação da massa e o zimograma para atividade da enzima, demonstrados na Tabela 2. Portanto, foi encontrado que a enzima produzida por *Paecilomyces tenuipes* possuiu fator de purificação de 550.7 (KIM *et al.*, 2011) como a maior e a derivada de *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc com 7.01 (ALI *et al.*, 2014) como a menor, exibidos na Tabela 2.

Tabela 2 – Purificação das enzimas fibrinolíticas

Microrganismo	Avaliação de pureza	Método de precipitação	FP	Referência
<i>Neurospora sitophila</i>	SDS-PAGE e atividade fibrinolítica	Sulfato de amônio	75.2	Liu <i>et al.</i> (2016)
<i>Neurospora sitophila</i>	SDS-PAGE e atividade fibrinolítica	Sulfato de amônio	45.2	Deng <i>et al.</i> (2018)
<i>Mucor subtilissimus</i> UCP 1262	SDS-PAGE e zimograma	Sulfato de sódio e PEG	-	Nascimento <i>et al.</i> (2016)
<i>Mucor subtilissimus</i> UCP 1262	SDS-PAGE e zimograma	Sulfato de amônio e acetona	19.31	Nascimento <i>et al.</i> (2017)
<i>Mucor subtilissimus</i> UCP 1262	SDS-PAGE e zimograma	Sulfato de sódio e PEG	-	Clementino <i>et al.</i> (2019)
<i>Xylaria curta</i>	SDS-PAGE e zimograma	Sulfato de amônio	9.19	Meshram, Saxena e Paul (2016)
<i>Xylaria curta</i>	SDS-PAGE e zimograma	Sulfato de amônio	8.38	Meshram <i>et al.</i> (2016)
<i>Paeclomyces tenuipes</i>	SDS-PAGE e zimograma	Etanol	550.7	Kim <i>et al.</i> (2011)
<i>Auricularia polytricha</i> (Mont.) Sacc	SDS-PAGE e método espectrométrico Folin	Acetona	7.01	Ali <i>et al.</i> (2014)
<i>Aspergillus oryzae</i> KSK-3	SDS-PAGE e zimograma	Sulfato de amônio	182.7	Shirasaka <i>et al.</i> (2012)
<i>Cordyceps militaris</i>	SDS-PAGE e método da placa de fibrina modificado	Sulfato de amônio	36	Liu <i>et al.</i> (2017) <sup>a</sup>
<i>Agrocybe aegerita</i>	SDS-PAGE e zimograma	Sulfato de amônio	237.12	Li <i>et al.</i> (2021)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	SDSPAGE e método da placa de fibrina modificado	Sulfato de amônio	147.03	Liu <i>et al.</i> (2014)
<i>Schizophyllum commune</i>	SDS-PAGE e zimograma	Sulfato de amônio	67.2	Park <i>et al.</i> (2010)
<i>Pleurotus eryngii</i>	SDS-PAGE e método da placa de fibrina modificado	Sulfato de amônio	29.3	Cha <i>et al.</i> (2010)
<i>Hericium erinaceum</i>	SDS-PAGE e método da placa de fibrina	-	538.2	Choi <i>et al.</i> (2013)
<i>Lyophyllum shimeji</i>	SDS-PAGE e zimograma	Etanol	80.9	Moon <i>et al.</i> (2014)
<i>Cordyceps militaris</i>	SDS-PAGE e zimograma	Sulfato de amônio	86.1	Choi <i>et al.</i> (2011)
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>tuberosus</i>	SDS-PAGE e método da placa de fibrina	Sulfato de amônio	38.1	Zhang <i>et al.</i> (2015)
<i>Pleurotus ferulae</i>	SDS-PAGE e zimograma	Etanol	59.65	Choi <i>et al.</i> (2017)
<i>Cordyceps militaris</i>	SDS-PAGE e método da placa de fibrina	Sulfato de amônio	41.3	Liu <i>et al.</i> (2015)

Legenda: SDS-PAGE lê-se Poliacrilamida Dodecil Sulfato de Sódio; PEG lê-se Polietileno glicol; FP lê-se Fator de Purificação.

Fonte: Autor, 2022

### 4.3 Influência do pH e temperatura na atividade de enzimas e sua importância tecnológica

Para que os fármacos atuem em seu alvo terapêutico, necessitam de condições ideais, por exemplo é necessário que o potencial hidrogeniônico (pH) esteja favorável para interações intermoleculares em seu alvo terapêutico. Além disso, as enzimas de modo geral apresentam suas condições ideais e ótimas para trabalho. Ao induzir essas moléculas o pH e temperaturas desfavoráveis pode acontecer reações de mudança de estrutura química, podendo perder a função. Ademais, as moléculas de característica proteica podem precipitar em faixas específicas de pH, na qual é formado o íon *zwitterion*, ou seja, é atingido o ponto isoelétrico (pI), onde as cargas residuais se anulam (NELSON & COX, 2019). Ao se tratar de formulações injetáveis na corrente sanguínea se deve a atenção para que o pH sanguíneo não seja um fator desencadeante dessas reações e provocar embolias.

Ao observar os pI das enzimas fibrinolíticas fúngicas relatadas na literatura, é visto que elas apresentam faixas de precipitação

distantes do pH fisiológico, como a produzida por *Neurospora sitophila* (pI  $9.3 \pm 0.2$ ) (LIU *et al.*, 2016), sendo com pH bastante alcalino e a enzima produzida por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 (pI 5.4) com pH ácido (NASCIMENTO *et al.*, 2016) (Tabela 3). Todavia, grande parte das enzimas fibrinolíticas presentes na literatura não apresentam estudos de pI como a da enzima produzida por *Rhizopus microsporus* var. *tuberosus* (ZHANG *et al.*, 2015) apresentados na Tabela 3, parâmetro essencial para indicar métodos de purificação, aumento de rendimento e até processos unitários para produzir formulações.

**Tabela 3** – Caracterização dos parâmetros de atividade, estabilidade e ponto isoelétrico das enzimas fibrinolíticas

Microrganismo	Parâmetros de ótima atividade		pI	Parâmetros de estabilidade		Referência
	pH	Temp. (°C)		pH	Temp. (°C)	
<i>Neurospora sitophila</i>	7.6	41	$9.3 \pm 0.2$	4 - 11	< 55	Liu <i>et al.</i> (2016)
<i>Neurospora sitophila</i>	7.4	50	$7.9 \pm 0.1$	6.8 - 8.8	25-52	Deng <i>et al.</i> (2018)
<i>Mucor subtilissimus</i> UCP 1262	-	37	5,4	-	37	Nascimento <i>et al.</i> (2016)
<i>Mucor subtilissimus</i> UCP 1262	8	40	4.94	6-8.5	40-50	Nascimento <i>et al.</i> (2017)
<i>Mucor subtilissimus</i> UCP 1262	7.0	50	-	6.0-8.5	10-50	Clementino <i>et al.</i> (2019)
<i>Xylaria curta</i>	8	35	-	7.0-8.0	40	Meshram, Saxena e Paul (2016)
<i>Xylaria curta</i>	8	35	-	5-8	Diminui de 35-50	Meshram <i>et al.</i> (2016)
<i>Paecilomyces tenuipes</i>	5.0	35	-	5.0-8.0	< 40	Kim <i>et al.</i> (2011)
<i>Aspergillus oryzae</i> KSK-3	6	50	-	4-9	Até 50	Shirasaka <i>et al.</i> (2012)
<i>Cordyceps militaris</i>	7.2	37	$9.0 \pm 0.2$	3.0-11.0	Até 55	Liu <i>et al.</i> (2017) <sup>a</sup>
<i>Agrocybe aegerita</i>	7.6	47	-	6.4-8.2	25-42	Li <i>et al.</i> (2021)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	7.4	45	8.52	6.3-9	< 45	Liu <i>et al.</i> (2014)
<i>Schizophyllum commune</i>	4.0-6.0	~45	-	4.0-6.0	< 50	Park <i>et al.</i> (2010)
<i>Pleurotus eryngii</i>	5.0	40	-	4.0-6.0	30-40	Cha <i>et al.</i> (2010)
<i>Hericium erinaceum</i>	7.0	30	-	5.5-7.0	< 40	Choi <i>et al.</i> (2013)

<i>Lyophyllum shimeji</i>	8	40	-	7-8	30-60	Moon et al. (2014)
<i>Cordyceps militaris</i>	7.0	40	8.2	5-11	20-40	Choi et al. (2011)
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>Tuberosus</i>	7.0	37	-	6.0-8.0	37	Zhang et al. (2015)
<i>Pleurotus ferulae</i>	4.0, 5.0 e 8.0	50	-	7.0, 7.4 e 8.0	8	Choi et al. (2017)
<i>Cordyceps militaris</i>	7.4	37	9.3 ± 0.2	6-11	23-60	Liu et al. (2015)

Legenda: pH lê-se potencial hidrogeniônico; pI lê-se ponto isoelétrico; °C lê-se grau Celcius; ± lê-se mais ou menos; < lê-se menor que. (Fonte: Autor, 2021).

Algumas das atividades ótimas demonstradas pelas enzimas fibrinolíticas derivadas de fungos são promissoras, devido a sua semelhança com as condições fisiológicas de pH e temperatura. As enzimas produzidas por *Neurospora sitophila* e *Pleurotus ostreatus* apresentam pH semelhante ao sanguíneo, sendo 7.4 (DENG et al., 2018; LIU et al., 2014) levemente básico assim como a plasmina humana, ativador de plasminogênio tecidual, e uroquinase (SUN et al., 2016), presentes na Tabela 3. Enquanto isso, enzimas produzidas pelos fungos *Neurospora sitophila* (pH 7.6), *Cordyceps militaris* (pH 7.2) e *Agrocybe aegerita* (pH 7.6) apresentam seu pH de máxima atividade próximo ao fisiológico sanguíneo (LIU et al., 2016; LIU et al., 2017<sup>a</sup>; LI et al., 2021), já as produzidas por *Xylaria curta* (pH 8) e *Lyophyllum shimeji* (pH 8) (MESHARAM, SAXENA e PAUL, 2016; MESHARAM et al., 2016) têm suas atividades ótimas em pH alcalino, e *Paecilomyces tenuipes*, *Schizophyllum commune* e *Pleurotus eryngii* em pH ácido (KIM et al., 2011; PARK et al., 2010; LIU et al., 2014), características essas incompatíveis com a fisiologia sanguínea, dessa forma apresentam atividades mais baixas que em condições ótimas, dessa forma se utilizadas *in vivo* não apresentarão a cinética desejada, sendo dessa forma avaliado sua eficácia e segurança na possível terapêutica, contudo podem ser utilizadas para outras finalidades, como em sanitizantes e em diagnóstico.

Ao analisar a temperatura ótima de atividade das enzimas fibrinolíticas derivadas de fungos na literatura, foi encontrado e sumarizado na Tabela 3, que as enzimas produzidas por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 (37°C), *Xylaria curta* (35°C), *Paecilomyces tenuipes* (35°C), *Cordyceps militaris* (37°C) e *Rhizopus microsporus* var. *tuberosus* (37°C) apresentam condições próximas a temperatura fisiológica (NASCIMENTO *et al.*, 2016; MESHARAM, SAXENA, PAUL, 2016; MESHARAM *et al.*, 2016; KIM *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2017<sup>a</sup>; ZHANG *et al.* 2015). Por outro lado, outras enzimas apresentem temperaturas elevadas de máxima atividade como a derivada da *Neurospora sitophila* (41 e 50 °C) (LIU *et al.*, 2016; DENG *et al.*, 2018), assim como baixa temperatura como a produzida por *Hericiium erinaceum* (30°C) (CHOI *et al.* 2013), apresentados na Tabela 3.

A estabilidade dessas moléculas é um parâmetro de grande importância para a formulação e estratégias de armazenamento, pois ao escolher o processo produtivo e de armazenamento, pode interferir diretamente na segurança e eficácia do produto. As enzimas fibrinolíticas estudadas, apresentam faixas de estabilidade favoráveis para a aplicação na corrente sanguínea sem interferir em sua estabilidade, como observado na Tabela 3. Contudo é observado que as enzimas produzidas por *Schizophyllum commune*, *Pleurotus eryngii* e *Hericiium erinaceum* podem sofrer processos de degradação na circulação sanguínea que pode interferir diretamente na eficácia e segurança se forem administrados por via parenteral, devido suas faixas de estabilidade ser até o pH 7.0 (PARK *et al.*, 2010; CHA *et al.* 2010; CHOI *et al.*, 2013).

Da mesma forma, a estabilidade térmica pode indicar as condições de armazenamento, a segurança e eficácia além das operações unitárias a serem seguidas como a secagem. As enzimas fibrinolíticas dos fungos reportadas na literatura se apresentam bastante

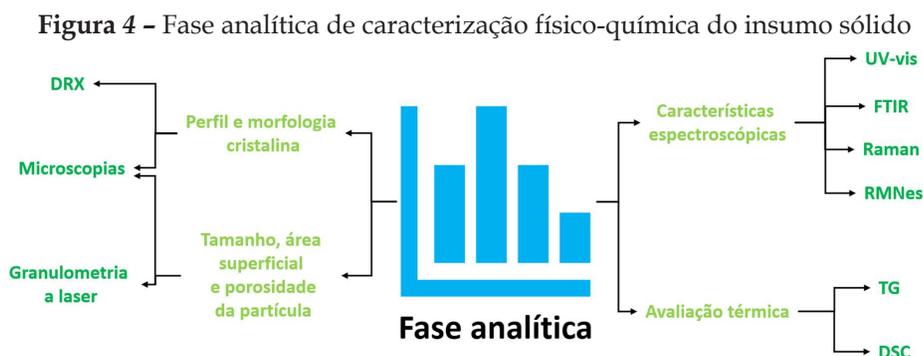
termolábeis, tendo estabilidade em torno dos 40°C, como a produzida por *Agroclybe aegerita* que apresenta estabilidade térmica na faixa de 25 a 42°C (LI *et al.* 2021). Enquanto isso a enzima de *Lyophyllum shimeji* se destaca dentre as demais por ser estável na faixa de 30 a 60°C (MOON *et al.* 2014), como visualizado na Tabela 3.

Dessa forma, as enzimas que possuem maior estabilidade térmica podem estar aptas a processos de secagem térmicos como o *spray dryer*. Essa técnica apresenta como característica a secagem pela dispersão de gotículas uniformes de solução contra uma corrente de ar seco e quente, formando partículas esféricas podendo controlar o tamanho delas (AUTON; TAYLOR, 2016; CHEN *et al.*, 2021). Neste processo, podem ser utilizados excipientes como açúcares e polióis para melhorar a estabilidade ao estresse térmico (CHEN *et al.*, 2021). Com a vantagem de poder utilizar mais de uma técnica de secagem, pode ser averiguado diferentes características cristalinas, que pode influenciar no desenvolvimento farmacêutico e conseqüentemente na farmacoterapia da enzima.

A liofilização é a mais utilizada para produtos de caráter proteico, visto que geralmente são moléculas sensíveis ao calor. Dessa forma as enzimas termolábeis devem continuar com o processo de secagem por liofilização, que apresenta como principal característica a sublimação do solvente, onde inicialmente se deve congelar o produto e em seguida submetê-lo ao vácuo, em parâmetros definidos para cada solvente (CHEN *et al.*, 2021). Foi verificado na literatura que as novas enzimas fibrinolíticas apresentam apenas essa técnica final para serem transformadas no estado sólido, como a produzida por *Cordyceps militaris* (LIU *et al.* 2017<sup>a</sup>).

## 4.4 Técnicas de caracterização físico-química de IFA

Depois de realizar os ensaios para avaliar a atividade das enzimas fibrinolíticas, é necessário realizar a caracterização físico-química para prosseguir com o desenvolvimento de formulações desse novo IFA, utilizando técnicas analíticas como exemplificado na Figura 5. As enzimas produzidas que se apresentam na forma farmacêutica de pó liofilizado como a produzida por *Agrocybe aegerita* (LI *et al.*, 2021), apresentam a tendência de serem mais estáveis quimicamente, pois na forma sólida com adição de excipientes adequados, há redução de reações de degradação como a agregação molecular, uma das primeiras fases de degradação química de moléculas proteicas, redução da entropia, reações de hidrólise, dentre outras (CAO *et al.*, 2013). Portanto, é preferencial que essas moléculas estejam na forma sólida, pois além de sua estabilidade, custos de produção e de logística são menores.



Legenda: DRX lê-se Difratomografia de raios X; UV-vis lê-se Ultravioleta na região do visível; FTIR lê-se Infravermelho por Transformada de Fourier; RMNes lê-se Ressonância Magnética Nuclear no estado sólido; TG lê-se Termogravimetria; DSC lê-se Calorimetria Diferencial Exploratória.

Fonte: Autor, 2021

As técnicas analíticas que caracterizam a forma sólida de fármacos são diversas, buscando identificar informações essenciais sobre o pó, para garantir a segurança e eficácia do tratamento. Em um cristal as moléculas se organizam espacialmente na ordem de longo-

-alcance produzindo a característica cristalina, ou não se apresentem de ordem de longo-alcance chamados de amorfos, para isso é utilizado a técnica de Difractometria de Raios X (DRX). Dessa forma, é possível identificar através da difração de raios X informações sobre essa organização estrutural, como polimorfismo, grau de cristalização, dentre outros, (GILMORE, 2011) dados esses que afetam a biodisponibilidade, segurança e consequentemente resposta terapêutica.

Outras técnicas complementares de identificação estrutural da forma sólida utilizam como princípio a estrutura microscópica do cristal, dentre elas estão a microscopia eletrônica de varredura, microscopia de luz polarizada e microscopia de força atômica, que também podem identificar os tamanhos das partículas, morfologia, propriedades de superfícies dentre outras (LIU *et al.*, 2017<sup>b</sup>). Além disso, as técnicas para definir a granulometria podem identificar suas dimensões (BOSCHINI *et al.*, 2015), que pode ser complementado com a análise da área superficial e tamanho de poros, utilizando adsorção de gás, porosimetria de mercúrio, sorção gravimétrica de vapor e permeação de gás (KAUR; KALE; BANSAL, 2021) que pode implicar na solubilidade, estabilidade e futuras formulações do IFA. O DRX além de oferecer características da fase sólida, pode ser utilizada para caracterizar estruturas tridimensionais de proteínas, como foi realizada para a enzima feruloil esterase produzida por *Aspergillus awamori* em *Escherichia coli* (Fazary *et al.*, 2010), técnica também conhecida como cristalografia de raios X.

As análises térmicas por sua vez têm o poder de identificar fenômenos essenciais na caracterização da forma sólida, como a Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC), que ao induzir o analito a determinadas temperaturas, identifica fenômenos térmicos como transição vítrea e ponto de fusão, indicando informações pertinentes sobre as estruturas proteicas, estabilidade e conformação do sólido

seja cristalino ou não (SAOTOME *et al.*, 2016; JOHNSON, 2013; CHEN *et al.*, 2021). A termogravimetria (TG), uma variação da gravimetria, pode identificar o teor de umidade, perfil de decomposição dentre outras informações essenciais do IFA (ENEV *et al.*, 2019).

Ao induzir os analitos à radiação na região do infravermelho (IV), é possível identificar dobramentos e estiramentos moleculares devido a absorção dessa energia, interferindo no momento de dipolo, que correspondem a funções orgânicas características de cada molécula (LOPES; FASCIO, 2004). Usualmente é utilizada a Transformada de Fourier para auxiliar na interpretação de seus resultados, sendo denominado Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). Além de identificar as funções orgânicas, também é possível identificar a forma cristalina polimórfica ou se é amorfo de acordo com o espectro, podendo ser utilizado no controle de qualidade na diferenciação de polimorfos (SURESH; ASHE; MATZGER, 2019), além de que em proteínas é possível identificar informações sobre a estrutura secundária em estudos de estabilidade (CHEN *et al.*, 2021).

Por sua vez ao ser complementar ao FTIR, a espectroscopia Raman, que utiliza o espalhamento da radiação que é emitida sobre ela, sendo bastante utilizada associada com microscopia. É utilizada para investigar características e ensaios de formulações (LIU *et al.*, 2017<sup>b</sup>). Enquanto isso ao induzir o analito à radiação ultravioleta na região do visível é possível fazer transições de elétrons de orbitais de menores para maiores energias potenciais (PAVIA *et al.*, 2010). Com isso a definição do melhor comprimento de onda ( $\lambda$ ), é possível utilizar esse parâmetro para quantificações das proteínas, porém pode sofrer interferências de outras moléculas cromóforas (AVELLA; GÖRNER; DONATO, 2010).

Utilizando a Ressonância Magnética Nuclear em Estado Sólido (RMNes) é possível visualizar a dinâmica de fármacos sólidos,

estrutura proteica, interações entre excipiente e proteína (CHEN *et al.*, 2021; LADIZHANSKY, 2018), dentre outros. Para que isso ocorra, o analito é induzido a um campo magnético que irá interagir com o spin nuclear dos átomos, induzindo a fenômenos quânticos sendo detectado como ressonância (BERENDT *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2021).

De qualquer forma, as enzimas promissoras para tratamento de patologias fibrinolíticas, como a produzida por *Cordyceps militaris* (Liu *et al.* 2017<sup>a</sup>), pois seu pH e temperatura são próximos da fisiologia humana, não apresentam estudos mais avançados de pré-formulação na literatura, onde a caracterização da fase sólida se demonstra de grande importância. Além disso, pequena parte das enzimas observadas se apresentam na forma sólida, isso pode ser explicado pela dificuldade de polímeros e moléculas de alta flexibilidade têm de formar cristais, para entender melhor o processo, estudos utilizam cálculos estatísticos, baseados na estrutura primária e tridimensional das proteínas para prever a cristalização (HANCOCK, 2017).

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As doenças trombóticas apresentam perspectivas preocupantes em meio a atualidade e a projeções futuras. A terapêutica dessas doenças utiliza medicamentos de alto custo, que impactam diretamente no sistema de saúde público e privado. As enzimas fibrinolíticas derivadas de fungos têm sido relatadas na literatura como agentes potenciais para a terapêutica dessas doenças, com parâmetros de atividades condizentes com a fisiologia humana. Algumas dessas moléculas são abordadas na fase sólida, comumente transformadas a partir do processo de secagem em baixa temperatura, como a liofilização. Os estudos de caracterização físico-química presentes na literatura, abordam termos de pH, estabilidade, peso molecular, pureza, dentre outros, contudo não estudam a fase sólida por falta

de aporte tecnológico e científico ou problemas de solidificação das enzimas. Portanto, se faz necessário o aprimoramento dessa área voltada a essas enzimas potenciais, para que possam se tornar novos medicamentos.

## REFERÊNCIAS

ADEBOYEJE, G. *et al.* Major Bleeding Risk During Anticoagulation with Warfarin, Dabigatran, Apixaban, or Rivaroxaban in Patients with Nonvalvular Atrial Fibrillation. **Journal Of Managed Care & Specialty Pharmacy**, [s.l.], v. 23, n. 9, p. 968-978, set. 2017.

ALI, S. M. *et al.* Recovery and partial purification of fibrinolytic enzymes of *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc by an aqueous two-phase system. **Separation And Purification Technology**, [s.l.], v. 122, p. 359-366, fev. 2014.

Aminoácidos, peptídeos e proteínas. In: NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019. Cap. 3. p. 75-114.

AULTON, M. E.; TAYLOR, K. M. G. **Aulton Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 4. ed. Elsevier: Rio de Janeiro, 2016.

AVELLA, A. C.; GÖRNER, T.; DONATO, P. The pitfalls of protein quantification in wastewater treatment studies. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 408, n. 20, p. 4906-4909, set. 2010.

BANAT, I. M. *et al.* Biosurfactants: the green generation of specialty chemicals and potential production using solid-state fermentation (ssf) technology. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 320, p. 1-13, jan. 2021.

BARROS, P. D. S. *et al.* Fibrinolytic enzyme from *Arthrospira platensis* cultivated in medium culture supplemented with corn steep li-

quor. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 164, p. 3446-3453, dez. 2020.

BATISTA, J. M. S. *et al.* Produção e caracterização de protease fibrinolítica de *Streptomyces parvulus* DPUA 1573. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [s.l.], v. 69, n. 1, p.123-129, fev. 2017.

BERENDT, R. T. *et al.* Solid-state NMR spectroscopy in pharmaceutical research and analysis. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 25, n. 10, p. 977-984, nov. 2006.

BLÜM, P. *et al.* Arterial thrombosis in the context of HCV-associated vascular disease can be prevented by protein C. **Cellular & Molecular Immunology**, [S.L.], v. 14, n. 12, p. 986-996, 18 abr. 2016.

BODE, W., LAMBA, D. 1RTF COMPLEX OF BENZAMIDINE WITH THE CATALYTIC DOMAIN OF HUMAN TWO CHAIN TISSUE PLASMINOGEN ACTIVATOR [(TC)-T-PA]. **Protein Data Bank**, 1997. Disponível em: <https://www.rcsb.org/structure/1RTF>. Acesso em 25 de mar. de 2021.

BOSCHINI, F. *et al.* Linking flowability and granulometry of lactose powders. **International Journal of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 494, n. 1, p. 312-320, out. 2015.

BRASIL, Resolução ANVISA RDC nº 57 de 17 de novembro de 2009. Regulamento técnico que trata do Registro de insumos farmacêuticos ativos (IFA). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, Poder Executivo de novembro, 2009.

CAO, W. *et al.* Rational design of lyophilized high concentration protein formulations-mitigating the challenge of slow reconstitution with multidisciplinary strategies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s.l.], v. 85, n. 2, p. 287-293, out. 2013.

CASTRO, Rebecca A.; FRISHMAN, William H. Thrombotic Complications of COVID-19 Infection. **Cardiology In Review**, [s.l.], v. 29, n. 1, p. 43-47, 17 set. 2020.

CHA, W. S. *et al.* Biochemical and enzymatic properties of a fibrinolytic enzyme from *Pleurotus eryngii* cultivated under solid-state conditions using corn cob. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 101, n. 16, p. 6475-6481, ago. 2010.

ChemDraw Ultra 12.0.2.1076.[s.l.] CambridgeSoft Corporation, 2010.

CHEN, Y. *et al.* Pharmaceutical protein solids: drying technology, solid-state characterization and stability. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], mar. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X21000624#b1220>. Acesso em 19 de mar. de 2021.

CHOI, B. S. *et al.* Herinase: a novel bi-functional fibrinolytic protease from the monkey head mushroom, *Hericium erinaceum*. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, [s.l.], v. 170, n. 3, p. 609-622, 7 abr. 2013.

CHOI, D. *et al.* Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from fruiting bodies of Korean *Cordyceps militaris*. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 102, n. 3, p. 3279-3285, fev. 2011.

CHOI, J. H. *et al.* Purification and partial characterization of a fibrinolytic enzyme from the fruiting body of the medicinal and edible mushroom *Pleurotus ferulae*. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, [s.l.], v. 47, n. 6, p. 539-546, 16 jun. 2017.

CINTRA, A. C. O. *et al.* Batroxase, a new metalloproteinase from B. atrox snake venom with strong fibrinolytic activity. **Toxicon**, [s.l.], v. 60, n. 1, p.70-82, jul. 2012.

CLEMENTINO, E.L. *et al.* Produção e purificação integrada de protease fibrinolítica de *Mucor subtilissimus* UCP 1262. **Arquivo Brasileiro**

**de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [s.l.], v. 71, n. 2, p. 553-562, abr. 2019.

DENG, Y. *et al.* A dual-function chymotrypsin-like serine protease with plasminogen activation and fibrinolytic activities from the GRAS fungus, *Neurospora sitophila*. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 109, p. 1338-1343, abr. 2018.

DENIZLI, A. Plasma fractionation: conventional and chromatographic methods for albumin purification. **Hacettepe J. Biol. & Chem.**, [s.l.], v. 39, n. 4, p. 315-341, dez. 2011.

Discovery Studio Visualiser. V20.1.0.19295. [s.l.]: Dassault Systèmes Biovia Corp, 2019.

DORIYA, K. *et al.* Solid-State Fermentation vs Submerged Fermentation for the Production of L-Asparaginase. In: TAYLOR, Steve. **Advances in Food and Nutrition Research**. [s.l.]: Elsevier, 2016. Cap. 6. p. 115-135.

DUONG-LY, K. C.; GABELLI, S. B.. Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation. **Methods In Enzymology**, [s.l.], p. 85-94, 2014.

ENEV, V. *et al.* ATR-FTIR spectroscopy and thermogravimetry characterization of water in polyelectrolyte-surfactant hydrogels. **Colloids And Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s.l.], v. 575, p. 1-9, ago. 2019.

Espectroscopia no Ultravioleta. In: PAVIA, D. L.; LAMPMAN, Gary M.; KRIZ, George S.; VYVYAN, James R. **Introdução à Espectroscopia**. 4. ed. [s.l.]: Cengage Learning, 2010. Cap. 7. p. 365-398.

FAROONGSARNG, Damrongsak. Theoretical Aspects of Differential Scanning Calorimetry as a Tool for the Studies of Equilibrium Thermodynamics in Pharmaceutical Solid Phase Transitions. **Aaps Pharmscitech**, [s.l.], v. 17, n. 3, p. 572-577, 18 abr. 2016.

FAZARY, A. E. *et al.* Expression of feruloyl esterase from *Aspergillus awamori* in *Escherichia coli*: characterization and crystal studies of the recombinant enzyme. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 46, n. 4, p. 440-444, maio 2010.

FERREIRA, B. D. L. *et al.* Kinetic study of anti-HIV drugs by thermal decomposition analysis. **Journal Of Thermal Analysis And Calorimetry**, [s.l.], v. 127, n. 1, p.577-585, 26 set. 2016.

GAWADE, A. *et al.* Improvement of Physicochemical and Solubility of Dipyrindamole by Cocrystallization Technology. **Journal Of Drug Delivery And Therapeutics**, [s.l.], v. 11, n. 1-, p. 43-48, 15 fev. 2021.

GILMORE, C. J. X-Ray Diffraction. **Solid State Characterization Of Pharmaceuticals**, [s.l.], p. 35-70, 31 mar. 2011.

GOEIJENBIER, M.; VAN WISSEN, M.; WEG, C. van de; JONG, E.; GERDES, V.e.A.; MEIJERS, J.C.M.; BRANDJES, D.P.M.; VAN GORP, E.C.M.. Review: viral infections and mechanisms of thrombosis and bleeding. **Journal Of Medical Virology**, [S.L.], v. 84, n. 10, p. 1680-1696, 15 ago. 2012.

GROSSER, T.; SMYTH E.; FITZGERALD, G. A. Agentes anti-inflamatórios, antipiréticos e analgésicos. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; C., KNOLLMAN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: Amgh, 2012. Cap. 34. p. 959-1003.

HANCOCK, B. C. Predicting the Crystallization Propensity of Drug-Like Molecules. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [s.ll.], v. 106, n. 1, p. 28-30, jan. 2017.

HEIDENREICH, P. A. *et al.* Forecasting the Future of Cardiovascular Disease in the United States. **Circulation**, [s.l.], v. 123, n. 8, p.933-944, mar. 2011.

HURST, S. *et al.* Impact of physiological, physicochemical and biopharmaceutical factors in absorption and metabolism mechanisms on the drug oral bioavailability of rats and humans. **Expert Opinion On Drug Metabolism & Toxicology**, [s.l.], v. 3, n. 4, p.469-489, ago. 2007.

JING, X. *et al.* Key Physicochemical Characteristics Influencing ADME Properties of Therapeutic Proteins. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, [s.l.], p. 115-129, 2019.

JOHNSON, C. M. Differential scanning calorimetry as a tool for protein folding and stability. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, [s.l.], v. 531, n. 1-2, p. 100-109, mar. 2013.

JUNQUEIRA, César Alexandre. **Determinação de pureza de fármacos por meio de métodos diretos e indiretos: vantagens e desvantagens**. 2012. 122 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/143686>. Acesso em: 05 maio 2021.

KANG, Y. N. *et al.* 4FUB Crystal Structure of the Urokinase. **Protein Data Bank**, 2012. Disponível em: <https://www.rcsb.org/structure/4FUB>. Acesso em 25 de mar. de 2021.

KAUR, A.; KALE, D. P.; BANSAL, A. K. Surface characterization of pharmaceutical solids. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 138, p. 116228, maio 2021.

KELKAR, A. H. *et al.* Cytomegalovirus-Associated Venous and Arterial Thrombotic Disease. **Cureus**, [s.l.], p. 1-9, 18 dez. 2020.

KHAN, S. *et al.* 3IRL Solution Structure of Heparin dp36. **Protein Data Bank**, 2009. Disponível em: <https://www.rcsb.org/structure/3IRL>. Acesso em 25 de mar. de 2021.

KIM, D. *et al.* Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from *Petasites japonicus*. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 72, p.1159-1167, jan. 2015.

KIM, H. C. *et al.* Purification and characterization of a novel, highly potent fibrinolytic enzyme from *Paecilomyces tenuipes*. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 46, n. 8, p. 1545-1553, ago. 2011.

KUMAR, K. R. *et al.* Fibrinogenolytic and anticoagulant activities in the tissue covering the stingers of marine stingrays *Dasyatis sephen* and *Aetobatis narinari*. **Journal Of Thrombosis And Thrombolysis**, [s.l.], v. 31, n. 4, p.464-471, 17 dez. 2010.

KUROSAWA, Y. *et al.* A single-dose of oral nattokinase potentiates thrombolysis and anti-coagulation profiles. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 5, n. 1, p. 1-7, 25 jun. 2015.

LADIZHANSKY, V.. Solid-State NMR of Macromolecules. **Reference Module In Chemistry, Molecular Sciences And Chemical Engineering**, [s.l.], p. 1-13, 2018.

LI, G. *et al.* A novel serine protease with anticoagulant and fibrinolytic activities from the fruiting bodies of mushroom *Agrocybe aegerita*. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 168, p. 631-639, jan. 2021.

LI, G. *et al.* Cloning, Expression and Characterization of a Gene from Earthworm *Eisenia fetida* Encoding a Blood-Clot Dissolving Protein. **Plos One**, [s.l.], v. 7, n. 12, p.1-9, 27 dez. 2012.

LIPINSKI, C. A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 64, p. 4-17, dez. 2012.

LIU, X. *et al.* Biochemical characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Cordyceps militaris*. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 94, p. 793-801, jan. 2017<sup>a</sup>.

LIU, X. *et al.* Characterization of amorphous solid dispersions. **Journal Of Pharmaceutical Investigation**, [s.l.], v. 48, n. 1, p. 19-41, 27 out. 2017<sup>b</sup>.

LIU, X. *et al.* Purification and Biochemical Characterization of a Novel Fibrinolytic Enzyme from Culture Supernatant of *Cordyceps militaris*. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 63, n. 8, p. 2215-2224, 23 fev. 2015.

LIU, X. L. *et al.* Purification and Characterization of a Novel Fibrinolytic Enzyme from Culture Supernatant of *Pleurotus ostreatus*. **Journal Of Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 24, n. 2, p. 245-253, 28 fev. 2014.

LIU, X. L. *et al.* Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from the food-grade fungus, *Neurospora sitophila*. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 134, p. 98-104, dez. 2016.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, [s.l.], v. 27, n. 4, p. 670-673, ago. 2004.

LOWE, G. D. O. Venous and arterial thrombosis: epidemiology and risk factors at various ages. **Maturitas**, [s.l.], v. 47, n. 4, p.259-263, abr. 2004.

LU, F. *et al.* Purification and characterization of a novel anticoagulant and fibrinolytic enzyme produced by endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. **Thrombosis Research**, [s.l.], v. 126, n. 5, p.349-355, nov. 2010.

MANSUR, A. P.; FAVARATO, D. Mortalidade por doenças cardiovasculares no Brasil e na região metropolitana de São Paulo: atualização

2011. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [s.l.], v. 99, n. 2, p.755-761, ago. 2012.

MASSA, K. H. C.; DUARTE, Y. A. O.; CHIAVEGATTO FILHO, A. D. P. Análise da prevalência de doenças cardiovasculares e fatores associados em idosos, 2000-2010. **Ciência & Saúde Coletiva**, [s.l.], v. 24, n. 1, p. 105-114, jan. 2019.

MESHARAM, V. *et al.* Production, Purification and Characterisation of a Potential Fibrinolytic Protease from Endophytic *Xylaria curta* by Solid Substrate Fermentation. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, [s.l.], v. 181, n. 4, p. 1496-1512, 27 out. 2016.

MESHARAM, V.; SAXENA, S.; PAUL, K. Xylarinase: a novel clot busting enzyme from an endophytic fungus *Xylaria curta*. **Journal Of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 31, n. 6, p. 1502-1511, 31 mar. 2016.

MIHARA, H. *et al.* A Novel Fibrinolytic Enzyme Extracted from the Earthworm, *Lumbricus rubellus*. **The Japanese Journal Of Physiology**, [s.l.], v. 41, n. 3, p.461-472, 1991.

MOON, S. M. *et al.* Purification and characterization of a novel fibrinolytic  $\alpha$  chymotrypsin like serine metalloprotease from the edible mushroom, *Lyophyllum shimeji*. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, [s.l.], v. 117, n. 5, p. 544-550, maio 2014.

MOZAFFARIAN, D. *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics – 2016 Update. **Circulation**, [s.l.], v. 133, n. 4, p.38-360, 26 jan. 2016.

NASCIMENTO, T. P. *et al.* Production and Characterization of New Fibrinolytic Protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 in Solid-State Fermentation. **Advances In Enzyme Research**, [s.l.], v. 03, n. 03, p.81-91, 2015.

NASCIMENTO, T. P. *et al.* Protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262: evaluation of several specific protease activities and purification

of a fibrinolytic enzyme. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s.l.], v. 92, n. 4, p. 1-12, 2020.

NASCIMENTO, T. P. *et al.* Purification of a fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 by aqueous two-phase systems (PEG/sulfate). **Journal Of Chromatography B**, [s.l.], v. 1025, p.16-24, jul. 2016.

NASCIMENTO, T. P. *et al.* Purification, biochemical, and structural characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Mucor subtilissimus* UCP 1262. **Bioprocess And Biosystems Engineering**, [s.l.], v. 40, n. 8, p.1209-1219, 12 maio 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS). Doenças cardiovasculares. **OPAS Brasil**. Disponível em: [https://www.paho.org/pt/topicos/doencas-cardiovasculares#:~:text=Estima%2Dse%20que%2017%2C9,acidentes%20vasculares%20cerebrais%20\(AVCs\)](https://www.paho.org/pt/topicos/doencas-cardiovasculares#:~:text=Estima%2Dse%20que%2017%2C9,acidentes%20vasculares%20cerebrais%20(AVCs).). Acesso em 03 de fev. de 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS). Organização Mundial da Saúde divulga novas estatísticas mundiais de saúde. **OPAS Brasil**, 2018. Disponível em: [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5676:organizacao-mundial-da-saude-divulga-novas-estatisticas-mundiais-de-saude&Itemid=84](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5676:organizacao-mundial-da-saude-divulga-novas-estatisticas-mundiais-de-saude&Itemid=84) 3. Acesso em 19 de set. de 2019.

PARK, I. S *et al.* Purification and biochemical characterization of a 17 kDa fibrinolytic enzyme from *Schizophyllum commune*. **The Journal Of Microbiology**, [s.l.], v. 48, n. 6, p. 836-841, dez. 2010.

PATEL, G. K.; KAWALE, A. A.; SHARMA, A. K. Purification and physicochemical characterization of a serine protease with fibrinolytic activity from latex of a medicinal herb *Euphorbia hirta*. **Plant Physiology And Biochemistry**, [s.l.], v. 52, p.104-111, mar. 2012.

POLANCZYK, Carisi Anne. Epidemiologia das Doenças Cardiovasculares no Brasil: a verdade escondida nos números. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [S.L.], v. 115, n. 2, p. 161-162, ago. 2020.

SAOTOME, *et al.* Unusual Reversible Oligomerization of Unfolded Dengue Envelope Protein Domain 3 at High Temperatures and Its Abolition by a Point Mutation. **Biochemistry**, [s.l.], v. 55, n. 32, p. 4469-4475, 4 ago. 2016.

SCOTT, J.E.; KP, W. Validating Identity, Mass Purity and Enzymatic Purity of Enzyme Preparations. In: S, Markossian *et al.* [atualizado em 01 out. 2012]. **The Assay Guidance Manual**. Sl: Bethesda (Md): Eli Lilly & Company And The National Center For Advancing Translational Sciences, 2004. p. 1-13. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK91995/>. Acesso em: 13 mar. 2021.

SHIRASAKA, N. *et al.* Purification and characterization of a fibrinolytic protease from *Aspergillus oryzae* KSK-3. **Mycoscience**, [s.l.], v. 53, n. 5, p. 354-364, set. 2012.

SILVA, A. V. *et al.* Partial purification of fibrinolytic and fibrinogenolytic protease from *Gliricidia sepium* seeds by aqueous two-phase system. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, [s.l.], v. 27, p. 101669, ago. 2020.

SILVA, G. M. M. *et al.* Extraction of fibrinolytic proteases from *Streptomyces* sp. DPUA1576 using PEG-phosphate aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**, [s.l.], v. 339, p.52-57, fev. 2013.

SILVA, M. M. *et al.* Effect of acute exposure in swiss mice (*Mus musculus*) to a fibrinolytic protease produced by *Mucor subtilissimus* UCP 1262: An histomorphometric, genotoxic and cytological approach. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, [s.l.], v. 103, p.282-291, abr. 2019.

SINGHAL, D. Drug polymorphism and dosage form design: a practical perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 56, n. 3, p.335-347, 23 fev. 2004.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA (SBC). Cardiômetro, mortes por doenças cardiovasculares no Brasil. **SBC**, 2019. Disponível em: <http://www.cardiometro.com.br/anteriores.asp>. Acesso em 03 de fev. de 2021.

STEVENS, B. *et al.* The Economic Burden of Heart Conditions in Brazil. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [s.l.], p.29-36, 2018. GN1 Genesis Network. Network.

SUN, Z. *et al.* A fibrinolytic protease AfeE from *Streptomyces* sp. CC5, with potent thrombolytic activity in a mouse model. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 85, p. 346-354, abr. 2016.

SURESH, K.; ASHE, J. S.; MATZGER, A. J. Far-Infrared Spectroscopy as a Probe for Polymorph Discrimination. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 108, n. 5, p. 1915-1920, maio 2019.

TANDON, S. *et al.* Therapeutic enzymes: discoveries, production and applications. **Journal Of Drug Delivery Science And Technology**, [s.l.], p. 102455, mar. 2021.

TORRES-ACOSTA, M. A. *et al.* Aqueous Two-Phase Systems at Large Scale: challenges and opportunities. **Biotechnology Journal**, [s.l.], v. 14, n. 1, p. 1800117, 19 jun. 2018.

VASAN, R. S.; BENJAMIN, E. J. The Future of Cardiovascular Epidemiology. **Circulation**, [s.l.], v. 133, n. 25, p.2626-2633, 21 jun. 2016.

WANG, S.; YEH, P. Production of a surfactant- and solvent-stable alkaliphilic protease by bioconversion of shrimp shell wastes fermented by *Bacillus subtilis* TKU007. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 41, n. 7, p.1545-1552, jul. 2006.

WANG, X, *et al.* Crystal Structure of the Catalytic Domain of Human Plasmin Complexed with Streptokinase. **Science**, [s.l.], v. 281, n. 5383, p. 1662-1665, 11 set. 1998.

WANG, X, ZHANG, X.C. 1BML COMPLEX OF THE CATALYTIC DOMAIN OF HUMAN PLASMIN AND STREPTOKINASE. **Protein Data Bank**, 1999. Disponível em: <https://www.rcsb.org/structure/1BML>. Acesso em 25 de mar. de 2021.

WEITZ, J. I. Coagulação sanguínea e fármacos anticoagulantes, fibrinolíticos e antiplaquetários. In: BRUNTON, L. L.; HILAL-DANDAN, R.; KNOLLMAN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 13. ed. Porto Alegre: Amgh, 2019. Cap. 30. p. 723-747.

WEITZ, J. I. Coagulação sanguínea e fármacos anticoagulantes, fibrinolíticos e antiplaquetários. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; C.; KNOLLMAN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: Amgh, 2012. Cap. 30. p. 849-875.

ZHANG, S. *et al.* Purification and Characterization of a Fibrinolytic Enzyme from *Rhizopus microsporus* var. *tuberosus*. **Food Technology And Biotechnology**, [s.l.], v. 53, p. 243-248, 2015.



# CAPÍTULO 2

---

## ESTUDOS *in silico* SOBRE A INTERAÇÃO DE INIBIDORES DE ORIGEM VEGETAL COM O MODELO 6lu7 DA PROTEASE MPRO DO CORONAVÍRUS: UMA MINI REVISÃO

### *IN SILIC STUDIES ON THE INTERACTION OF INHIBITORS OF PLANT ORIGIN WITH THE 6lu7 MODEL OF THE PROTEASE MPRO OF THE CORONA VIRUS: A MINI REVIEW*

Maria Clara do Nascimento<sup>1</sup>

Julyanne Victória dos Santos Ferreira<sup>2</sup>

Anna Carolina Batista e Silva<sup>3</sup>

Juanize Matias da Silva Batista<sup>4</sup>

Thiago Pajeú Nascimento<sup>5</sup>

Ana Lúcia Figueiredo Porto<sup>6</sup>

Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa<sup>7</sup>

DOI: 10.46898/rfb.9786558895893.2

---

1 Universidade Federal Rural de Pernambuco. Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-2700-1065>

2 Universidade Federal Rural de Pernambuco. <http://lattes.cnpq.br/8901230412759036>

3 Universidade Federal Rural de Pernambuco. <https://orcid.org/0000-0003-0574-9339>

4 Universidade Federal Rural de Pernambuco. <https://orcid.org/0000-0001-7654-2533>

5 Universidade Federal do Piauí. Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-3480-6734>

6 Universidade Federal Rural de Pernambuco. Orcid <https://orcid.org/0000-0001-5561-5158>

7 Universidade de Pernambuco. <https://orcid.org/0000-0001-7045-2975>

## RESUMO

A Covid-19 é uma doença causada por um vírus do gênero Betacoronavirus, o SARS-CoV-2, mais conhecido como o novo coronavírus. Ainda não existe nenhum tratamento sólido para a Covid-19, a doença é tratada a partir dos sintomas apresentados pelo indivíduo infectado. São inúmeras as pesquisas que veem sendo realizadas para o desenvolvimento de medicamentos que possam ser usados na prevenção e/ou no tratamento da doença. O objetivo dessa mini revisão é expor algumas das últimas pesquisas científicas realizadas in silico sobre a interação do modelo 6LU7 da MPRO com substâncias de origem vegetal como potenciais inibidores de sua ação. Os estudos analisados demonstram o grande potencial de substâncias vegetais de inibição sobre a principal protease do SARS-CoV-2 com o mínimo uso de materiais físicos e experimentos, demonstrando que o planejamento racional de fármacos pode sim diminuir o tempo de desenvolvimento do produto, no entanto, os estudos in vitro e in vivo continuam sendo essenciais para esse processo e se tornam até mais dinâmicos tendo como base os planejamentos.

**Palavras-chave:** Protease. Estudos in silico. Covid-19.

## ABSTRACT

Covid-19 is a disease caused by a virus of the Betacoronavirus genus, SARS-CoV-2, better known as the new coronavirus. There is still no solid treatment for Covid-19, the disease is treated from the symptoms presented by the infected individual. There are numerous researches being carried out for the development of drugs that can be used in the prevention and/or treatment of the disease. The objective of this mini review is to expose some of the latest scientific research carried out *in silico* on the interaction of the 6LU7 model of MPRO with substances of plant origin as potential inhibitors of its action. The analyzed studies demonstrate the great potential of plant substances to inhibit the main protease of SARS-CoV-2 with the minimum use of physical materials and experiments, demonstrating that the rational planning of drugs can indeed reduce the time of product development, in the However, *in vitro* and *in vivo* studies continue to be essential for this process and become even more dynamic based on planning.

**Keywords:** protease. *in silico* studies. Covid-19.

## 1 INTRODUÇÃO

Desde 2019 o mundo vem enfrentando uma das piores problemáticas já registradas sobre a saúde humana, a pandemia de Covid-19 (DOMINGOS *et al.*, 2020). A doença é causada por um vírus do gênero Betacoronavirus, o SARS-CoV-2, mais conhecido como o novo coronavírus (ASHOUR *et al.*, 2020). Devido ao seu alto índice de transmissão a partir da China logo o vírus se disseminou por todos os continentes da Terra, inclusive no Brasil onde até a primeira quinzena de Abril de 2021 apresentava mais de 13,9 milhões de casos de Covid-19 confirmados (seplag.pe.gov.br).

Ainda não existe nenhum tratamento sólido para a Covid-19, a doença é tratada a partir dos sintomas apresentados pelo indivíduo infectado. São inúmeras as pesquisas que veem sendo realizadas para o desenvolvimento de medicamentos que possam ser usados na prevenção e/ou no tratamento da doença. Entre esses estudos estão aqueles focados na principal protease no ciclo vital do SARS-CoV-2 é a protease, a MPRO.

A MPRO é uma macromolécula constituída por duas subunidades idênticas e caracterizada também por ter três domínios, onde entre os Domínios I e II está localizado o seu sítio catalítico (AMIN *et al.*, 2020; GUO *et al.*, 2020). A ação dessa peptidase é clivar a poliproteína 1a e a poliproteína 1ab presentes no vírus. Quando essas poliproteínas são hidrolisadas são geradas proteínas não estruturais que estão envolvidas na produção de RNA subgenômico que codifica as proteínas estruturais: glicoproteína de pico de superfície, proteína de envelope, proteína de membrana e proteína de nucleocapsídeo (N) (AMIN *et al.*, 2020; GIANTI *et al.*, 2020). Esses processos são essenciais no ciclo de replicação do coronavírus, então, a ação dessa protease e a certeza da ausência de efeitos colaterais pelo fato de que não existem

homólogos conhecidos de MPRO em humanos com especificidade de clivagem idêntica é o que a leva a protease MPRO a se tornar alvo de pesquisas científicas que buscam compostos que sejam capazes de inibir a atividade proteolítica dessa enzima, visando o desenvolvimento de novos fármacos para serem utilizados contra o SARS-CoV-2.

Para que o desenvolvimento de um fármaco seja finalizado com sucesso, as drogas passam por diversos processos que visam desde sua extração até suas caracterizações finais como os testes clínicos. Dentre esses processos está o drug design (desenho de fármacos) que visa acelerar as etapas de estudo graças ao avanço da tecnologia. Na técnica são utilizados programas computacionais que utilizam como base a estrutura da molécula alvo (SBDD – structure based drug design) ou nos seus ligantes conhecidos (LBDD – ligand based drug design) para estudar suas possíveis interações com determinadas substâncias. E um modelo computacional estrutural da protease MPRO que vem sendo utilizado para as pesquisas envolvendo a inibição dessa protease é a 6LU7 (Fig. 1) (GUPTA & KHAN, 2021; JOSHI *et al.*, 2020; PANIKAR *et al.*, 2021).

Por isso, o objetivo dessa mini revisão é expor algumas das últimas pesquisas científicas realizadas *in silico* sobre a interação do modelo 6LU7 da MPRO com substâncias de origem vegetal como potenciais inibidores de sua ação.

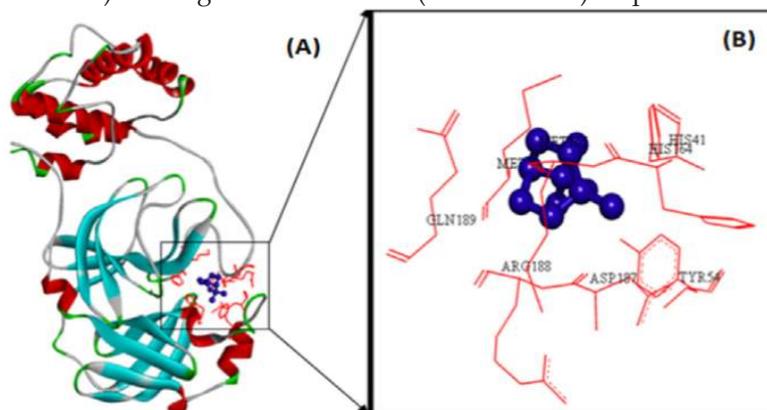
## 2 METODOLOGIA

No banco de dados científicos Science Direct foram pesquisados artigos utilizando os descritores [proteases] and [covid-19 or coronavírus] and [Mpro]. As pesquisas mais recentes que tinham em seu título as palavras protease, MPRO e Covid-19, que fossem feitas através da técnica *in silico* e com substâncias extraídas de plantas.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No início de 2021, PANIKAR e colaboradores avaliaram ação inibitória de biocompostos naturais. No estudo foram utilizados óleos essenciais de dois gêneros da família Myrtaceae, o gênero *Corymbia* sp. e o *Eucalyptus* sp., e através de simulação computacional os possíveis efeitos sobre a MPRO foram avaliados. Os resultados demonstraram que, o composto que mais interagiu e inibiu a atividade da protease foi o Eucaliptol ( $C_{10}H_{18}O$ ) presente em com 52,47% de compostos voláteis em *Eucalypto globulus* e 13,54% em *Corymbia citrodora*, sendo sua constante de inibição de  $50.78\mu M$ . O teste in silico demonstrou que o óleo Eucaliptol realizou interações hidrofóbicas com os aminoácidos MET49, MET165, HIS164, ARG188, PRO52 e HIS41, e forças de Vand der Waals com ASP187, GLN189, TYR54 e PHE181 (Fig. 1) agindo assim no local ativo da protease. O óleo também apresentou uma baixa energia de ligação sem toxicidade ( $-5,86$  kcal/mol). Foi comprovado então que, o óleo essencial Eucaliptol é um potencial inibidor de protease do coronavírus, podendo ser utilizado no tratamento da Covid-19.

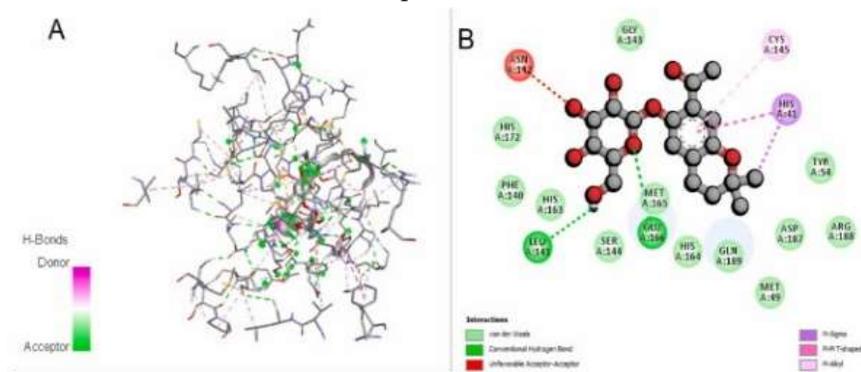
**Figura 1A:** Estrutura da MPRO 6LU7; **Figura 2B:** Interação do inibidor (na cor violeta) com alguns aminoácidos (em vermelho) da protease.



Fonte: Adaptado de PANIKAR et al., 2021[9].

Em Março de 2021 Neupane *et al.* (2021) avaliaram o efeito de compostos fitoquímicos contra a protease MPRO e a enzima conversora de angiotensina humana 2. Trinta e quatro compostos obtidos a partir da planta *Ageratina adenófora* foram acoplados ao modelo da principal protease do coronavírus PDB ID: 6LU7 em ensaio computacional através do software de simulação de modelagem molecular AutoDock, para avaliar as afinidades suas ligações. O composto 5- $\beta$ -glucosil-7-demetoxi-encecalina (5GDE) foi considerado o melhor inibidor de protease MPRO. O 5GDE apresentou uma afinidade de aproximação com o conjunto de moléculas da protease de  $-8,1$  kcal/mol, sendo esse o menor entre todos os fitoquímicos estudados, além disso o 5GDE também apresentou uma similaridade de 100% com o antiviral Remdesivir no padrão de interação com a enzima. Tal composto teve ligações de hidrogênio com os aminoácidos LEU A: 141 e GLU A: 166, e interações de Van der Waals com MET A: 49, TRY A: 54, ARG A: 188, ASP A: 187, GLN A: 189, SER A: 144, MET A: 165, SER A: 144, HIS A: 163, PHE A: 140, HIS A: 17 e GLY A: 143 (Fig. 2).

**Figura 2A:** O complexo fitocomposto 5GDE MPRO. **Figura 2B:** Detalhe a interação de aminoácidos do complexo 5GDE com MPRO em 2D.



Fonte: Neupane *et al.*, 2021

Os autores consideraram que o mecanismo de ação do 5- $\beta$ -glucosil-7-demetoxi-encecalina ocorre através da alta afinidade de ligação do que o inibidor nativo através dos vários tipos de interações.

Além disso 5GDE foi considerado seguros e permitido para estudos posteriores por seguir a Regra de dos Cinco de Lipinski onde é estabelecido que uma molécula para ser um bom fármaco deve apresentar valores para 4 parâmetros múltiplos de 5: log P maior ou igual a 5, massa molecular menor ou igual a 500, aceptores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 10 e doadores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 5, sendo ele então um candidato promissor ao desenvolvimento de drogas contra o receptor MPRO.

## 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos citados demonstram o grande potencial de substâncias vegetais de inibição sobre a principal protease do SARS-CoV-2 com o mínimo uso de materiais físicos e experimentos, demonstrando que o planejamento racional de fármacos pode sim diminuir o tempo de desenvolvimento do produto, no entanto, os estudos in vitro e in vivo continuam sendo essenciais para esse processo e se tornam até mais dinâmicos tendo como base os planejamentos.

## REFERÊNCIAS

AMIN, S. A., BANERJEE, S., GHOSH, K., GAYEN, S., JHA, T. Protease targeted COVID-19 drug discovery and its challenges: Insight into viral main protease (Mpro) and papain-like protease (PLpro) inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, p. 115860, 2020.

ASHOUR, H. M., ELKHATIB, W. F., RAHMAN, M. M., EL-SHABRAWY, H. A. Insights into the recent 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) in light of past human coronavirus outbreaks. **Pathogens**, v. 9, n. 3, p. 186, 2020.

DOMINGO, J. L., MARQUÈS, M., ROVIRA, J. Influence of airborne transmission of SARS-CoV-2 on COVID-19 pandemic. A review. **Environmental research**, p. 109861, 2020.

GIANTI, E., ZAUHAR, R. J. Structure-activity relationships and drug design. In: ADEJARE, A. Remington: **The Science and Practice of Pharmacy**. 23 ed. EUA: Academic Press, 2020. cap 7, 129-153.

GUO, Sheng et al. Discovery of novel inhibitors against main protease (Mpro) of SARS-CoV-2 via virtual screening and biochemical evaluation. **Bioorganic chemistry**, v. 110, p. 104767, 2021.

GUPTA, D., KHAN, A. U. Advances in Docking-Based Drug Design for Microbial and Cancer Drug Targets. In: COUMAR, M. S. **Molecular Docking for Computer-Aided Drug Design: Fundamentals, Techniques, Resources and Applications**. Academic Press, 2021. Cap 19, 407-424.

JOSHI, T., SHARMA, P., JOSHI, T., PUNDIR, H., MATHPAL, S., CHANDRA, S. Structure-based screening of novel lichen compounds against SARS Coronavirus main protease (Mpro) as potentials inhibitors of COVID-19. **Molecular diversity**, p. 1-13, 2020.

NEUPANE, Netra Prasad et al. Molecular dynamics analysis of phytochemicals from *Ageratina adenophora* against COVID-19 main protease (Mpro) and human angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 32, p. 101924, 2021.

PANIKAR, Sukanya et al. Essential oils as an effective alternative for the treatment of COVID-19: Molecular interaction analysis of protease (Mpro) with pharmacokinetics and toxicological properties. **Journal of Infection and Public Health**, 2021.

PERNAMBUCO. COVID-19 em Dados. Disponível em: <https://dados.seplag.pe.gov.br/apps/corona.html>. Acesso em 20 abr. 2020.



# CAPÍTULO 3

## POTENCIAL DE APLICABILIDADE BIOMÉDICA DO ASPERGILLUS INSUETUS

### *POTENTIAL BIOMEDICAL APPLICABILITY OF ASPERGILLUS INSUETUS*

COSTA, Pedro Sá de Oliveira<sup>1</sup>  
SILVA, Luan Nilton da<sup>2</sup>  
NASCIMENTO, Thiago Pajeú<sup>3</sup>  
MARQUES, Daniela de Araújo Viana<sup>4</sup>  
WANDERLEY, Marcela Silvestre Outtes<sup>5</sup>  
COSTA, Romero Marcos Pedrosa Brandão<sup>6</sup>

DOI: 10.46898/rfb.9786558895893.3

1 Universidade de Pernambuco. Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-5566-0573>.

2 Universidade de Pernambuco. Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-1406-5580>.

3 Universidade Federal do Piauí. <https://orcid.org/0000-0003-3480-6734>.

4 Universidade de Pernambuco. Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-2380-7910>.

5 Universidade de Pernambuco. Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-4236-5820>.

6 Universidade de Pernambuco. Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-7045-2975>.

## RESUMO

O *Aspergillus insuetus* é um fungo filamentosso pouco conhecido e pesquisado. Este capítulo teve como objetivo fazer um levantamento bibliográfico dos potenciais de aplicação biomédica do *A. insuetus*. Neste sentido, foram utilizados apenas trabalhos publicados nas bases de dados PubMed e SciELO entre os anos de 2007 e 2020 e sem restrição de idioma. Aqueles que apresentavam técnicas de engenharia mais aplicada para cultivo ou que não detalharam características físico-químicas do fungo, imprescindíveis para sua cultura e análise laboratorial, foram excluídos. Após análise dos títulos e resumos, foram encontrados 6 artigos e, usados os critérios, chegou-se aos 3 que ressaltavam a obtenção de compostos aplicáveis nas áreas da infectologia, oncologia, neurologia e angiologia. Dentre os componentes citados, destacam-se: TMC-120A e TMC-120B (alcalóides de isoquinolina com capacidade antiespasmódica e potencial de uso neurológico) e a Ophiobolin K (um terpeno que age como anticoagulante e tem potencial de uso contra complicações do novo COVID-19, como coagulação intravascular disseminada, embolia pulmonar e coágulos arteriais). Como exposto, embora poucos trabalhos tenham se voltado para ele, até o presente momento, o *A. insuetus* demonstra um amplo potencial de aplicação e uso no que se refere à obtenção de fármacos e tratamento de doenças, carecendo, pois, de mais estudos para uma melhor aplicação.

**Palavras-chave:** *Aspergillus insuetus*. Interesse biomédico. Metabólitos bioativos.

## ABSTRACT

*Aspergillus insuetus* is a little known and researched filamentous fungus. This integrative review, then, aims to gather the main information, published in the PubMed and SciELO databases, and make an analysis of the potential and applicability of the biomedical use that *A. insuetus* has to offer. In this sense, only works published between 2007 and 2020 and without language restriction were used. Those who presented engineering techniques more applied for cultivation or who did not explore the physical-chemical characteristics of the fungus, which are essential for their culture and laboratory analysis, were excluded. After analyzing the titles and abstracts, 6 articles were found and, using the criteria, we reached 3 that highlighted the availability of the applicable criteria in the areas of infectious diseases, oncology, neurology and angiology. Among the components mentioned, the following stand out: TMC-120A and TMC-120B (isoquinoline alkaloids with antispasmodic capacity and potential for neurological use) and Ophiobolin K (a terpene that acts as an anticoagulant and has potential use against complications of the new COVID-19, such as disseminated intravascular coagulation, pulmonary embolism and arterial clots). As explained, although few studies have turned to it, until now, *A. insuetus* demonstrates a wide potential for application and use with regard to obtaining drugs and treating diseases, thus requiring further studies to better management.

**Keywords:** *Aspergillus insuetus*. Biomedical interest. Bioactive metabolites.

## 1 INTRODUÇÃO

Este capítulo se originou da necessidade em conhecer e compreender a aplicabilidade de determinados fungos na área da saúde, em especial, os possíveis usos do *Aspergillus insuetus*, fungo pouco conhecido e pouco utilizado em ambiente extra-laboratorial. Desse ponto, considerando sua baixa notoriedade e o amplo espectro de atuação que os fungos possuem, a hipótese de possível obtenção de compostos bioativos a partir do *A. insuetus* foi levantada e deu início a este trabalho. Nesse sentido, os principais objetivos traçados para o trabalho foram: 1) Realizar uma revisão da literatura acerca do *A. insuetus* elaborada entre os anos de 2007 e 2020; 2) Listar os principais compostos com potencial de aplicabilidade biomédica produzidos pelo fungo; e 3) Analisar o uso potencial dos produtos obtidos, a partir do cultivo e manejo do *A. insuetus* em laboratório, para o tratamento de doenças e possível elaboração de novas estratégias terapêuticas.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Gênero *Aspergillus*

Entre os componentes do filo *Ascomycota*, o gênero *Aspergillus* compreende mais de 330 espécies, representando alguns dos fungos mais comuns no ambiente (SAMSON et al., 2014).

Na verdade, *Aspergilli* são onipresentes e cosmopolitas que impactam profundamente em variados ecossistemas, bem como na saúde humana, animal e vegetal, tendo assim grande relevância econômica. As espécies do gênero estão entre os fungos capazes de causar desde efeitos prejudiciais como doenças em organismos

superiores (alergias e asma em humanos) até produzir produtos primários benéficos e metabólitos secundários (INGLIS et al., 2013).

### 2.1.1 Taxonomia

A caracterização fenotípica, assim como o sequenciamento da região ITS do DNA, dividiu o gênero *Aspergillus* em um total de 9 seções, sendo elas: *Circumdati*, *Clavati*, *Flavi*, *Flavipedes*, *Fumigati*, *Nidulantes*, *Nigri*, *Terrei* e *Usti*. Quanto à última, 9 espécies são conhecidas atualmente. A maioria delas é incapaz de crescer a temperaturas iguais ou superiores a 37 °C, sendo “não termotolerantes”, e, portanto, não são consideradas patógenos humanos. Em verdade, casos de infecções humanas que foram atribuídos a determinadas espécies desse grupo, como a *A. ustus*, na literatura, foram secundariamente reatribuídos a outras, como a *A. calidoustus*, que são capazes de crescer a 37 °C. Outras espécies não termotolerantes da seção *Usti* foram classificadas como colonizadoras ou contaminantes de amostras clínicas. Dentre elas, encontram-se: *A. puniceus*, *A. keveii* e *A. insuetus*. (GLAMPEDAKIS, E. et al., 2020).

### 2.1.2 Aspectos Morfológicos

A maioria das espécies da seção *Usti* crescem a 25–30 °C, sendo a temperatura mais alta 37 °C. Isso permite a distinção de espécies termotolerantes, *A. calidoustus* por exemplo, das consideradas não patogênicas, como é o caso da *A. insuetus*. Quanto ao cultivo, colônias, em geral, são aparentes entre 2 e 5 dias de crescimento. Aspectos macroscópicos em meio de cultura de fungos padrão (ágar de extrato de levedura Czapek, ágar Sabouraud ou ágar batata dextrose) revelam colônias aveludadas de cinza a marrom canela. Além disso, a tonalidade amarelada com presença de pigmento solúvel amarelo-marrom é típica, mas pode estar ausente para algumas espécies

de acordo com o meio de cultura selecionado. Sob o microscópio, conídios, de aparência tipicamente áspera, são geralmente curtos e fracamente colunares com fiáldes bisseriadas. Algumas características específicas (células de Hülle, reação de Ehrlich, crescimento com creatina, produção de *pergillin* - um metabólito fúngico não tóxico com propriedades moderadas de inibição do crescimento vegetativo) auxiliam na distinção entre as diferentes espécies, mas esses métodos requerem abordagens mais específicas (GLAMPEDAKIS, E. *et al.*, 2020).

### **2.1.3 Aplicação Biotecnológica do Gênero *Aspergillus***

Metabólitos primários e secundários (do inglês Secondary Metabolites, SMs) são moléculas heterogêneas que funcionam em atividades fisiológicas basais, como: crescimento, desenvolvimento, sobrevivência e aptidão dos organismos produtores (TURGEON & BUSHLEY, 2010; BRAKHAGE, 2013).

Entre os diferentes organismos que produzem uma ampla gama de produtos naturais, os fungos são considerados um grupo com capacidades extraordinárias para produzir classes estruturalmente diferentes de SMs. Mais certamente, ao longo da evolução, eles adquiriram a habilidade para produzi-los devido ao meio competitivo no qual se encontravam. Ou seja, muitos dos SMs gerados possuem características danosas a outros organismos, pois sua intenção inicial seria a de combatê-los. No entanto, além de produtos lesivos, foi notado, cada vez mais, o potencial benéfico do uso de alguns produtos gerados pelos componentes desse reino (ROHLFS & CHURCHILL, 2011; BRAKHAGE, 2013).

O gênero *Aspergillus* é um dos que apresenta grande potencial para produzir SMs, como: policetídeos, peptídeos não ribossomais, terpenos e alcalóides (SOLTANI, J., 2016).

## **2.2 *Aspergillus insuetus***

A espécie foi descrita pela primeira vez em 1929 por (Brainier) Thom & Church. e revisitada por HOUBRAKEN no ano de 2007. Fenotipicamente, o *A. insuetus* é um fungo filamentoso, incapaz de crescer em temperaturas superiores a 37°C, fator que diminui seu potencial patológico em seres humanos. Esse fungo cresce bem em meio de cultura com extrato de levedura e sacarose a 25°C, apresentando um micélio hialino e conídios acinzentados. Além disso, dois critérios de diferenciação com relação ao *A. insuetus*: apresentam colônias com 23-30 mm e resposta positiva (coloração violeta) à reação de Ehrlich. (HOUBRAKEN et al., 2007)

### **2.2.1 Potencial de aplicação do *Aspergillus insuetus***

#### **2.2.1.1 Atuação no controle de convulsões e inflamações**

Em ensaios, analisando a resposta fotomotora com embriões de peixe-zebra, foi demonstrado que o TMC-120A e TMC-120B possuem a capacidade de atuar como fatores anti-convulsivantes, sendo esses compostos possíveis estratégias para o tratamento de doenças neuromotoras como a epilepsia no futuro. Além disso, outro fato curioso, demonstrado no mesmo estudo, foi que ambos, também apresentavam, *in vitro*, atividade moduladora do processo inflamatório (COPMANS D. et al., 2019).

### 2.2.1.2 Potencial de combate a tipos cancerígenos e fúngicos

Além desses, outro composto produzido pelo *A. insuetus* tem demonstrado relevância terapêutica é a Ofiobolinas K. Uma fitotoxina que demonstrou, em estudo, aptidão para combater células de neuroblastoma e, também, atividade anticoagulante (SLACK, G. J. et al., 2009). Ainda sobre a atividade anticancerígena, dois compostos, o Insuetolídeo C e a (E)-6-(40-hydroxy-20-butenoyl)-strobilactone A, apresentaram certa citotoxicidade contra células da leucemia humana. No mesmo estudo, também, foram apresentados outros produtos, como o Insuetolídeo A, a Strobilactone A e a (E,E)-6-(60,70-dihydroxy-20,-40-octadienoyl)-strobilactone A, que apresentam propriedades antifúngicas (COHEN, E. et al, 2011).

## 3 METODOLOGIA

Trata-se de um estudo do tipo revisão integrativa da literatura, as etapas seguidas para elaborar essa revisão foram: formulação do problema de pesquisa, levantamento de dados, análise e interpretação, apresentação dos resultados e conclusão (WHITTEMORE e KNAFL, 2005). A coleta de dados foi realizada por meio das bases de dados PubMed (*U.S National Library of Medicine*) e SciELO (*Scientific Electronic Library Online*). A estratégia de busca utilizada para pesquisar nas bases de dados se deu pela utilização dos descritores "*Aspergillus insuetus*" e "*Compounds*" associados pelo operador Booleano "AND". Foram incluídos artigos a respeito da utilização do *Aspergillus inuetus* na produção de substâncias de interesse biomédico publicados entre os anos de 2007 e 2020. Artigos que continham técnicas de engenharia genética mais aplicada para cultivo e extração dos compostos do fungo foram excluídos. Na base de dados PubMed foram encontrados

14 artigos. Após a leitura dos títulos e dos resumos para seleção dos que estavam condizentes com o objetivo da pesquisa, obteve-se um total de 6 artigos. Em seguida, esses artigos foram lidos na íntegra, sendo selecionados 3 deles. Na base de dados SciELO, não foram encontrados artigos que se enquadrassem nos critérios da pesquisa.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Embora já se tenha conhecimento na literatura do *A. insuetus*, até o presente momento não foram descritas nenhuma aplicação biotecnológica, dessa forma o mesmo pode ser alvo de estudo principalmente na produção de metabólitos com aplicação biomédica.

Dentre os compostos produzidos pelo *A. insuetus*, destaca-se a Ofiobolina K, o qual possui aplicação anticoagulante a partir da inibição do Fator Xa da cascata de coagulação (essencial para a formação do coágulo de fibrina e plaquetas). Nesse sentido, considerando as manifestações clínicas de pacientes com COVID-19 e que o novo coronavírus ativa o processo inflamatório e trombótico, e a infecção por ele causada está relacionada a aumento de citocinas inflamatórias (tempestade de citocinas) e distúrbios da coagulação, com predisposição a formação de trombos, o uso da Ofiobolina K pode ser uma alternativa já que apresenta o potencial para inibir etapas finais do estado de hipercoagulação gerado pela infecção viral e, assim, evitar quadros mais graves e complicados da doença. (NASCIMENTO, J. H. P. et al, 2020).

Para além deste composto, os outros em destaque são a TMC-120A e TMC-120B, os quais possuem atividade antiespasmódica e podem ser utilizados como foco de estudo para o tratamento de doenças neuromotoras como a epilepsia. Essa condição clínica, segundo a World Health Organization (WHO), é uma das doenças

não transmissíveis, do cérebro, mais comuns e chega a afetar aproximadamente 50 milhões de pessoas no mundo. Além disso, cerca de 80% dos acometidos por essa doença vivem em países de baixa e média renda e 70% das pessoas que vivem com epilepsia poderiam viver livres de episódios epiléticos se fossem propriamente diagnosticadas e tratadas. Desse ponto, é evidente a urgência na busca por tratamentos rápidos e acessíveis para essa patologia e as TMC-120A e TMC-120B produzidas pelo *A. insuetus* podem, no futuro, se revelar como fontes para a elaboração de fármacos e estratégias terapêuticas para a cura ou amenização dos sintomas de doenças como a epilepsia (WHO, 2019)

Outros dois compostos de destaque são o Insuetolídeo C e a (E)-6-(40-hydroxy-20-butenoyl)-strobilactone A, os quais demonstraram capacidade citotóxica contra células MOLT-4. Esse tipo celular compõe a linhagem linfóide das células sanguíneas e está intimamente relacionado ao surgimento da Leucemia Linfóide Aguda (LLA), uma neoplasia que pode acometer pessoas de todas as faixas etárias, sendo mais recorrente em crianças até 5 anos e mais letal em adultos. Desse ponto, considerando que os dois produtos, obtidos a partir do *A. insuetus*, mencionados acima, é possível, por meio de estudos mais aprofundados, formular novas formas de combate a essa neoplasia e, assim, alavancar a promoção de saúde. (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2021)

Por fim, os últimos compostos, Insuetolídeo A, a Strobilactone A e a (E,E)-6-(60,70-dihydroxy-20,40-octadienoyl)-strobilactone A, ganham seu destaque por apresentarem atividade antifúngica contra o *Neurospora crassa*. Esse é um fungo filamentosos pertencente ao grupo dos ascomicetos que não apresenta demasiada relevância clínica, mas é bastante utilizado em laboratório. Quanto aos produtos do *A. insuetus* contra o *N. crassa*, seus usos futuros podem se voltar

mais para um maior entendimento da estrutura de fungos do filo *Ascomycota* e criação de novas estratégias de combate contra eles, mas, para isso, ainda vão ser necessárias mais pesquisas para aprofundar essa possibilidade. (COHEN, E. et al, 2011)

Cada composto apresentado pelo *A. insuetus* demonstrou um potencial biomédico para uso futuro. Destacando-se aqui, em especial, as propriedades: anticoagulante, antiespasmódica, citotoxicidade antineoplásica e antifúngica. Desse ponto, algumas das áreas de possível aplicação dos produtos desse fungo são: angiologia, neurologia, oncologia e infectologia.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Portanto o *A. insuetus* exibe um potencial significativo para uso futuro na área biomédica, destacando-se em especial, as propriedades: anticoagulante, antiespasmódica, citotoxicidade antineoplásica e antifúngica. Ainda assim, mais estudos são necessários para que esses usos possam se consolidar e novas estratégias terapêuticas sejam fundamentadas baseando-se nos materiais obtidos a partir desse fungo.

## REFERÊNCIAS

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Key Statistics for Acute Lymphocytic Leukemia (ALL)**. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/acute-lymphocytic-leukemia/about/key-statistics.html>. Acesso em: 8 abr. 2021.

COHEN, E., KOCH, L., THU, K. M., RAHAMIM, Y., ALUMA, Y., ILAN, M., CARMELI, S. (2011). Novel terpenoids of the fungus *Aspergillus insuetus* isolated from the Mediterranean sponge *Psammocinia* sp. collected along the coast of Israel. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 19(22), 6587-6593.

COPMANS D., KILDGAARD S., RASMUSSEN S.A., et al. Zebrafish-Based Discovery of Antiseizure Compounds from the North Sea: Isoquinoline Alkaloids TMC-120A and TMC-120B. **Mar Drugs**. 2019.

FUKUDA, T., KURIHARA, Y., KAMAMOTO, A. *et al.* Terretonin G, a new sesterterpenoid antibiotic from marine-derived *Aspergillus* sp. OPMF00272. **J Antibiot** 67, 593–595 (2014).

GLAMPEDAKIS E., ERARD, V., LAMOTH, F. Clinical Relevance and Characteristics of *Aspergillus calidoustus* and Other *Aspergillus* Species of Section Usti. **J Fungi** (Basel). 2020 Jun 12.

HOUBRAKEN J., DUE M., VARGA J., MEIJER M., FRISVAD J.C., SAMSON R.A. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section Usti. **Stud Mycol**. 2007.

INGLIS, D.O., BINKLEY, J., SKKRZYPEK, M.S. *et al.* Comprehensive annotation of secondary metabolite biosynthetic genes and gene clusters of *Aspergillus nidulans*, *A. fumigatus*, *A. niger* and *A. oryzae*. **BMC Microbiol** 13, 91 (2013).

LÓPEZ-GRESA M.P., CABEDO N., GONZÁLEZ-MAS M.C., CIAVATTA M.L., AVILA C., PRIMO J. Terretonins E and F, inhibitors of the mitochondrial respiratory chain from the marine-derived fungus *Aspergillus insuetus* (#). **J Nat Prod**. 2009 Jul.

NASCIMENTO, J. H. P. et al . COVID-19 e Estado de Hipercoagulabilidade: Uma Nova Perspectiva Terapêutica. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo , v. 114, n. 5, p. 829-833, May 2020 .

ROHLFS, M., C.L. CHURCHILL, A., Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods, **Fungal Genetics and Biology**, Volume 48, Issue 1, 2011, Pages 23-34.

SAMSON, R. A., VARGA, J., MEIJER, M., & Frisvad, J. C. (2011). New taxa in *Aspergillus* section Usti. **Studies in Mycology**, 69, 81–97.

SAMSON, R.A., VISAGIE, C.M., HOUBRAKEN, J., HONG, S.-B., HUBKA, V., KLAASSEN, C.H.W., PERRONE, G., SEIFERT, K.A., SUSCA, A., TANNEY, J.B., VARGA, J., KOCSUBÉ, S., SZIGETI, G., YAGUCHI, T., FRISVAD, J.C. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*, **Studies in Mycology**, Volume 78, 2014.

SLACK, G. J., PUNIANI, E., FRISVAD, J. C., SAMSON, R. A., & MILLER, J. D. (2009). Secondary metabolites from *Eurotium* species, *Aspergillus calidoustus* and *A. insuetus* common in Canadian homes with a review of their chemistry and biological activities. **Mycological Research**, 113(4), 480–490.

SOLTANI, J. (2016). Secondary Metabolite Diversity of the Genus *Aspergillus*: Recent Advances. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**, 275–292.

SOUZA, M. T.; SILVA, M. D.; CARVALHO, R. Revisão integrativa: o que é e como fazer. **Einstein**. São Paulo, v. 8, n. 1, p. 102-106, mar. 2010.

TURGEON, B. G., & BUSHLEY, K. E. (n.d.). Secondary Metabolism. **Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi**, 376–395.

WHITTEMORE, R. KNAFL, K. The integrative review: updated methodology. **J Adv Nurs**. Nova Jersey, v. 52, n. 5, p. 546-553, dez. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Epilepsy. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>. Acesso em: 8 abr. 2021.





## RESUMO

Os distúrbios do sono estão cada vez mais frequentes na vida da população devido a diversos fatores do cotidiano. Além disso, principalmente, muitos idosos apresentam problemas relacionados ao sono devido às mudanças fisiológicas envolvidas no processo de envelhecimento que, associadas a outros fatores como o sedentarismo, ansiedade e depressão, podem trazer sérias consequências que influenciam no bem-estar desses indivíduos e diminuem as chances de se ter uma boa qualidade de sono. Assim, uma revisão narrativa de literatura foi realizada buscando transcorrer sobre a atuação do farmacêutico nos distúrbios do sono em idosos, através das plataformas Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), Scielo, Scopus, Science direct, LILACS, PUBMED e Google Acadêmico, utilizando como descritores: “Distúrbios do sono”, “uso irracional de medicamentos”, “benzodiazepínicos” e “idosos”. A inclusão dos artigos compreendeu o período de 2015 até 2022, com a finalidade de responder a pergunta norteadora: “Qual o papel do farmacêutico nos distúrbios do sono em idosos?” mediante a adoção de critérios de inclusão e exclusão nas bases de dados, resultando em 9 artigos. A maioria dos problemas relacionados ao sono é clinicamente importante e pode ser farmacologicamente tratado, principalmente, pelo uso dos medicamentos benzodiazepínicos sedativos hipnóticos. Contudo, percebe-se que, mesmo com o fácil acesso à informação, as pessoas ainda não têm o conhecimento necessário sobre as problemáticas que o uso irracional dessas drogas podem acarretar ao organismo. Dessa forma, observou-se que a atuação do farmacêutico é imprescindível para o manejo e o uso devido dos medicamentos benzodiazepínicos para tratamento dos problemas no sono e, também, exerce um papel especial ao informar sobre o uso correto de medicamentos e seus principais efeitos na condição e promoção de saúde dos idosos.

**Palavras-chave:** Insônia. Sedativos hipnóticos. Polifarmácia.

## ABSTRACT

Sleep disorders are increasingly common in the lives of the population due to several factors of daily life. In addition, mainly, many elderly people have problems related to sleep due to the physiological changes involved in the aging process, which, associated with other factors such as a sedentary lifestyle, anxiety and depression, can have serious consequences that influence the well-being of these individuals and reduce the chances of having a good quality of sleep. Thus, a narrative review of the literature was carried out, seeking to discuss the role of the pharmacist in sleep disorders in the elderly, through the Virtual Health Library (VHL), Scielo, Scopus, Science direct, LILACS, PUBMED and Google Scholar platforms, using as descriptors: "Sleep disorders", "irrational use of medication", "benzodiazepines" and "elderly". The inclusion of articles covered the period from 2015 to 2022, with the purpose of answering the guiding question: "What is the role of the pharmacist in sleep disorders in the elderly?" through the adoption of inclusion and exclusion criteria in the databases, resulting in 9 articles. Most sleep-related problems are clinically important and can be pharmacologically treated, mainly through the use of hypnotic sedative benzodiazepines. However, it is noticed that, even with easy access to information, people still do not have the necessary knowledge about the problems that the irrational use of these drugs can cause to the body. Thus, it was observed that the role of the pharmacist is essential for the management and proper use of benzodiazepine drugs for the treatment of sleep problems, and also plays a special role in informing about the correct use of drugs and their main effects on condition and health promotion of the elderly.

**Keywords:** Insomnia. Hypnotic sedatives. Polypharmacy.

## 1 INTRODUÇÃO

Considerado uma fase de reparação do corpo e da mente, o sono representa uma fundamental função biológica, tornando-se essencial para a qualidade de vida e regulação da saúde (FABBRI *et al.*, 2021). Além disso, é durante o sono que o organismo fortalece o sistema imunológico, libera a secreção de hormônios, consolida a memória, faz a restauração dos tecidos, do crescimento muscular e realiza a síntese de proteínas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016; TEIXEIRA *et al.*, 2020).

As mudanças na duração do sono são maiores durante a fase infantil, nos seis primeiros meses de vida, após isso, o tempo de sono da criança diminui gradualmente e isso se estende até os seus cinco anos de idade. Com o avanço do tempo, na adolescência e vida adulta, decresce a quantidade em horas de sono e varia o seu ciclo em função dos anos de vida e de fatores externos ocorrendo perdas na duração, manutenção e qualidade do sono (TEIXEIRA *et al.*, 2020; SANTANA *et al.*, 2021). A dor, o uso de medicações, o sedentarismo e diferentes condições clínicas são exemplos de fatores que podem afetar a quantidade e a qualidade do sono, especialmente entre idosos, que são mais propensos a essas condições (MORENO *et al.*, 2019; DELGADO, 2020).

Indivíduos da terceira idade são, de forma geral, mais vulneráveis para a maioria das doenças e apresentam diminuição na qualidade de vida. Os idosos passam a ter vidas menos ativas, mais sedentárias e improdutivas, o que as tornam mais suscetíveis a problemas como ansiedade, depressão, obesidade e conseqüentemente distúrbios do sono (DS), que são prejudiciais não apenas por si só, podendo perturbar o estado de bom funcionamento do corpo e

influenciam no prognóstico de outras patologias (SCHMEER *et al.*, 2019).

As queixas relacionadas ao sono são muito prevalentes na prática clínica. A maioria dos pacientes procura atendimento médico por dificuldade em iniciar o sono, dificuldade em manter o sono, com múltiplos despertares durante a noite, despertar cedo, sono não restaurativo, movimentos e comportamento anormais durante a noite, fadiga ou sonolência diurna, dificuldade de concentração, irritabilidade, ansiedade, depressão, dores musculares dentre outras sintomatologias relacionada a uma má noite dormida (DE SOUZA *et al.*, 2021).

Os DS são frequentes em todas as faixas etárias, principalmente na velhice, os principais DS são: a insônia, a apneia obstrutiva do sono, o ronco, a incapacidade de dormir no momento desejado, as síndromes das pernas inquietas, além dos eventos anormais durante o sono. Assim, a procura por automedicação se amplia, sendo os medicamentos Benzodiazepínicos (BDZs) o mais procurados para tratar esses transtornos, logo, torna-se comum o seu uso entre a população mais velha devido a esses medicamentos possuírem indução ao sono (FABBRI *et al.*, 2021; SENRA *et al.*, 2021).

Mesmo apresentando relativa segurança, os BDZs, assim como todo medicamento, apresenta efeitos colaterais, como sonolência, perda de memória, diminuição da atividade psicomotora, entre outros que são mais comuns em doses normais de uso, sendo necessária uma atenção maior com o uso de BDZs em idosos, pois estes estão mais susceptíveis aos efeitos colaterais devidos as suas alterações fisiológicas (CONSTANTE, 2019; SENRA *et al.*, 2021).

Devido esses efeitos mais preocupantes que são provocados por uso indevido desses medicamentos, os BDZs merecem uma atenção especial de profissionais da saúde, principalmente por parte de

médicos que os prescrevem e pelos farmacêuticos que os dispensam, que devem orientar e alertar quanto aos efeitos colaterais e danosos que esses medicamentos podem causar quando usados de maneira incorreta, promovendo o uso racional de medicamentos (DA COSTA *et al.*, 2020). É importante salientar que o profissional farmacêutico e as drogarias fazem parte da primeira linha de acesso aos cuidados com a saúde da população (CFF, 2016; CFF, 2020).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Fisiologia do Sono

Com os estudos de sono em mamíferos, baseado em aspectos funcionais e comportamentais deste fenômeno, é denominado como um estado funcional, reversível e cíclico, possuindo algumas manifestações comportamentais características, ocorrendo variações dos parâmetros biológicos, acompanhados por uma modificação da atividade mental, que correspondem ao comportamento de dormir (GUYTON, 2017; SOUZA *et al.*, 2018).

Durante o sono, o indivíduo mantém-se de olhos fechados ou entreabertos e não mostra interação produtiva com o ambiente. Nestes termos, o sono pode ser visto como um estado similar ao coma, especialmente nos casos de coma de menor profundidade, em que não há comprometimento das funções cardio-respiratórias. Logo, o grande diferencial entre tais estados, à simples observação do ser que dorme, é a característica de reversão espontânea e mais ou menos programada ao longo do tempo do estado de sono para a vigília, o que não é o caso do coma (HADDAD; GREGÓRIO, 2017; BEZERRA *et al.*, 2018).

Na retina existe um circuito neural, que percebe a luz, diferente daquele que participa da visão. Este circuito modula a produção e

liberação de melatonina pela glândula pineal. A luz solar modula a produção de melatonina na glândula pineal, a melatonina, por sua vez, regula a atividade do núcleo supraquiasmático (NSQ) e, portanto, o ciclo de vigília e sono. Essa produção fisiológica de melatonina aumenta progressivamente algumas horas antes de dormir e atinge seu máximo cinco horas depois (ANVISA, 2021).

A melatonina é um hormônio produzido naturalmente pelo organismo, principalmente pela glândula pineal, localizada no centro do cérebro. Dentre as suas principais funções estão o controle do ciclo circadiano e a regulação do sono. No período noturno, com a ausência de luminosidade, ocorre a secreção de melatonina. Já com a presença de luz, essa liberação é interrompida e o cérebro inicia a produção de cortisol, hormônio que nos mantém em estado de alerta. Esse processo caracteriza o chamado ciclo circadiano (TORDIMAN; CHOKRON *et al.*, 2017).

O ciclo sono-vigília é um ritmo circadiano, isto é, em condições naturais este ritmo apresenta sincronização com fatores ambientais e oscila com um período de 24 horas. A alternância do dia-noite (claro-escuro), os horários escolares, os horários de trabalho, horários de lazer, as atividades familiares, todos são fatores exógenos que sincronizam o ciclo sono-vigília. Além dessa sincronização ambiental, o ciclo sono-vigília é gerado e regulado endogenamente por uma estrutura neural localizada no hipotálamo que é o NSQ, considerado o relógio biológico para os mamíferos (GUYTON, 2017; AGUIAR *et al.*, 2021).

Assim, o sono é considerado um estado fisiológico, caracterizado no ser humano por alternância de estágios, que se diferenciam de acordo com o padrão do eletroencefalograma (EEG) e a presença ou ausência de movimentos oculares rápidos (AGUIAR *et al.*, 2021; DANTAS, 2022).

## 2.2 Estágios do Sono

Basicamente podemos dividir o sono em duas fases: REM (Rapid Eye Movement, ou movimento rápido dos olhos) e NREM (Non-rapid eye movement, ou Movimento Não Rápido dos Olhos) (IRWIN; OPP, 2017).

O estágio do NREM corresponde a 75% do período do sono, sendo dividido em quatro estágios e são denominados de: estágios 1, 2, 3 e 4 do sono e, aparecem espontaneamente sob orientação de algum mecanismo regulatório, do sistema nervoso central (SNC), além de mudanças em diversas outras variáveis fisiológicas, como o tono muscular e o padrão cardiorrespiratório (VITÓRIO, 2017; SOUZA *et al.*, 2018). Sendo assim, o sono é dividido em várias fases, sendo que cada uma delas apresenta um estágio fisiológico específico. Os cinco estágios do sono formam o ciclo, durando cerca de 90 a 120 minutos cada um. Desta forma, um ciclo do sono é repetido de quatro a cinco vezes por noite durante uma noite de sono bem dormida (DANTAS, 2022).

Não se vai direto, porém, do sono profundo para o sono REM. Em vez disso, um ciclo do sono progride através dos estágios do sono não REM, do sono leve para o profundo, e depois volta para o sono leve, terminando com o tempo no sono REM antes de começar novamente no sono leve. Na tabela 1 é possível observar as características principais e a duração das etapas do sono.

**Tabela 1 - Características principais dos estágios do sono.**

	Estágios do Sono	Características	Duração
Acordado	Estágio 0	Estágio de vigília.	16-18h por dia
Sono NREM	Estágio 1	Considerado como sono leve. É o mais superficial dos estágios. É a fase de sonolência, onde o indivíduo começa a sentir as primeiras sensações do sono. Nessa fase a pessoa dorme, mas pode ser despertada com facilidade.	Dura em média de 4-7h por noite
	Estágio 2	Considerado como sono leve. Os movimentos oculares param e as ondas cerebrais são mais lentas. Neste estágio, a pessoa passa 50% do tempo, em média. No estágio 2 a atividade cardíaca é reduzida, relaxam-se os músculos e a temperatura do corpo cai. É bem mais difícil de despertar o indivíduo.	
	Estágio 3	Considerado como sono profundo. As ondas cerebrais são extremamente lentas e intercaladas por ondas menores e mais rápidas. Chega a ser muito semelhante com o estágio 4, diferencia-se apenas em relação ao nível de profundidade do sono, que é um pouco menor.	
	Estágio 4	Ondas exclusivamente em frequência delta. Os estágios 3 e 4 são conhecidos também como sono profundo e é difícil acordar alguém neste momento do sono. É a fase onde o sono é muito profundo. Obs.:Após a fase 4, o indivíduo retorna ao estágio 3, estágio 2 e entra na fase REM.	
Sono REM	Estágio R	O REM é caracterizado pela intensa atividade cerebral, respiração mais rápida e irregular, muito semelhante ao estado de vigília, nessa fase ocorrem movimentos oculares rápidos, com os olhos se movimentando em várias direções o que explica o nome do estágio. É no REM que ocorrem os sonhos. Embora a fase do REM não resulte em um descanso profundo, ela é importante para nossa recuperação emocional.	1h-1h30min por noite

Fonte: Autor, 2022.

## 2.3 O Sono e o envelhecimento

À medida que há o envelhecimento, todo o organismo passa por modificações biológicas, influenciando ainda no processo do adormecimento, sendo comum queixas em relação a tal temática. Na população geriátrica, a sensação de noite mal dormida reduz conside-

ravelmente as capacidades cognitivas e físicas, interferindo negativamente na qualidade de vida (AGUIAR *et al.*, 2021).

Geralmente, isso decorre das perturbações exercidas no ciclo circadiano: na terceira idade, o sono torna-se mais leve, com aumento da primeira e segunda fase acompanhado de uma diminuição do último estágio de sonolência. Além do mais, a quantidade do hormônio melatonina sintetizada no cérebro tende a diminuir com o passar do tempo, corroborando com as chances do indivíduo despertar durante a fase NREM, através da presença de uma luminosidade ou de um simples ruído, por exemplo. Com isso, o sono NREM é apenas parcialmente restaurador, uma vez que é curto e fragmentado (LOPES, 2018).

Outro problema passa pela queda global do tempo de sono noturno. Em geral, pessoas mais jovens não precisam de tantas horas deitadas em uma cama para obterem um sono com qualidade. Em compensação, os idosos, sim. Existe também a propensão a elevar o tempo de latência, o que decresce a capacidade de iniciar um estágio de sonolência por tal parcela da sociedade (FERREIRA, 2020).

Conforme as pessoas envelhecem, o tempo total de sono e o sono profundo tendem a diminuir, e a probabilidade de o sono ser interrompido aumenta. Embora as causas de dormir mal possam ser as mesmas que aquelas para as pessoas mais jovens, as mudanças relacionadas à idade também podem contribuir para a má qualidade do sono (SCHWAB, 2022).

As consequências clínicas dos problemas do sono em idosos podem resultar frequentemente em desorientação, alteração cognitiva, retardo psicomotor e diminuição da função física, com implicações diretas nas atividades de vida diária, risco aumentado de acidentes e traumas, pior estado de saúde e aumento do risco de morte. Há uma

associação direta entre noites de sono de má qualidade e o desempenho funcional diurno (MARGARIDA, 2017).

## 2.4 Distúrbios do Sono

Os DS são perturbações que afetam a capacidade para adormecer, dormir de forma contínua ou permanecer acordado ou são comportamentos anômalos durante o sono. O sono pode ser perturbado por muitos fatores, incluindo horários de descanso irregulares ou ficar longas horas a mais na cama, atividades antes de dormir, estresse, dieta, doenças ou medicamentos (BACELAR, 2019).

A dificuldade em dormir que nem sempre está associada a uma doença, segundo a Sociedade Brasileira do Sono (SBS), se é exagerada é o principal alerta para um problema crônico. As primeiras manifestações dos DS se dão através de alterações de humor e de memória e de capacidades mentais (cognitivas), como aprendizado, raciocínio e pensamento (BACELAR, 2019; SCHWAB, 2022).

A prevalência dos DS na população adulta é estimada em 15% a 27%, com cerca de 70 milhões de pessoas sofrendo algum tipo de DS só nos Estados Unidos. No Brasil, a estimativa de transtornos de sono na população geral é de aproximadamente dez a vinte milhões de pessoas. Com o envelhecimento, a queixa de sono torna-se mais frequente, com uma prevalência que varia de 15-62% a depender da região geográfica e da população estudada (PEBMED, 2020).

Os DS tem um grande impacto sobre a qualidade de vida e as atividades diárias e é considerado como um fator de risco independente para os acidentes no trabalho (SILVA *et al.*, 2017), doenças cardiovasculares, Acidente Vascular Cerebral (AVC), doenças metabólicas (GUIMARÃES; SCHIRMER; COSTA, 2018) e provavelmente para o surgimento de infecções (MORAIS *et al.*, 2019).

Sendo os DS mais comuns a insônia, a apneia obstrutiva do sono, o bruxismo, o sonambulismo e a síndrome das pernas inquietas. São frequentes também o sono insuficiente e o atraso de fase de sono. Essa realidade, muitas vezes, é reflexo de estresse e de horários corridos (PEBMED, 2020).

Contudo, a mais recente edição da Classificação Internacional dos Distúrbios do Sono (CIDS) (*International Classification of Sleep Disorders - ICSD*), dividiu em 2014 os DS em 7 categorias principais, sendo 1. Insônia; 2. Distúrbios respiratórios; 3. Hipersonias de origem central; 4. Distúrbios do ritmo circadiano de sono e vigília; 5. Parassonias; 6. Distúrbios do movimento relacionados ao sono e outros distúrbios são as sete principais categorias dos DS (NEVES; MACÊDO; GOMES, 2017).

## **2.4.1 Principais Distúrbios do Sono em Idosos**

Na idade avançada, o sono de má qualidade e os DS têm particular relevância, pois além de muito frequentes podem causar prejuízos ao cotidiano e à saúde. Dificuldade em manter a atenção, redução da velocidade de resposta, prejuízos da memória, da concentração e do desempenho podem ser o resultado do sono de má qualidade (XIMENES, 2017).

Além disso, diversos fatores podem impactar de forma negativa para o desenvolvimento dos DS em idosos. Os fatores sociais e emocionais podem prejudicar a qualidade de sono dos idosos. As mudanças da rotina, o aumento de preocupações, a solidão e a falta de atividades prazerosas contribuem para a redução do tempo e satisfação com o sono. Entretanto, o entendimento destas alterações com a idade e a manutenção de hábitos e comportamentos saudáveis podem

superar as dificuldades e garantir boas noites de sono (TREPTOW, 2021).

### *Insônia*

Dos inúmeros transtornos relacionados ao dormir, a insônia corresponde ao DS mais prevalente na terceira idade e é caracterizado pela dificuldade em iniciar ou manter o sono ou ainda pela ausência de sono reparador e de qualidade. Os indivíduos acometidos por insônia queixam-se de cansaço, comprometimento da memória, irritabilidade, sonolência diurna, entre outros sinais e sintomas que causam prejuízos pessoais e sociais. Além do mais, a insônia está também associada a um aumento de morbimortalidade por doenças cardiovasculares, psiquiátricas e acidentes (TREPTOW, 2021).

### *Apneia do Sono*

A apnéia do sono do idoso também é bastante comum na idade avançada, é definida como a cessação do fluxo do ar pela boca ou nariz por dez segundos, pelo menos, que ocorre durante o ciclo de sono em pessoas acima de 65 anos de idade, cinco ou mais vezes por hora de sono. A interrupção da respiração é acompanhada por roncos intenso e contínuo. É mais freqüente em homens e em indivíduos acima de 60 anos de idade e parece estar associada ao excesso de sonolência diurna, depressão, cefaléia, aumento de irritabilidade, diminuição da concentração e atenção, prejuízo da memória na demência, além de um aumento do risco de morte súbita noturna (OLIVEIRA, 2018).

### *Movimento periódico das pernas e Síndrome das pernas inquietas*

O Movimento Periódico das Pernas, é um distúrbio motor do sono marcado por movimentos fora do normal que podem ir de

contração muscular nos tornozelos e dedos dos pés até movimentos bruscos que alcançam até os braços. Já a Síndrome das Pernas Inquietas afeta as pessoas com sensações de formigamentos, câimbras e até dores nas extremidades inferiores, criando uma sensação urgente de mover as pernas em busca de alívio. Um mesmo paciente pode ter os dois distúrbios, mas eles não estão necessariamente associados (PERSONO, 2021).

### *Hipersonia*

A hipersonia, ou sonolência excessiva, pode ou não ter relação com as dificuldades de sono noturno apresentadas naturalmente na velhice. No caso de não ter relação com outros problemas, ela é chamada de hipersonia primária. Por outro lado, se relacionada a alguma outra condição de saúde ou mesmo ao consumo de algum medicamento, ela é chamada de hipersonia secundária, muito mais comum do que a primária. A apneia é uma das grandes culpadas da sonolência excessiva entre os idosos. Entre as outras causas podem estar traumas no cérebro, doenças cardiopulmonares e o hipotireoidismo (TREPTOW, 2021).

## **2.5 Medicamentos Benzodiazepínicos e o seu uso irracional**

Os fármacos psicotrópicos representam uma parcela grande dos medicamentos utilizados no Brasil. Assim, desde a descoberta seu uso se tornou amplo, por tratar diferentes transtornos, dentre eles, os relacionados ao sono, uma vez que seu uso traz benefícios frente à diminuição do despertar noturno. Os BDZs pertencem a uma variedade de substâncias que têm a capacidade de deprimir o SNC, provocando calma ou sedação (sonolência) e são classificados como sedativo-hipnóticos (VITÓRIO, 2017).

Os BDZs atuam potencializando a ação inibitória do neurotransmissor Ácido Gama Aminobutírico (GABA). Seus alvos são os receptores do ácido  $\gamma$ -aminobutírico tipo A GABAA, que é o principal neurotransmissor inibitório no SNC, e esses receptores do GABAA são compostos de uma combinação, no somatório de cinco subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  inseridas na membrana pós-sináptica (PAIVA, 2021).

O complexo formado entre o GABA e o seu receptor (GABA-R) abre o canal de cloreto, aumentando sua condução intracelular e afetando a membrana do neurônio, despolarizando-a, os receptores do GABA são mantidos em estado de baixa afinidade pela ação de um peptídeo endógeno modulador (GABAmódulina) (AZEVEDO; ARAUJO; FERREIRA, 2016).

Os BDZs foram lançados inicialmente com a finalidade de substituir os barbitúricos que apresentavam maior risco de dependência. No decorrer do tempo descobriu-se seus efeitos adversos e com o uso indiscriminado, os BDZs também apresentaram dependência com o seu uso prolongado. A população idosa tem um risco aumentado de adquirir dependência com doses usuais e com menos tempo de uso (PEREIRA *et al.*, 2022).

Os fármacos BDZs são os hipnóticos mais utilizados, tendo substituído os barbitúricos como agentes de primeira escolha porque apresentam maior índice terapêutico e menor potencial para dependência física. Caracteristicamente, diminuem a latência do sono e a frequência com que a pessoa acorda durante a noite, aumentando a duração do sono total (TENÓRIO, 2016).

Embora as recomendações para o uso de BDZs com prescrição sugerem que a duração se limite a algumas semanas, é conhecido o uso desses medicamentos por meses, anos, ou até décadas, mesmo que as evidências demonstrem que seus benefícios podem diminuir

com o tempo, enquanto o potencial para efeitos adversos permanece (ESTEFAN, 2016).

O uso prolongado de BDZs, ultrapassando períodos de 4 a 6 semanas pode levar ao desenvolvimento de tolerância, abstinência e dependência (PALMEIRAS, 2016). O fato de haver abusos em usar medicamentos, como por exemplo os BDZs, é um assunto importante que está sendo objeto de análise e discussão em saúde pública. De acordo com dados da OMS, o percentual de internações hospitalares provocadas por reações adversas a medicamentos ultrapassa 10%. Para isto, existe a Política de Medicamentos do MS, que procura conscientizar a população brasileira sobre a utilização racional desses produtos (OLIVEIRA, 2019).

O uso indevido de BDZs envolve não somente os médicos que os prescrevem, como também os farmacêuticos que os dispensam. A falta de informação e a pouca percepção das consequências desse uso pelos médicos, farmacêuticos e o usuário juntamente com várias outras questões favorecem esse fenômeno (DE OLIVEIRA, 2015). Dessa forma, é preciso não apenas controlar, mas informar médicos, farmacêuticos, enfermeiros e pacientes desta realidade, apontando para melhores formações e atualizações dos profissionais da área, como também de informações aos usuários e medidas de prevenção primária, que poderiam resultar em um grande impacto social comum baixo custo.

### **3 METODOLOGIA**

Houve a elaboração de uma revisão de literatura (RL) do tipo narrativa, de caráter descritivo e discursivo. Para o desenvolvimento da pesquisa, formulou-se a seguinte pergunta norteadora: “Qual o papel do farmacêutico nos distúrbios do sono em idosos?”. Em

seguida, definiu-se os termos de indexação ou descritores: “Distúrbios do sono”, “uso irracional de medicamentos”, “benzodiazepínicos” e “idosos”. É válido ressaltar que, o booleano AND foi usado entre eles. Tal pesquisa, trata-se de uma investigação realizada entre julho a setembro de 2022, através da coleta de dados, criada a partir de fontes secundárias, por intermédio de um levantamento bibliográfico de artigos científicos nas variadas bases de dados: Biblioteca virtual em Saúde (BVS), Scielo, Scopus, Science direct, LILACS, PUBMED e Google Acadêmico. Excluiu-se os artigos de revisão da literatura, artigos que não abordaram o uso irracional de medicamentos BDZ em idosos, artigos que não apresentaram enfoque na atuação do profissional farmacêutico nos DS, além de publicações produzidas anteriormente a 2015.

Outrossim, com o propósito de atualizar ainda mais as informações colhidas, os materiais de pesquisa também abordaram livros, cartilhas e/ou informativos fornecidos pelo Ministério da Saúde (MS) e pela Organização Mundial de Saúde (OMS), sendo todo o assunto aqui explanado dos últimos sete anos, isto é, de 2015-2022.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Seleção dos artigos**

Nesse estudo, tomando como base as plataformas eletrônicas de dados utilizadas, foram obtidos 45 artigos, dos quais 30 foram do Google Acadêmico, 7 do PubMed, 3 do LILACS, 2 da BVS, 2 do Science direct e 1 do SciELO, na base de dados Scopus não foi encontrado nenhum artigo pertinente. Destes, após leitura flutuante, foram excluídos os títulos repetidos e que não se enquadram com a atuação do profissional farmacêutico nos distúrbios do sono e o uso irracional de medicamentos BDZs em idosos. Em seguida, a partir de releitura

minuciosa e aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, foram selecionados 9 artigos para compor os resultados e discussão. Na tabela 2 podemos visualizar os artigos pré-selecionados e selecionados de acordo com os critérios pré- estabelecidos.

**Tabela 2 - Artigos pré-selecionados e selecionados de acordo com a estratégia de busca**

Descritores combinados para a busca	Qual o papel do farmacêutico nos distúrbios do sono em idosos? ("Distúrbios do sono", "uso irracional de medicamentos", "benzodiazepínicos" e "idosos").						
	Biblioteca Virtual em Saúde	Scielo	Scopus	Science Direct	LILACS	PubMed	Google Acadêmico
<b>Banco de dados</b>							
Artigos Encontrados	2	1	0	2	3	7	30
Artigos Selecionados	0	1	0	1	0	1	6
<b>Total</b>							<b>9</b>

Fonte: Autor, 2022.

A fim de facilitar a compreensão do levantamento da literatura narrativa, bem como a discussão da temática em estudo, os artigos foram selecionados e caracterizados em forma de quadro para melhorar a visualização e discussão dos resultados. São apresentados considerando informações do ano e autoria, principais objetivos e principais resultados conforme a tabela 3, que dispõe dos 9 artigos selecionados que atingiram o objetivo desta pesquisa.

**Tabela 3 - Artigos selecionados para construção dos resultados e discussões**

AUTORES E ANO	TÍTULO DO ARTIGO	PRINCIPAIS OBJETIVOS DO ESTUDO
DE SOUZA, et al., 2021	DISTÚRBIOS DO SONO EM PACIENTES IDOSOS COM DEMÊNCIAS.	Apontar o papel do Farmacêutico como profissional de saúde que esclarece dúvidas sobre a influência de medicamentos e o sono tanto pra idosos quanto pra população em geral que também chegará nessa idade futuramente com o aumento da expectativa de vida e assim deve-se estudar o processo pra que compreenda-se os prós e contras que a idade trás sobre o sono e solucioná-lpra uma melhor qualidade de vida futura.
LIMA, et al., 2021	Papel do farmacêutico no combate ao uso indiscriminado de benzodiazepínicos: uma revisão de literatura.	Mostrar a influência do farmacêutico no combate ao uso abusivo correlacionado ao código de ética da profissão, atuando na análise dos casos de uso indiscriminado, podendo indicar a suspensão da medicação, bem como a sensibilização da comunidade e sugestões de alternativas não farmacológicas.
VITÓRIO, 2017	Impacto da privação do sono em humanos-terapêutica e abordagem farmacêutica.	Fornecer informação adequado ao bom uso dos medicamentos e promover a adesão terapêutica sabendo que o farmacêutico, enquanto agente promotor da saúde, assume um papel preponderante na sensibilização das populações para a adoção de bons hábitos de sono.
DE LARA QUEIROZ, et al., 2021	BENZODIAZEPÍNICOS: USO RACIONAL EM ADULTOS E IDOSOS EM FARMÁCIAS PRIVADAS DE CUIABÁ, MATO GROSSO.	Investigar o uso racional de benzodiazepínicos em adultos e idosos em duas farmácias privadas de Cuiabá-MT. O farmacêutico promove a adesão do tratamento garantindo a devida segurança, eficácia do medicamento, tanto com orientações farmacológicas quanto não farmacológicas, promovendo o uso racional dos medicamentos e assim proporcionando uma melhor qualidade de vida ao paciente.
PALMEIRAS, et al., 2021.	Incidência do uso de benzodiazepínicos em idosos e os riscos associados	Avaliar os riscos associados ao uso de benzodiazepínicos por idosos, sabendo que existem inúmeros riscos associados ao uso dessas drogas, e atuação do profissional farmacêutico ao intervir positivamente em busca de uma melhor qualidade de vida para o paciente.
DE ALMEIDA SILVA, 2018.	Os impactos cognitivos e psicotores aos pacientes idosos sob uso crônico de benzodiazepínicos	Abranger os problemas relacionados ao uso crônico dessa classe de medicamentos pelos idosos, o que gera um impacto negativo na saúde física e cognitiva a curto e longo prazo na vida desses pacientes.
ABREU, ALESSANDRA RAISSA DE: JÚNIOR, 2019.	ATENÇÃO FARMACÊUTICA EM IDOSOS DEPENDENTES DE MEDICAMENTOS PSICOATIVOS.	Uso de benzodiazepínicos em idosos deve ser racional, avaliando-se o padrão e as razões de uso, os efeitos do uso continuado e as estratégias utilizadas pelos clínicos e farmacêuticos para reduzir ou cessar seu uso.

MATOSO; MOURA, 2018.	O uso indiscriminado de benzodiazepínicos por idosos atendidos na atenção primária de Felixlândia, Minas Gerais.	Verificar se há facilidade de renovação de receitas na atenção primária e se a distribuição gratuita de BZD através dos programas vinculados à atenção primária para saúde contribuem para o uso indiscriminado desta classe medicamentosa. Além de afirmar a necessidade de mudanças no cenário de consumo de BZDs entre idosos, fazendo-se necessárias diversas intervenções, orientação e assistência minuciosa aos idosos usuários de BZDs, a ser realizada pelos prescritores, em conjunto com todos os profissionais de saúde envolvidos no cuidado a estes idosos.
E SILVA; NOGUEIRA, 2021.	A importância da atenção farmacêutica como ferramenta para a promoção do uso racional de medicamentos em idosos que fazem uso de polifarmácia: uma revisão integrativa.	Mostrar a importância da Atenção Farmacêutica como ferramenta para o uso racional de medicamentos em idosos polifarmácia e o papel do farmacêutico atuando na qualidade de vida dos idosos.

Fonte: Autor, 2022.

## 4.2 Apresentação das Evidências

Segundo Fegadolli, Varela e Carlini (2019), no Brasil a grande maioria das prescrições dos medicamentos BDZs é feita por médicos dos serviços da atenção básica à saúde, e estes relatam possuírem pouco tempo para realizarem as consultas e a elaboração de estratégias terapêuticas que auxilia no tratamento de transtornos mentais, tais como, a ansiedade e insônia, sendo estes os principais motivos para o consumo.

Deste modo, com a falta de recurso de informações, controle medicamentoso e orientação oferecido pelo profissional médico, muitos dos pacientes idosos buscam por alternativas mais fáceis, que controle os seus transtorno de uma forma mais rápida e facilitada e a partir disso, estudos como o de Oliveira, Lopes e Castro (2015) percebeu que o uso irracional dos BDZs foi determinado devido a uma encadeação de fatores que favorecem essa prática.

Ainda sobre o estudo de Oliveira, Lopes e Castro (2015) é importante visualizar que entra em equivalência com Palmeiras *et al.* (2021) e, tem-se que, tal prática se inicia com a não necessidade de uma consulta formal, prescrição inadequada, facilidade em arranjar receitas de psicotrópicos, ou facilidade em comprar sem possuir a receita, ou a mesma falsificada, rasurada, incompleta, sem data ou vencida, somada ao baixo custo da medicação, automedicação, falta

de informação ao paciente, polifarmácia, distribuição gratuita pelo governo e muitos desses fatores associa-se a falta de assistência de profissionais de saúde, como por exemplo, o médico e o farmacêutico (DE MOURA *et al.*, 2016).

A afirmação de Pereira *et al.* (2022) remete que os idosos são mais propensos a polifarmácia e conseqüentemente a tomar medicamentos que afetam o sono. Alguns como diuréticos para a insuficiência cardíaca aumentam a necessidade de urinar e, dessa forma, interrompem o sono. Outros remédios, segundo Veras e Rocha (2021), fazem com que as pessoas fiquem mais sonolentas durante o dia ou as deixam estimuladas. Devido a esses efeitos colaterais, torna-se mais difícil dormir à noite.

É importante salientar que medicamentos que auxiliam a dormir, independentemente de serem prescritos por um médico ou estarem disponíveis sem a devida prescrição médica, mesmo em doses menores, podem causar efeitos colaterais. Sendo mais provável que esses efeitos colaterais ocorram e causem mais problemas em pessoas de idade avançada.

E novamente, Pereira *et al.* (2022), reafirma que muitas drogas que alteram a mente (psicoativas) podem causar movimentos anormais durante o sono podendo perturbar o sono, ocasionar falta de coordenação, nervosismo, agitação, dificuldade para urinar e confusão. Os sedativos que são comumente prescritos para tratar a insônia podem causar irritabilidade e apatia e reduzir o estado de alerta mental. Essas drogas também aumentam o risco de quedas nos idosos, devido a potencialidade dos seus efeitos colaterais, sendo um fator de alto risco para essa faixa etária.

Em conformidade com Balmori *et al.* (2018 ), relatou que se um sedativo for tomado por mais de alguns dias, interromper o uso

do sedativo pode agravar subitamente o problema inicial do sono. É importante salientar que o risco de efeitos colaterais, abstinência e dependência é aumentado com utilização de altas doses de medicação e o uso crônico, geralmente superior a 08-12 semanas. É necessário fazer o processo de “desmame” do fármaco, para que haja segurança na interruptibilidade da medicação.

Silva e Nogueira (2021) comentam que o uso irracional de medicamentos na população idosa traz consigo grandes desafios em sua prática, exigindo do farmacêutico estudos frequentes e produção de conhecimento para combater esse problema comum na população mundial e que acarreta potenciais efeitos negativos. A intervenção do farmacêutico na prescrição de medicamentos BDZs em pacientes idosos e na polifarmácia demonstra grande eficácia na diminuição de medicamentos potencialmente inadequados (MPIs), concretizando em seu trabalho o uso racional de medicamentos.

De acordo com Lima *et al.* (2021), o farmacêutico ganha bastante destaque no processo de combate ao uso indevido de medicamentos, possuindo a responsabilidade de orientar e, quando necessário, rejeitar receitas inadequadas, visando a qualidade de vida do indivíduo, como é estabelecido pelo Código de Ética da Profissão Farmacêutica (BRASIL, 2021). Dentro do âmbito de controle desses agentes psicotrópicos, a ação do profissional farmacêutico deve ser ainda melhor elucidada, de forma a ultrapassar a barreira da dispensação e se tornar um agente disseminador da informação.

É evidenciado por Leite (2021), que a assistência farmacêutica nos transtornos mentais, ainda é de fraco aspecto e é pouco visto, tornando-se pouco eficaz e podendo agravar quadros clínicos e distúrbios. Sabendo que, o farmacêutico tem grande papel na terapia medicamentosa, proporcionando uma melhoria na administração, posologia e diminuição da automedicação, entretanto, a falta de

contato com o paciente ainda é elevada, ocasionando dificuldade para a atenção farmacêutica e assistência ao paciente

Contudo, Oliveira e Carvalho (2021) analisa que, é imprescindível apontar o papel do farmacêutico como profissional de saúde que esclarece dúvidas sobre a influência de medicamentos no combate aos problemas do sono tanto para idosos quanto para população em geral que também chegará nessa idade futuramente com o aumento da expectativa de vida e assim, deve-se estudar o processo para que compreenda-se os prós e contras que a idade trás sobre o sono e solucioná-lo para uma melhor qualidade de vida futura.

Assim, nota-se o importante papel do farmacêutico ao paciente idoso, contribuindo significativamente para este quadro irracional de utilização, pois muitas vezes não alertam os indivíduos sobre as consequências deletérias que seu uso pode promover. Além disso, os usuários crônicos de BDZs devem buscar alternativas para solucionar as causas que promovem esta utilização, ao invés de mascará-las com estes medicamentos.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através dos resultados obtidos com os estudos dos autores, pode-se concluir que a população idosa que possuem distúrbios do sono e são usuárias de medicamentos BDZs tem risco de adquirir dependência e abstinência medicamentosa e esse risco varia conforme a idade, a dosagem e o tempo de uso. Esse estudo proporcionou um maior conhecimento sobre a dependência criada referente ao combate aos DS nos idosos. Sendo necessário que o profissional médico, responsável por prescrever assim como o farmacêutico forneça informações ao paciente como também elaborem estratégias que ajudem a diminuir o risco de uso prolongado de BZDs.

Contudo, ainda é pequena a literatura sobre o segmento dos distúrbios do sono em idosos e poucos são os estudos primários conduzidos nesta temática.

## REFERÊNCIAS

ABREU, A. R.; JÚNIOR, A. T. T. **Atenção farmacêutica em idosos dependentes de medicamentos psicoativos**. Trabalho de Conclusão de Curso. Faculdade de Educação e Meio Ambiente, Ariquemes- RO, 2019.

AGUIAR, A. *et al.* O sono nos mais velhos. Olhares sobre o envelhecimento. **Estudos interdisciplinares**, v. 1, p. 129-136, 2021.

ANVISA. **Anvisa autoriza melatonina na forma de suplemento alimentar**. 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2021/anvisa-autoriza-a-melatonina-na-forma-de-suplemento-alimentar>>. 2021. Acesso em 08 de outubro de 2022.

AZEVEDO, A. J. P.; ARAUJO, A. A.; FERREIRA, M. Â. F. Consumo de ansiolíticos benzodiazepínicos: uma correlação entre dados do SN-GPC e indicadores sociodemográficos nas capitais brasileiras. **Ciênc. saúde coletiva**, v. 21, n. 1, p. 83-90, Jan. 2016.

BACELAR, Andrea; PINTO JUNIOR, Luciano Ribeiro. **Insônia do diagnóstico ao tratamento**. São Paulo: Difusão Editora, 2019. 172p.

BALMORI, A. A. *et al.* Considerations for the use of a loading dose of diazepam for the treatment of benzodiazepine. **Adicciones**, v. 30, n. 3, p. 227-228, 2018.

BEZERRA, M. A. A. *et al.* Qualidade de vida e qualidade do sono de idosos. **Revista Interdisciplinar Encontro das Ciências**, v.1, n.2, p. 187-195, 2018.

BRASIL. **Resolução N° 711, de 30 Julho de 2021.** In Diário Oficial da União.

CONSTANTE, J. O. **O perfil de uso de benzodiazepínico por usuários de uma unidade de estratégia de saúde da família de uma cidade do sul de Santa Catarina.** Disponível em: <http://www.bib.unesc.net/biblioteca/sumario/00003E/00003E2B.pdf>. 2008. Acesso em: 11 out. 2022.

DA COSTA, C. A. F. *et al.* Uso indiscriminado dos benzodiazepínicos na sociedade moderna: uma revisão sistemática. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 6, p. 18067- 18075, 2020.

DANTAS, T. **“Fases do Sono”**, *Brasil Escola*. Disponível em: <https://brasilecola.uol.com.br/curiosidades/fases-sono.htm>. Acesso em: 08 de outubro de 2022.

CFF. Conselho Federal de Farmácia. **Serviços farmacêuticos diretamente destinados ao paciente, à família e à comunidade: contextualização e arcabouço conceitual.** Brasília, v. 200, 2016.

CFF. Conselho Federal de Farmácia. **Atuação do Farmacêutico frente à pandemia da doença causada pelo coronavírus.** Plano de resposta para as farmácias privadas e públicas da atenção primária, v.1, 2020.

DELGADO, A. S. P. M. **A qualidade do sono em idosos atendidos em Unidade Militar de Saúde do Distrito Federal.** Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2020.

DE ALMEIDA SILVA, S. Os impactos cognitivos e psicomotores aos pacientes idosos sob uso crônico de benzodiazepínicos. **Revista Científica Multidisciplinar**, v. 3, n. 5, p. e351498-e351498, 2018.

DE LARA QUEIROZ, L. *et al.* **Benzodiazepínicos: uso racional em adultos e idosos em farmácias privadas de cuiabá, mato grosso.** Tra-

balho de Conclusão de Curso. Centro Universitário de Várzea Grande, Várzea Grande – MT, 2021.

DE MOURA, D. C. N. *et al.* Uso abusivo de psicotrópicos pela demanda da estratégia saúde da família: revisão integrativa da literatura. **Revista de Políticas Públicas**, v. 15, n. 2, 2016.

DE OLIVEIRA, J. D. L.; MOTA, L. A.; CASTRO, G. F. P. Uso Indiscriminado dos Benzodiazepínicos: a contribuição do farmacêutico para um uso consciente. **Revista Transformar**, n. 7, p. 214-226, 2015.

DE SOUZA, M. L. S. *et al.* Distúrbios do sono em pacientes idosos com demências. **Revista Ibero-americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 7, n. 10, p. 168-178, 2021.

ESTEFAN, J. E. **Intervenção no abuso de benzodiazepínicos na ESF.** Trabalho de Conclusão de Curso. Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2016.

FABBRI, M. *et al.* Measuring subjective sleep quality: a review. **International journal of environmental research and public health**, v. 18, n. 3, p. 1082, 2021.

FEGADOLLI, C.; VARELA, N. M. D.; CARLINI, E. L. A. Uso e abuso de benzodiazepínicos na atenção primária à saúde: práticas profissionais no brasil e em cuba. **Cadernos de Saúde Pública**, v.35, n.6, p.1-11, 2019.

FERREIRA, M. R. M. **O dormir é meio sustento. Fique atento! Promoção de hábitos desono saudáveis numa população idosa.** Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico de Portalegre, Portalegre, Portugal, 2020.

GUIMARÃES, L.; SCHIRMER, M.; COSTA, Z. Implicações da privação do sono na qualidade de vida dos indivíduos. **Perspectiva: Ciência e Saúde**, v.3, n.1, 2018

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 13<sup>o</sup> ed. ed. Rio De Janeiro: Editora Elsevier Ltda, 2017.

HADDAD, F. L. M.; GREGÓRIO, L. C. **Manual do residente: medicina do sono**. Barueri: Manole, 2017.

IRWIN, M. R.; OPP, M. R. Sleep health reciprocal regulation of sleep and innate immunity. **Neuropsychopharmacology**, v.42, n.1, p.129-155, 2017.

LIMA, A. E. *et al.* Papel do farmacêutico no combate ao uso indiscriminado de benzodiazepínicos: uma revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, p. e304101522886-e304101522886, 2021.

LOPES, G. M. C. **A qualidade do sono no idoso**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Évora. 2018.

MARGARIDA, R. **Impacto da privação do sono em humanos - terapêutica e abordagem farmacêutica**. Universidade de Coimbra (Portugal), set/2017.

MATOSO, K. F. C.; MOURA, P. C. O uso indiscriminado de benzodiazepínicos por idosos atendidos na atenção primária de Felixlândia, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Ciências da Vida**, v. 6, n. 3, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Blog da saúde. Você sabe por que o sono é tão importante?** Disponível em: <<http://www.blog.saude.gov.br/index.php/570-destaques/34350-voce-sabe-por-que-o-sono-e-tao-importante>>. 2016. Acesso em: 10 out. 2022.

MORAIS, K. C. P. *et al.* **Sonolência diurna excessiva, qualidade do sono e qualidade de vida de bombeiros militares**. Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2019.

MORENO, C. R. C. *et al.* Problemas de sono em idosos estão associados a sexo feminino, dor e incontinência urinária. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 21, p. e180018, 2019.

NEVES, G. S. M. L.; MACÊDO, P. J. O. M.; GOMES, M. M. Transtornos do sono: atualização (1/2). **Revista Brasileira de Neurologia**, v. 53, n. 3, p. 19-30, 2017.

OLIVEIRA, G. M. **A atenção quaternária visando a redução do uso de benzodiazepínicos no município de ribeirão branco-sp.** Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de São Paulo, 2019.

OLIVEIRA, J. D. L.; LOPES, L. A. M., CASTRO, G. F. P. Uso Indiscriminado Dos Benzodiazepínicos: a contribuição do farmacêutico para um uso consciente. **Revista TRANSFORMAR**, v. 7, n.7, p. 214-226, 2015.

OLIVEIRA, P. G. Tratamento da apneia obstrutiva do sono com pressão aérea positiva contínua: ensaio clínico randomizado para avaliar o efeito na qualidade de vida de pacientes com hipertensão não controlada. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

PAIVA, Y. B. **Evidências farmacológicas de uma interação entre vias opioides e GABAérgicas recíprocas entre o colículo inferior e a substância cinzenta periaquedutal dorsal: papel do receptor opioide do tipo k na modulação do comportamento de defesa.** Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

PALMEIRAS, G. S. *et al.* Incidência do uso de benzodiazepínicos em idosos e os riscos associados. **J Health Sci Inst.**, v. 40, n. 1, p. 59-66, 2021.

PEBMED. **Sono e o Envelhecimento.** Disponível em: <https://www.google.com/amp/s/pebmed.com.br/sono-e-envelhecimento-par>

te-1- alteracoesfisiologicas-e-abordagem-geral-dos-disturbios-de-sono-em-idosos/.2020.Acesso em: 10 out. 2022.

PEREIRA, J. F. *et al.* O uso de benzodiazepínicos em idosos eo risco de dependência: uma revisão integrativa. **Visão Acadêmica**, v.23, n. 2, 2022.

PERSONO. **Os mais comuns distúrbios do sono no idoso.** 2021. Disponível em: <https://persono.com.br/insights/disturbios-do-sono/disturbios-do-sono-no-idoso>. Acesso em: 09 out. 2022.

SANTANA, T. P. *et al.* Sono e imunidade: papel do sistema imune, distúrbios do sono e terapêuticas/Sleep and immunity: role of the immune system, sleep disorders and treatment. *Brazilian Journal of Development*, v. 7, n.6, p. 55769-55784, 2021.

SCHWAB, R. J. **Visão geral do sono.** 2022. MANUAL MSD. Disponível em:<https://www.msmanuals.com/pt-br/casa/dist%C3%BArbios-cerebrais,-da-medula-espinal-e-dos-nervos/dist%C3%BArbios-do-sono/dist%C3%BArbios-do-sono-ligados-ao-ritmo-circadiano>. Acesso em: 09 out. 2022.

SCHMEER, C. *et al.* Dissecting Aging and Senescence-Current Concepts and Open Lessons. **Cells**, v. 8, n. 11, p. 1-28, 2019.

SENRA, E. D. *et al.* Efeitos colaterais do uso crônico e indiscriminado de benzodiazepínicos: Uma revisão narrativa Side effects of chronic and indiscriminate use of benzodiazepines: A narrative review. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 11, p. 102013-102027, 2021.

SILVA, A. R. *et al.* Doenças crônicas não transmissíveis e fatores socio-demográficos associados a sintomas de depressão em idosos. **Jornal brasileiro de Psiquiatria**, v. 66, p. 45-51, 2017.

SILVA, J. C. C.; NOGUEIRA, R. P. S. A importância da atenção farmacêutica como ferramenta para a promoção do uso racional de medicamentos em idosos que fazem uso de polifarmácia: uma revisão

são integrativa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, p. e543101523560- e543101523560, 2021.

SOUZA, R. G. *et al.* Qualidade do sono em idosos. **Revista de trabalhos acadêmicos-universo campos dos goytacazes**, v. 2, n. 9, 2018.

TEIXEIRA, C. A. D. *et al.* Principais distúrbios do sono na população idosa: uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 2, p. 2702-2709, 2020.

TENÓRIO, F. **Instrumentação Em Farmacodependência**. Fundação CECIERJ. vu,2016.

TORDIMAN, S.; CHOKRON S. *et al.* Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits. **Current Neuropharmacology**, v. 15, n. 3, p. 434-443, 2017.

TREPTOW, E. C. **Como é o sono do idoso**. 2021. Disponível em: <https://institutosono.com/artigos-noticias/sono-do-idoso/#:~:text=Os%20dist%C3%BArbios%20espec%C3%ADficos%20de%20sono,-sono%20e%20sonol%C3%A2ncia%20excessiva%20diurna>. Acesso em: 12 out. 2022.

VITÓRIO, R. M. P. **Impacto da privação do sono em humanos- terapêutica e abordagem farmacêutica**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, 2017.

XIMENES, M. A. *et al.* Qualidade de vida dos idosos participantes do Projeto “Unidos da Melhor Idade” do Município de Fernão, SP, Brasil. **Revista Kairós Gerontologia**, v. 20, n. 1, p. 427-452, 2017.

## ÍNDICE REMISSIVO

- A 71, 72, 73, 74
- Aspergillus 25, 36, 43, 49, 64, 65, 66, 68, 69, 70, 73, 74
- C
- Characterization 15, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49
- D
- Doenças 14, 16, 17, 19, 38, 47, 50, 64, 66, 69, 71, 80, 87, 89, 90
- E
- Enzimas 14, 16, 17, 20, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 38, 39
- Estudos 14, 24, 25, 31, 37, 38, 54, 55, 59, 64, 72, 73, 82, 95, 97, 98, 99
- F
- Farmacêutico 14, 15, 28, 34, 78, 82, 92, 93, 96, 97, 98, 101, 102, 103
- Federal 13, 44, 53, 63, 77, 100, 101, 102, 103
- Fibrinolíticas 14, 15, 17, 20, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 38
- I
- Idosos 47, 78, 80, 81, 86, 88, 90, 92, 93, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105
- Insuetus 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70,
- L
- Literatura 14, 16, 20, 24, 25, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 38, 39, 66, 67, 70, 78, 92, 93, 94, 99, 101, 102, 105
- M
- Medicamentos 17, 18, 19, 38, 39, 54, 55, 78, 81, 82, 87, 90, 91, 92, 93, 95, 96, 97, 98, 99, 104
- P
- Protease 40, 41, 42, 45, 48, 49, 50, 51, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61
- S
- Saúde 14, 18, 24, 25, 47, 48, 78, 93, 100, 101, 102
- U
- Universidade 13, 44, 53, 63, 77, 100, 101, 102, 103, 105

## **SOBRE OS ORGANIZADORES**

**ANA LÚCIA FIGUEIREDO PORTO** - Possui graduação em Licenciatura Em Química pela UFRPE (1980), mestrado em Bioquímica e Fisiologia pela UFPE (1994), doutorado em Engenharia Química pela UNICAMP (1998) com bolsa de Doutorado Sanduiche pelo Cnpq pela Universidade Técnica de Lisboa (1996). Atualmente é Professora Titular da UFRPE. Tem experiência na área de Bioquímica e Microbiologia.

**DANIELA DE ARAÚJO VIANA MARQUES** - Possui graduação em Biomedicina pela UFPE (2004) e mestrado em Ciências Biológicas pela UFPE (2006). Obteve o título de duplo-doutorado pela USP, Brasil e pela Universidade de Gênova, Itália (2006-2010) e de pós-doutor pela Universidade de São Paulo (2011) e Universidade Federal Rural de Pernambuco (2014). Professora Adjunta da Universidade de Pernambuco nos cursos de Saúde do Instituto de Ciências Biológicas (Campus Santo Amaro) e Professora Permanente do PPG em Biologia Celular e Molecular Aplicada (ICB/Campus Santo Amaro/UPE) e PPG em Saúde e Desenvolvimento Socioambiental (MultiCampi Garanhuns/UPE). Desenvolve pesquisas na área de Biotecnologia, Microbiologia, Doenças Infecciosas e Parasitárias e Epidemiologia na Universidade de Pernambuco.

**JOSÉ PEDRO MARTINS BARBOSA FILHO** - Farmacêutico formado pela Universidade Federal de Pernambuco (2021), atualmente é aluno de mestrado pelo programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF- UFPE), atuando na área da Enzimas Fibrinolíticas, com ênfase na atividade anticoagulante, parâmetros hematológicos e citotóxicos.

**JUANIZE MATIAS DA SILVA BATISTA** - Doutora e Mestre em Biociência animal pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, Especialista em Microbiologia pela FUNESO, Licenciada em Ciências Biológicas pela Universidade de Pernambuco e Pedagoga pelo Centro Universitário Internacional UNINTER. Possui experiência na área de Biotecnologia, Bioquímica e Microbiologia.

**KETHYLEN BARBARA BARBOSA CARDOSO** - Aluna de doutorado no Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada a Saúde da UFPE, Mestre em Biociência Animal pela UFRPE. Tem experiência nas áreas de Bioquímica; Biotecnologia; Microbiologia; Purificação de biomoléculas por métodos cromatográficos; Isolamento de biomoléculas a partir de plantas.

**MARIA RAFAELE OLIVEIRA BEZERRA DA SILVA** - Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade de Pernambuco (2018). Atualmente é mestranda da Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade de Pernambuco, é pesquisadora visitante da Universidade Federal Rural de Pernambuco e da Fundação Oswaldo Cruz/Instituto Aggeu Magalhães. Atua na área de Biotecnologia, com ênfase em Bioquímica e Parasitologia aplicadas.

**ROMERO MARCOS PEDROSA BRANDÃO COSTA** - Professor e Pesquisador da Universidade de Pernambuco, Bolsista de Produtividade em Pesquisa DT-2 - CNPq, é Biomédico formado pela UFPE (2007). Possui Mestrado em Bioquímica e Fisiologia pela UFPE ; Doutorado em Ciências Biológicas pela UFPE. Professor Permanente do Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde - PPGBAS-LIKA-UFPE e do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada - PPGBCMA - UPE. Apresenta experiência nas áreas de Bioquímica, Biotecnologia, Microbiologia clínica e experimental;

**THIAGO PAJEÚ NASCIMENTO** - Professor Adjunto da Universidade Federal do Piauí, Campus Prof<sup>a</sup>. Cinobelina Elvas (CPCE -Bom Jesus). Possui graduação em Ciências Biológicas pela UFRPE (2011), Graduação em Farmácia pela UFPE (2020), Mestrado em Ciências Biológicas (Biotecnologia) e Doutorado em Biologia Aplicada à Saúde ambos pela UFPE. Tem experiência na área de Microbiologia, Bioquímica, Biotecnologia, Hematologia e Farmacologia.

## Biotecnologia na saúde - Volume 3

É com enorme satisfação que venho apresentar o volume III dessa coleção de livros. Abordando os principais temas e pesquisas na área de Biotecnologia Farmacêutica, com relação as principais pesquisas realizadas no LABIOPROT (Laboratório de Avanços em Biotecnologia de Peptídeos e Proteínas) Tecnologia de Bioativos) localizado na Universidade de Pernambuco, em parceria com a Universidade Federal Rural de Pernambuco, Universidade Federal Rural de Pernambuco e Universidade Federal do Piauí. Essa coleção será publicada pela RFB Editora.

A coleção abordará toda a área de Ciências da Saúde, que segundo a Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), englobam: Medicina, Odontologia, Farmácia, Enfermagem, Nutrição, Saúde Coletiva, Fonoaudiologia, Fisioterapia e Terapia ocupacional e Educação Física.

Desse modo, todos os capítulos apresentados neste livro - em sua maioria são originários de pesquisa, trabalhos acadêmicos, TCC, monografia, dissertação e tese.

Organizadores

RFB Editora  
Home Page: [www.rfbeditora.com](http://www.rfbeditora.com)  
Email: [adm@rfbeditora.com](mailto:adm@rfbeditora.com)  
WhatsApp: 91 98885-7730  
CNPJ: 39.242.488/0001-07  
Belém, Pará, Brasil

