

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso

Avaliação da concentração inibitória mínima de Hipoclorito de Sódio e Vancomicina para amostras de *Enterococcus faecalis* isoladas de carnes de frangos

Tatiane Steffenon Basso

Porto Alegre, junho de 2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**Avaliação da concentração inibitória mínima de Hipoclorito de Sódio e
Vancomicina para amostras de *Enterococcus faecalis* isoladas de carnes de
frangos**

Tatiane Steffenon Basso

Trabalho de Conclusão
da Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Guedes Frazzon

Orientadora

Me. Tiane Martin de Moura

Co-orientadora

Porto Alegre, junho de 2012.

Dedico este Trabalho:

À Deus pela minha existência.

Aos meus pais Pedro e Jaci, por todo amor, apoio e pelo incentivo ao meu trabalho.

Aos meus colegas de curso, que estiveram sempre ao meu lado durante toda esta caminhada.

À minha amiga e orientadora Prof^a. Dr^a. Ana Paula Guedes Frazzon, pela colaboração sabedoria e amizade.

À Tiane pela dedicação, desprendimento e paciência.

"Desenvolver força, coragem e paz interior demanda tempo. Não espere resultados rápidos e imediatos, sob o pretexto de que decidiu mudar. Cada ação que você executa permite que essa decisão se torne efetiva dentro de seu coração."

Dalai Lama

APRESENTAÇÃO

Este trabalho foi elaborado na forma de artigo seguindo as normas da *Revista Brasileira de Farmácia*. As normas técnicas da revista encontram-se no Anexo I deste trabalho.

Avaliação da concentração inibitória mínima de Hipoclorito de Sódio e Vancomicina para amostras de *Enterococcus faecalis* isoladas de carnes de frangos

Tatiane Steffenon Basso¹; Tiane Martin de Moura^{2,3}; Ana Paula Guedes Frazzon^{2,3}

1 - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Faculdade de Farmácia, Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia, Porto Alegre, RS, Brasil.

2 - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Departamento de Microbiologia, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, RS, Brasil.

3 - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Departamento de Microbiologia, Laboratório de Bacteriologia, Porto Alegre, RS, Brasil.

RESUMO

A espécie *Enterococcus faecalis* tem sido relacionada a graves infecções adquiridas dentro do hospital por pacientes imunossuprimidos e pacientes das unidades de tratamento intensivo. O objetivo deste estudo foi avaliar a CIM do hipoclorito de sódio e da vancomicina frente a *E. faecalis* isolados de alimentos e detectar a presença do gene *vanC-1*, associado com a resistência intrínseca à vancomicina, por PCR. Foram utilizados no estudo cinco isolados de *E. faecalis* isolados de amostras de carne de frango. Para avaliar a CIM frente ao hipoclorito de sódio, foram testadas as concentrações de 2,5; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0 e 11,0% (v/v) e para a vancomicina as determinadas pela NCCLS 2003. Para investigar a presença do gene *vanC-1*, o DNA total das amostras foi extraído e este serviu de amostra para a PCR. Os resultados demonstraram que a técnica da microdiluição em caldo para determinação da CIM do hipoclorito de sódio nas amostras de *E. faecalis* não se mostrou eficiente, por outro lado, para a vancomicina, todos os isolados foram susceptíveis (CIM de 2,0 e 1,0 µg/mL) e o gene de resistência *vanC-1* não foi detectado em nenhum dos cinco isolados de amostras de carne de frango.

Palavras - chave: Infecção, Resistência, Biocidas, *vanC-1*,

ABSTRACT

The *Enterococcus faecalis* species has been emerged as an important species of bacteria related to serious infections acquired in the hospital for immunosuppressed patients, as well the patients of intensive care units. The goal of this study was to evaluate the minimum inhibitory concentration (MIC) of sodium hypochlorite disinfectant and antibiotic vancomycin against *E. faecalis* isolated from food. And, in parallel, to detect the presence of the gene *vanC-1*, associated with the intrinsic resistance to vancomycin by PCR. In the present study five *E. faecalis* isolated from chicken meat were used. To evaluate MIC to sodium hypochlorite, were tested the concentrations of 2.5; 3.0; 4.0; 5.0; 6.0; 7.0; 8.0; 9.0; 10.0 and 11.0% (v / v), and for vancomycin the concentrations were determined by NCCLS 2003. To investigate the presence *vanC-1* gene, total DNA was extracted from the sample and this sample was used as template on the PCR assay. The results showed that the broth microdilution technique for determining the MIC of sodium hypochlorite in the samples of *E. faecalis* isolated from food were not efficient, on the other hand to the vancomycin all isolates were susceptible (MIC 2,0 and 1,0 µg/mL) and the gene of resistance *vanC-1* was not detected in any of the five isolated from samples of chicken meat.

Keywords: Infection, Resistance, Biocides, *vanC-1*

Sumário

1. Introdução.....	10
2. Materiais e Métodos.....	13
2.1.Microrganismos.....	13
2.2.Preparação dos Inóculos.....	13
2.3.Avaliação da Susceptibilidade Microbiana frente ao Hipoclorito de Sódio.....	14
2.4.Avaliação da Susceptibilidade Microbiana frente à Vancomicina.....	14
2.5.Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detectar a presença do gene <i>van-C₁</i>	15
3. Resultados e Discussão.....	15
3.1.Avaliação da Susceptibilidade Microbiana frente ao Hipoclorito de Sódio.....	16
3.2Avaliação da Susceptibilidade Microbiana frente à Vancomicina.....	17
3.3.Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detectar a presença do gene <i>van-C₁</i>	20
4. Conclusão.....	21
Referências.....	22
Anexos.....	26
Anexo I.....	27

1.INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Enterococcus* servem de indicadores da qualidade higiênico sanitária dos alimentos. Elas fazem parte da microbiota do trato gastrointestinal de humanos e animais, sendo também isoladas de alimentos de origem animal e vegetal, na água, e no solo. Uma vez que estas bactérias são eliminadas através das fezes humanas ou de animais para o ambiente, elas podem contaminá-lo devido a sua capacidade de sobreviver em condições adversas (Veronesi, 1996; Giraffa, 2002). Os enterococos são microrganismos Gram-positivos que podem crescer em temperatura de 10 a 45°C, pH de 9,6 em 6,5% de solução salina, e que conseguem sobreviver a 60°C por 30 minutos (Veronesi, 1996; Paradella, 2007).

As bactérias Gram-positivas, como é o caso do gênero *Enterococcus* sp., são patógenos hospitalares que assumiram grande importância na microbiologia clínica (Rice, 2006). Há algum tempo, a espécie *Enterococcus faecalis* vem ganhando ampla importância, pois está relacionada a graves infecções adquiridas dentro do hospital por pacientes imunossuprimidos e pacientes das unidades de tratamento intensivo (Giraffa, 2002).

“As infecções nosocomiais podem resultar da microbiota endógena (microrganismos comensais normais da pele, trato respiratório, trato gastrintestinal, trato geniturinário), da reativação de agentes infecciosos latentes como *Mycobacterium tuberculosis*, por exemplo, ou de forma exógena de microrganismos presentes no ambiente. A fonte de um patógeno nosocomial é o lugar de onde o agente infeccioso passa para o hospedeiro, por contato direto ou indireto” (Rutala & Weber, 1997).

A resistência bacteriana a cada dia torna-se uma questão de saúde pública, e enterococos, um dos principais patógenos causadores de infecções hospitalares é o enterococo resistente à vancomicina (ERV) e a teicoplanina. O gênero *Enterococcus* apresenta resistência intrínseca a diversos antimicrobianos. A resistência à vancomicina ocorre pela produção de precursores de

peptideoglicano na parede celular que se ligam fracamente à vancomicina, impedindo sua ação no bloqueio da síntese de parede celular (Veronesi, 1996; Wannmacher, 2004; Furtado, 2005).

Embora tendo origens diferentes, a sensibilidade de enterococos à vancomicina e à teicoplanina é classificada clinicamente de maneira semelhante. As cepas que apresentam resistência à teicoplanina e vancomicina são classificadas como Van-A, as cepas que tem sensibilidade à teicoplanina, mas são sensíveis à vancomicina são classificadas como Van-B, e as cepas que apresentam baixa resistência à vancomicina, mas sensível à teicoplanina são classificadas como Van-C (Woodford, 1995; Silveira, 2006). O gene *vanC-1*, o qual codifica baixa resistência à vancomicina serve como gene marcador para a identificação de *Enterococcus gallinarum*. No entanto, em um estudo recente, encontrou-se o gene *vanC-1* em amostras de fezes de suínos doentes (Schwaiger, 2011). Através destes dados permite verificar a possibilidade de uma aquisição de resistência à vancomicina que antes era constitutiva, possa vir a se tornar uma resistência adquirida, onde, genes de resistência tenham uma transmissão horizontal para outras espécies.

A vancomicina, por muito tempo, foi tida como um poderoso antibiótico frente a bactérias Gram-positivas multirresistentes trazendo uma certa tranquilidade durante um período. No entanto, esta tranquilidade acabou quando surgiram as primeiras cepas de enterococos resistentes à vancomicina, conhecidos por ERV (Silveira, 2006). O uso indiscriminado e inadequado de antibióticos como promotores de crescimento em aves, ou indicação, seleção e prescrição equivocada de antibióticos utilizados na clínica médica, ocasionou a seleção de cepas ERV. Com a finalidade de diminuir a mortalidade de aves, ou então, melhorar o seu crescimento, os antibióticos são adicionados na ração destes animais como promotores de crescimento. Ao consumir produtos de origem animal, o ser humano pode estar adquirindo bactérias resistentes a antibióticos (Souza, 2012). Além disso, *Enterococcus* spp. têm sido frequentemente encontrados em animais de corte. Isto pode indicar que, através da cadeia alimentar, genes de resistência podem ser transferidos para a microbiota intestinal de humanos (Corrêa *et al.*, 2005).

O hipoclorito de sódio é um composto utilizado tanto como antisséptico, quanto como desinfetante químico, pois ele apresenta propriedades de desinfetante ideal, entre elas: antimicrobiano de amplo espectro, rápida ação bactericida, solubilidade em água, facilidade de uso, razoável estabilidade, baixa toxicidade e de baixo custo. O fator mais importante para controlar o grau de contaminação da carne fresca é sem dúvida a higienização dos locais de abate e de manipulação. No entanto, apesar do aumento e da sofisticação nos cuidados higiênicos, e na sanitização da superfície das carcaças, nessa superfície, muitas vezes, ainda são encontrados contaminantes patogênicos. A sanitização da carcaça pode ser incluída, como operação de rotina, no processo de abate de animais para consumo humano, no sentido de eliminar, ou pelo menos reduzir, a incidência desses contaminantes. Desinfetantes a base de hipoclorito de sódio são uns dos mais utilizados na indústria de alimentos para destruir microrganismos existentes em superfícies que entram em contato com os alimentos (Rutala & Weber, 1997). Operações realizadas como abate, arrefecimento em tanques de água, depena e evisceração de aves são fontes propícias para o desenvolvimento e, conseqüentemente, contaminação. O hipoclorito é um composto muito utilizado para a desinfecção de superfícies durante o abate e a manipulação da carne de frango (Negreiros, 2011).

A disseminação de doenças nosocomiais é evitada pela utilização de compostos conhecidos como biocidas (esterilizantes, conservantes, desinfetantes e antissépticos). Eles são parte importante das práticas de controle de infecções. Esses mesmos biocidas são usados para evitar a contaminação cruzada com patógenos de origem alimentar e na higiene pessoal de ambientes comunitários. Alguns estudos *in vitro* demonstraram que através de resistência adquirida ou por mecanismos intrínsecos, os microrganismos apresentam uma suscetibilidade reduzida frente aos biocidas e antibióticos. Esta resistência aos biocidas e aos antibióticos foi adquirida de forma semelhante pelos microrganismos quando expostos a estes compostos. Os microrganismos conseguiram se adaptar através de diferentes mecanismos de defesa (Sheldon Jr, 2005).

O objetivo deste estudo foi determinar a concentração inibitória mínima do hipoclorito de sódio e da vancomicina frente a linhagens de *E. faecalis* isoladas de carne de frango. E, em paralelo, detectar a presença do gene *vanC-1* associado com a resistência à vancomicina nos isolados.

2.MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Microrganismos

Foram utilizados no estudo cinco *Enterococcus faecalis* isolados (14, 19, 22, 24 e 27) de amostras de carne de frango selecionados da Bacterioteca do Instituto de Ciências Básicas da Saúde – UFRGS (Negreiros, 2011). E como controle para os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos foi utilizada uma cepa padrão de *E. faecalis* (*American Type Colection Culture - ATCC 29212*).

2.2. Preparação dos Inóculos

Primeiramente, os isolados de *E. faecalis* foram semeados em placa de ágar infusão de cérebro e coração BHI (Himedia Lab., Mumbai, India) e incubados em estufa bacteriológica a 37 °C por 24h. Posteriormente, foi feita a suspensão de uma raspagem de cada cultura com alça estéril em Solução Salina (0,85%) (Nuclear, Diadema, São Paulo) até atingirem a turbidez correspondente a 0,5 na Escala de Mac-Farland (10^8 UFC/mL) seguindo o NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003). O inóculo foi diluído na proporção de 1:10 em Solução Salina (0,85%) obtendo uma concentração final de 10^7 UFC/mL.

2.3. Avaliação da Susceptibilidade Microbiana frente ao Hipoclorito de Sódio

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de hipoclorito de sódio, os microrganismos foram submetidos à técnica de microdiluição em caldo (NCCLS, 2003).

O ensaio de microdiluição em caldo foi realizado em placas de poliestireno cristal para microtitulação de 96 poços, estéreis e com fundo em “U” (Zellkultur Testplatte 96F, Swetzerland). Em cada poço foi adicionado 0,1 µL de suspensão bacteriana (10^7 UFC/mL), caldo Mueller-Hinton (CMH) (Himedia Lab., Mumbai, India) e Hipoclorito de Sódio (12%) (Alpha Química Ltda, São Paulo, Brasil) em um volume final de 100µL. Foram testadas diferentes concentrações de

hipoclorito de sódio: 2,5; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0 e 11,0% (v/v). Foi realizado controle do meio e controle do inóculo (sem adição de hipoclorito). As placas foram incubada em estufa a 37 °C por 24 h.

A CIM foi definida como a maior diluição em que houve inibição do crescimento, ou seja, ausência de turvação, quando comparada com o controle positivo.

2.4. Avaliação da Susceptibilidade Microbiana frente à Vancomicina

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de vancomicina, os microrganismos foram submetidos à técnica de microdiluição em caldo (NCCLS, 2003).

Os testes foram realizados em placas de poliestireno cristal para microtitulação de 96 poços, fundo em “U” e estéreis. Em cada poço foram adicionados 1 µL de suspensão bacteriana (10^7 UFC/mL), caldo Mueller-Hinton e Vancomicina (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) em um volume final de 100 µL. Foram testadas diferentes concentrações de vancomicina, diluições seriadas de 64 a 0,125 µg/mL. Foi realizado controle do meio e controle do inóculo (sem adição de vancomicina). As placas foram feitas em duplicata e incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas.

A CIM foi definida como a maior diluição em que houve inibição do crescimento, ou seja, ausência de turvação, quando comparada com o controle bacteriano.

2.5. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detectar a presença do gene *vanC₁*

As amostras foram testadas para a presença de gene *vanC-1* utilizando o seguinte par de primers: VANC1-F (5'-GGTATCAAGGAAACCTC-3') e VANC2-R (5'-CTTCCGCCATCATAGCT-3') (Dukta-Malen *et al.*, 1992) que amplifica um fragmento de DNA de 822 pb. Como controle positivo para a reação, foi utilizado uma cepa positiva para o gene (CB361).

A extração de DNA das amostras foi feita por lise térmica. As reações da PCR foram otimizadas em 25 µL e continham 1X PCR Buffer 10X (Invitrogen[®]), 200 µM de desoxinucleotídeos (ABgene[®]),

1,5 mM MgCl₂ (Invitrogen[®]), 1.25 μM de cada primer (forward and reverse), 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen[®]) e completada com água deionizada (MilliQ plus, Millipore[®]).

As reações foram amplificadas em termociclador Eppendorf Mastercycler nas seguintes condições: 3 min a 94 °C; seguido por 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 54 °C e 1 min a 72 °C; e 5 min a 72 °C. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em tampão TAE pH 8,0 (40 mM Tris-HCl, 20 mM acetato de sódio, 1 mM EDTA) em gel de agarose 1,5 % (Invitrogen[®]) corado com brometo de etídio [0,5 μg/mL (Promega[®])] e comparado com marcador molecular de 100 pb Ladder (Fermentas[®]).

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação da Susceptibilidade Microbiana frente ao Hipoclorito de Sódio

O cloro é o desinfetante mais utilizado, tanto na forma de gás, quanto em combinações químicas. Os compostos clorados são mais práticos para uso e manuseio do que o cloro na forma de gás. Os mais utilizados são os hipocloritos de sódio e de cálcio. A atividade antimicrobiana do cloro é realizada pelo ácido hipocloroso formado quando se adiciona cloro livre à água (ao entrar em contato com a água os hipocloritos sofrem hidrólise, originando o ácido hipocloroso). O ácido hipocloroso, então, sofre uma nova reação, produzindo o oxigênio. Este oxigênio produzido é um agente oxidante poderoso que pode se combinar com proteínas celulares, e assim, inativar atividades biológicas importantes para a célula (Pelczar Jr., 1996).

A determinação da CIM pelo método de microdiluição em caldo mostrou que o hipoclorito de sódio frente à *E. faecalis* conseguiu eliminar totalmente a bactéria, inclusive no poço que continha o controle positivo do microrganismo. Na técnica de microdiluição em caldo, a placa de 96 poços é tampada ao final do procedimento e antes de levar para a incubação. O ambiente fechado pode ter contribuído para o confinamento do oxigênio, aumentando, assim, sua atividade bactericida. Segundo Butaye (1998), espécies que sobrevivem em ambientes anaeróbios necessitam de condições anaeróbias durante o experimento, é o caso das bactérias facultativas que habitam o intestino.

Segundo Rutala & Weber (1997) e Só *et al.* (2002) o hipoclorito tem uma ampla atividade bactericida, sendo o ácido hipocloroso não dissociado quando em soluções neutras ou ácidas e sob a forma de ânion hipoclorito quando em soluções alcalinas, é o responsável por tal atividade. A dissociação do ácido hipocloroso em íons hipoclorito (forma menos bactericida) depende do pH. Em um pH mais elevado, mais íons hipoclorito são formados e menor será a atividade bactericida.

Um estudo de análise comparativa entre desinfetantes e antibióticos contra isolados bacterianos em hospitais do Rio de Janeiro demonstrou a eficiência do hipoclorito de sódio. Vinte e

sete bactérias Gram-positivas e Gram-negativas obtidas da rotina clínica de hospitais do Rio de Janeiro, entre eles, o *E. faecalis* foram testadas. A susceptibilidade das amostras de enterococos foi verificada frente ao hipoclorito de sódio na concentração de 2% através da técnica dos cilindros carreadores. Os resultados demonstraram que o hipoclorito foi efetivo contra todas as classes de isolados hospitalares. No entanto, somente dois *Enterococcus* sp. foram analisados no estudo e mostraram susceptibilidade ao desinfetante, e, para uma melhor comparação deveria-se utilizar um número maior de isolados (Guimarães *et al.*, 2000).

Em outro estudo foi avaliada a susceptibilidade das amostras de enterococos isolados de carne de frango frente ao hipoclorito de sódio nas concentrações de 2,5 e 8,5% (v/v). Dos 22 isolados analisados, 5 apresentaram tolerância frente ao desinfetante nestas concentrações. E a concentração de 8,5% de NaOCl foi a que demonstrou melhores resultados frente ao antimicrobiano (Negreiros, 2011). A diferença entre estes estudos e o apresentado aqui, é que ambos empregaram a técnica dos cilindros carreadores e não a CIM.

Estes estudos fortalecem a ideia de que a técnica que mais se adapta ao estudo da susceptibilidade dos isolados *E. faecalis* ao hipoclorito de sódio é a técnica de cilindros carreadores, pois, foi esta técnica que apresentou os melhores resultados.

3.2. Avaliação da Susceptibilidade Microbiana frente à Vancomicina

No presente estudo a determinação da CIM para vancomicina pelo método da microdiluição em caldo observou-se que todos os isolados foram sensíveis ao antimicrobiano. A vancomicina demonstrou uma sensibilidade frente aos isolados alimentares de *Enterococcus faecalis* com CIM de 2,0 e 1,0 µg/mL. Os resultados estão demonstrados na Tabela 1:

Tabela 1: Concentração Inibitória Mínima de Vancomicina frente a isolados alimentares de *Enterococcus faecalis*

Isolados	Vancomicina CIM ($\mu\text{g/mL}$)*	Fenótipo*
ATCC (29212)	2	S
14	2	S
19	2	S
22	1	S
24	1	S
27	1	S

*Parâmetros de interpretação estabelecidos pelo CLSI/NCCLS M100-S15. (S: sensível = CIM \leq 4 $\mu\text{g/mL}$; I: intermediária = CIM 8-16 $\mu\text{g/mL}$ e R: resistente = CIM \geq 32 $\mu\text{g/mL}$)

Nas infecções causadas por enterococos, como endocardite e bacteremia, recomenda-se o uso de uma penicilina associada a um aminoglicosídeo. Portanto, para pacientes alérgicos ou que estão infectados com estirpes de enterococos resistentes a penicilina, recomenda-se o uso de vancomicina. A vancomicina é um bactericida seletivo contra bactérias Gram-positivas com a ação de inibir a síntese de peptidoglicano ao interagir com a porção terminal D-alanina-D-alanina das cadeias laterais de um pentapeptídeo encontrado em precursores do peptidoglicano. Somado a isto, a vancomicina consegue alterar a permeabilidade da membrana citoplasmática e inibir a síntese de RNA. Os microrganismos capazes de modificar geneticamente a síntese do aminoácido D-alanina-D-lactato no lugar do aminoácido D-alanina-D-alanina conseguem resistir à ação da vancomicina (Johnson *et al.*, 1990; Silveira *et al.*, 2006).

Kohner *et al.* (1997), realizaram um ensaio de comparação de diferentes métodos de análise para a susceptibilidade de *Enterococcus* sp. à vancomicina. Os métodos analisados foram: diluição em ágar, microdiluição em caldo, E-teste, difusão em disco e Método VITEK automatizado. Cem isolados de enterococos clínicos foram analisados, destes, 34 isolados eram de *E. faecalis*. A

susceptibilidade apresentada por *Enterococcus* sp. na microdiluição em caldo foi de 16 µg/mL quando utilizou-se BHI, e de 4 µg/mL quando o meio utilizado foi o Mueller-Hinton. Contudo, duas estirpes não conseguiram crescer em MH quando incubadas por 24 e 48 horas. Já, no caso do BHI, não houve falhas durante o crescimento bacteriano, parecendo mostrar um crescimento microbiano melhor e de mais fácil interpretação dos resultados. As características de desempenho de BHI e MH de crescimento foram comparadas para o método de microdiluição em caldo e o efeito do tempo de incubação de 24 ou 48 horas. Concluiu-se que o teste com BHI e um tempo de 24 horas de incubação apresentou os melhores resultados. Os resultados mais fracos ocorreram quando o meio usado foi o MH, este sim, recomendado pelo NCCLS. Os motivos para tais resultados estaria na diferença de composição dos meios de crescimento e o curto tempo de incubação muitas vezes utilizados. Sendo que, se os pontos críticos das categorias interpretativas do NCCLS (susceptível, susceptibilidade intermediária e resistente) fossem alterados para *Enterococcus* spp. com genes *vanC-1* que codificam baixos níveis de resistência à vancomicina, essas falhas poderiam ser diminuídas.

No estudo de Patel *et al.* (1997), 100 isolados clínicos de *Enterococcus* sp. de diversas fontes (sangue, urina, feridas, abscessos, esfregaços de garganta, líquido peritoneal, fezes, entre outros) foram analisados, quanto a susceptibilidade a vancomicina. A CIM foi determinada para concentrações de 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, e 256 µg/mL de vancomicina, sendo que as CIM foram determinadas após 24 horas de incubação a 35°C. O ensaio realizado forneceu uma alternativa rápida e específica para métodos fenotípicos usuais para a detecção de baixo nível de resistência à glicopeptídeo, como ocorre com o *vanC-1* de *Enterococcus gallinarum*. Durante o ensaio verificou-se que alguns isolados de *Enterococcus* clínicos apresentavam fragmentos de restrição com comprimentos diferentes daqueles dos organismos controles. Essa diferença confirmou-se com o sequenciamento de DNA, onde foi observada uma variação na sequência genética. Isto, poderia confirmar a hipótese de que a propagação de resistência à vancomicina de *Enterococcus* spp. ocorre também da transferência horizontal de genes de resistência. O estudo detectou o gene *vanC-1* em

duas estirpes de enterococos que com uma posterior análise fenotípica pareceu ser *E. faecalis* e *E. faecium*. E a CIM observada para os isolados com comprimento de fragmentos de restrição de padrões consistentes com *vanC-1* ou *vanC-2/3* foi de 4 a 8 µg/mL.

Já, em outro estudo, de *Enterococcus* isolados de ambientes de produção de aves comerciais, os isolados foram avaliados quanto ao seu perfil de sensibilidade frente a 17 antimicrobianos, entre eles a vancomicina. Foram utilizadas concentrações de 0,5 a 32 µg/mL de vancomicina. Ao final do ensaio não foram observados isolados de *E. faecalis* resistentes à vancomicina (Hayes *et al.*, 2004).

3.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detectar a presença do gene *vanC₁*

No presente estudo, dos cinco isolados alimentares foi feita a investigação do gene de resistência *vanC-1* das amostras de carne de frango através de PCR. O resultado obtido foi negativo para todos os isolados, como mostrado na Figura 1:

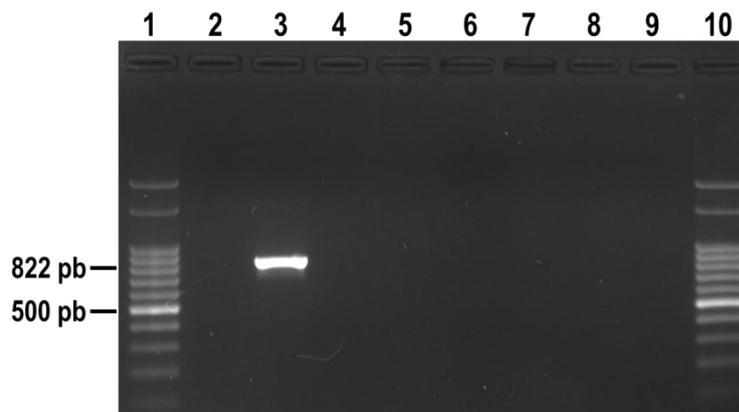


Figura 1. Amplificação do gene *vanC-1* de *Enterococcus faecalis* (822 pb). Linhas 1 e 10: Marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder [0.5 µg] (Fermentas); Linha 2: Controle branco; Linha 3: *E. faecalis* 114 (*vanC-1*); Linha 4: *E. faecalis* ATCC 29212; Linha 5: Isolado 14; Linha 6: Isolado 19; Linha 7: Isolado 22; Linha 8 Isolado 24, Linha 9: Isolado 27.

É forte a ideia de que com o uso excessivo de antibióticos utilizados como promotores de crescimento na ração animal tenha favorecido o surgimento de enterococos resistentes à

vancomicina e outros antimicrobianos em humanos, através do consumo de carnes e da manipulação destes animais (Lim, 2006; Cassenego, 2011).

Os enterococos são bactérias Gram-positivas que possuem uma resistência intrínseca a diversos antibióticos ao adquirirem genes de resistência por plasmídeos e transposons (Cassenego, 2011). O gene *vanC-1* codifica para um fenótipo de baixa níveis de resistência à vancomicina e serve como marcador para a identificação de *E. gallinarum*. No entanto, em um estudo recente, encontrou-se a presença do gene *vanC-1* em *E. faecalis* isolados de amostras de fezes de suínos doentes e que apresentavam uma CIM de 1µg/L. Neste estudo foi realizada uma triagem de *E. faecalis* isolados de fezes humanas e suínas para a presença do fenótipo de resistência para ampicilina e vancomicina, e uma investigação da presença de *pbp5* e *vanC-1*. Os resultados obtidos mostraram que, de todos os isolados coletados de fezes de suínos doentes, 4 eram susceptíveis à vancomicina (CIM de 1µg/L) e apresentavam o gene. A sequência posteriormente analisada por PCR confirmou o resultado (Schwaiger *et al.*, 2011). Mostrando, dessa forma, que a resistência à vancomicina pode ser adquirida. Ou seja, por serem habitantes naturais da microbiota intestinal de suínos, o *E. gallinarum* pode ter passado o gene *vanC-1* para o *E. faecalis*.

4.CONCLUSÃO

A técnica da microdiluição em caldo para determinação do CIM do hipoclorito de sódio nas amostras de *E. faecalis* isoladas de alimentos não se mostrou eficiente, por outro lado para a vancomicina, todos os isolados foram susceptíveis e não apresentavam o gene *vanC-1*. A resistência microbiana é um problema de saúde pública de ordem global. Há um esforço comum e concentrado de aperfeiçoar a desinfecção e esterilização de procedimentos para diminuir riscos de infecções dentro de hospitais e centros de saúde.

O uso abusivo e inadequado de antimicrobianos na clínica médica e como promotores de crescimento na produção de aves de corte tem favorecido cada vez mais a seleção de cepas resistentes de várias espécies bacterianas.

REFERÊNCIAS

Butaye P, Devriese LA, Haesebrouck, F. Effects of different test conditions on MICs of food animal growth-promoting antibacterial agents for enterococci. *J. Clin. Microbiol.*, 36(7): 1907-1911, 1998.

Cassenego APV. et al. Species distribution and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from broilers infected experimentally with *Eimeriaspp* and fed with containing different supplements. *Braz. J Microbiol.*, 42: 480-488, 2011.

Corrêa AA, Fuentefria DB, Corção G. Resistência a antimicrobianos em enterococos de amostras de fezes de suínos. *Acta Scientiae Veterinariae*, 33(2): 155-159, 2005.

Dutka-Malen S, Molinas C, Arthur M, Courvalin P. Sequence of the *vanC* gene of *Enterococcus gallinarum* BM4174 encoding a D-alanine:D-alanine ligase-related protein necessary for vancomycin resistance. *Gene*, 112(1): 53-58, 1992.

Estrela C, Estrela CRA, Barbin EL, Spanó JCE, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz. J Dent.*, 13(2): 113-117, 2002.

Furtado GHC, Martins ST, Coutinho AP, Soares GMM, Wey SB, Medeiros SEA. Incidência de *Enterococcus* resistente à vancomicina em hospital universitário no Brasil. *Rev. Saúde Pública*, 39(1): 41-46, 2005.

Giraffa G. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol. Immunol.*, 26: 163-171, 2002.

Guimarães MA, Tibana A, Nunes MP, Santos KRN. Disinfectant and antibiotic activities: a comparative analysis in Brazilian hospital bacterial isolates. *Braz. J Microbiol.*, 31: 193-199, 2000.

Hayes JR, English LL, Carr LE, Wagner DD, Joseph SW. Multiple-antibiotic resistance of *Enterococcus spp.* Isolated from commercial poultry production environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(10): 6005-6011, 2004.

Johnson AP, Uttley AHC, Woodford N, George RC. Resistance to vancomycin and teicoplanin: an emerging clinical problem. *Clin. Microbiol. Rev.*, 3(3): 280-291, 1990.

Kohner , PC, Patel R, Uhl JR, Garin KM, Hopkins MK, Wegener LT, Cockerill III FR. Comparison of agar dilution, broth microdilution, e-test, disk diffusion, and automated Vitek methods for testing susceptibilities of *Enterococcus spp.* to vancomycin. *J Clin. Microbiol.*, 35(12): 3258-3263, 1997.

Lim Suk-Kyung, Tanimoto K, Tomita H, Ike Y. Pheromone-responsive conjugative vancomycin resistance plasmids in *Enterococcus faecalis* isolates from humans and chicken feces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(10): 6544-6553, 2006.

NCCLS-National Committee for Clinical Laboratory Standards, 8^aed., 2003. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: maio de 2012.

Negreiros MO. *Estudo in vitro da ação de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio sobre Enterococcus faecalis*. 2011. Porto Alegre. Trabalho de Conclusão de Curso. Faculdade de Farmácia – UFRGS. Porto Alegre.

Paradella TC, Koga-Ito CY, Jorge AOC. *Enterococcus faecalis*: considerações clínicas e microbiológicas. *Rev.Odontol. UNESP*, 36(2): 163-168, 2007.

Patel R, Uhl JR, Kohner P, Hopkins MK, Cockerill III FR. Multiplex PCR detection of *vanA*, *vanB* *vanC-1*, and *vanC-2/3* genes in enterococci. *J Clin.Microbiol.*, 35(3): 703-707, 1997.

Pelczar Jr. MJ, Chan ECS, Krieg NR. *Microbiologia: Conceitos e Aplicações*, São Paulo: Editora Makron Books Ltda, 2^a ed., p. 216, 1996.

Revista Brasileira de Farmácia, Instruções para autores. 7 p. Disponível em: <http://www.rbfarma.org.br/index.php/instrucoes>. Acesso em: 05 jun. 2012

Rice LB. Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. *The American Journal of Medicine*, 119(6A): S11-S19, 2006.

Rutala WA, Weber DJ. Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities. *Clin.Microbiol. Rev.*, 10(4):597-610, 1997.

Schwaiger K, Bauer J, Hörmandosfer S, Mölle G, Preikschat P, Kämpf P, Bauer-Unkauf I, Bischoff M, Hölzel C. Presence of resistance genes *vanC1* and *pbp5* in phenotypically vancomycin and ampicillin susceptible *Enterococcus faecalis*. *Microbial Drug Resistance*, 00(0), 2012.

Sheldon Jr. AT. Antiseptic “resistance”: real or perceived threat. *Antimicrobial Resistance*, 2005.

Silveira GP, Nome F, Gesser JC, Sá MM. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. *Quím. Nova*, 29(4): 844-855, 2006.

Só MV R, Couto CM, Limongi O, Figueiredo J A P. Efeito da temperatura, luminosidade e forma de armazenamento na estabilidade da solução de hipoclorito de sódio a 1%. *Revista da Faculdade de Odontologia*, 43(2): 14-17, 2002.

Souza AVC, Cristina. Alternativas ao uso de promotores de crescimento em avicultura. Poli-Nutri – Nutrição Animal, Artigo Técnico. Disponível em: <<http://www.polinutri.com.br/upload/artigo/213.pdf>>. Acesso em: 01 jun. 2012.

Veronesi, RF. Tratado de Infectologia. São Paulo: Editora Atheneu, 1996.

Wannmacher L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida. *Uso Racional de Medicamentos – temas relacionados*, 1(4): 2004.

Woodford N, Johnson AP, Morrison D, Speller DCE. Current perspectives on glycopeptide resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8(4): 585-615, 1995.

ANEXOS

Anexo 1 – Normas técnicas da Revista Brasileira de Farmácia

REVISTA BRASILEIRA DE FARMÁCIA (RBF)

ESCOPO E POLÍTICA

A Revista Brasileira de Farmácia (RBF) (Brazilian Journal of Pharmacy - BJP) é um periódico da Associação Brasileira de Farmacêuticos, de publicação trimestral, cuja missão é publicar trabalhos originais de **PESQUISA** e **REVISÃO** de autores brasileiros e estrangeiros, relativos às Ciências Farmacêuticas e áreas afins. A RBF aceita artigos para publicação nos idiomas **português, inglês e espanhol**. Antes de enviar seu manuscrito para a **RBF** siga os passos abaixo, detalhadamente, para garantir a boa apresentação do trabalho e agilizar o processo editorial. As normas estão disponíveis na internet no endereço **http://www.rbfarma.org.br**. A revisão dos trabalhos é de inteira responsabilidade dos próprios autores. O Comitê Editorial não aprovará manuscritos incompletos, fora do escopo da revista e das instruções para os autores.

INSTRUÇÕES GERAIS

Todos os manuscritos devem ser originais e não publicados anteriormente. Submissão simultânea do mesmo trabalho não é recomendada. A RBF se destina a publicação de artigos de pesquisa e de revisão nos idiomas português, inglês e espanhol. Publicações em inglês e espanhol devem ser revisadas por um profissional de edição de língua estrangeira e não garantem o aceite do artigo. **O custo da revisão do texto em inglês ou espanhol é de responsabilidade dos autores que são encorajados a buscar profissionais ou empresas que fazem a revisão do inglês ou do espanhol.** A RBF reserva os direitos de submeter todos os manuscritos para revisores *ad hoc*, cujos nomes são confidenciais e com autoridade para decidir a aceitação ou declínio da submissão. Os

manuscritos revisados serão enviados pelos revisores ao Editor Chefe ou para os editores Associados, que transmitirão as sugestões para ao(s) autor(es). Todos os manuscritos envolvendo estudos em humanos ou animais devem ter autorização do **Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em Humanos ou em Animais**, da instituição a qual o(s) autor(es) pertence(m). Os formulários para pesquisas com seres humanos devem ser validados.

Deverá ser adotado o **Sistema Internacional (SI)** de medidas.

As equações deverão ser editadas utilizando *software* compatível com o editor de texto. As variáveis deverão ser identificadas após a equação.

Recomenda-se que os autores realizem a análise de regressão ou outro teste estatístico aplicável para fatores quantitativos.

A revista recomenda que pelo menos **oitenta por cento (80%) das referências** tenham menos de 5 anos. Não ultrapassar o número total de 30 referências (exceto para os artigos de revisão).

FORMATAÇÃO DO TEXTO

Os manuscritos podem ser escritos em português, inglês ou espanhol, utilizando aplicativos compatíveis com o *Microsoft Word*. Devem ser escritos em página formato A4 com margens de 2 cm, espaçamento duplo, fonte Times New Roman, tamanho 12, justificado. As linhas e páginas devem ser numeradas a partir do Título até a página final para facilitar o processo de revisão. **Os manuscritos devem ter no máximo 20 páginas.**

Deve-se adotar no texto apenas as **abreviações padronizadas**. A primeira citação da abreviatura entre parênteses deve ser precedida da expressão correspondente por extenso.

O **recurso de itálico** deverá ser adotado apenas para realmente destacar partes importantes do texto, como por exemplo, citações *ipsis literis* de autores no texto do manuscrito, partes de depoimentos, entrevistas transcritas, nomes científicos de organismos vivos e termos estrangeiros.

As ilustrações, figuras, esquemas, tabelas e gráficos deverão ser inseridos no texto, conforme apresentação desejada pelo autor.

Aceita-se para análise nos seguintes formatos:

1-Artigo Original: refere-se a trabalhos inéditos e originais de pesquisa científica e concluída, cujos resultados possam ser replicados e/ou generalizados. O manuscrito deve ser organizado da seguinte forma e ordem de apresentação no texto: Título, Resumo (Abstract)*, Palavras-chave (Keywords)*, Introdução*, Material e Métodos*, Resultados*, Discussão*, Agradecimentos (opcional)* e Referências*. O item Resultados pode ser combinado com a Discussão. * **OS ITENS COM ASTERISCO Devem ser digitados em negrito com letras maiúsculas.**

2-Artigo de Revisão: destinados à apresentação do progresso em uma área específica das Ciências Farmacêuticas, com o objetivo de dar uma visão crítica do estado da arte do ponto de vista do especialista altamente qualificado e experiente. É imprescindível que, na referida área, o autor tenha publicações que comprovem a sua experiência e qualificação. Antes do envio do manuscrito, o autor deverá submeter ao Conselho Editorial, por e-mail, um **resumo da revisão**, acompanhado de uma carta explicativa da pertinência do trabalho. **Atenção: os artigos de revisão não devem ter mais de 60 referências (se possível 80% das referências com menos de 5 anos).** O material será analisado pelos editores e, uma vez aprovado, será solicitado ao autor o envio do manuscrito completo, dentro das normas da RBF e, só então, será dado início ao processo de avaliação pelos assessores. O Conselho Editorial da RBF poderá, eventualmente, convidar pesquisadores qualificados para submeter Artigo de Revisão.

Os manuscritos deverão seguir a seguinte estrutura:

- **Título:** deverá ser conciso, informativo, digitado em negrito com letras minúsculas utilizando a fonte *Times New Roman*(tamanho 14), com exceção da primeira letra, dos nomes próprios e/ou científicos.
- **Autores:** deverão ser adicionados a um espaço abaixo do título, centralizados, separados por vírgula. O símbolo & deve ser adicionado antes do último autor (Ex.: Paulo da Paz, João de Deus & Pedro Bondoso). Inserir os nomes completos dos autores, por extenso, com letras minúsculas com exceção da primeira letra de cada nome.
- **Afiliação do autor:** cada nome de autor deverá receber um **número Arábico** sobrescrito indicando a instituição na qual ele é afiliado. A lista de instituições deverá aparecer imediatamente abaixo da lista de autores. O nome do autor correspondente deverá ser identificado com um asterisco sobrescrito. O e-mail institucional, endereço completo, CEP, telefone e fax do autor correspondente deverão ser escritos no final da primeira página.
- **Resumo (Abstract):** deverá ser escrito na **segunda página** do manuscrito, não deverá exceder 200 palavras, deverá conter informações sucintas sobre o objetivo da pesquisa, os métodos, os resultados e a conclusão. Os manuscritos escritos em português ou em espanhol devem ter um Resumo traduzido para o inglês, ou seja, um Abstract. O Abstract deve ser digitado na **terceira página** do manuscrito e deve ser revisado por um profissional de edição de língua inglesa.
- **Palavras-chave (Keywords):** são fundamentais para a classificação da temática abordada no manuscrito em bancos de dados nacionais e internacionais. Serão aceitas entre 3 e 5 palavras-chave que não estejam citadas no título. Após a seleção, sua existência em português e inglês deve ser confirmada pelo(s) autor(es) do manuscrito no endereço eletrônico <http://decs.bvs.br> (Descritores em Ciências da Saúde - Bireme). As palavras-chave (Keywords) deverão ser separadas por vírgula e a primeira letra de cada palavra-chave deverá maiúscula.

- **Introdução:** apresentar o problema de estudo, destacar sua importância e lacunas de conhecimento, com revisão da literatura (**referências antigas e atuais**); incluir objetivos e outros elementos necessários para situar o tema da pesquisa.
- **Material e Métodos:** incluir de forma objetiva e completa a natureza/tipo do estudo; dados sobre o local onde foi realizada a pesquisa; população/sujeitos do estudo e seus critérios de seleção; material; equipamentos; procedimentos técnicos e métodos adotados para a coleta de dados; tratamento estatístico/categorização dos dados; informar a data e o número do protocolo da aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa ou pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, para todos os trabalhos envolvendo estudos com humanos ou animais, respectivamente. Deverá ser encaminhado pelo e-mail uma cópia assinada desse documento. Todo material vegetal utilizado na pesquisa descrita no trabalho deve ter a indicação do seu local de coleta (dados de GPS), o país de origem, o responsável pela identificação da espécie e o depósito da exsicata.
- **Resultados e Discussão:** devem ser apresentados de maneira clara, objetiva e em seqüência lógica, utilizando ilustrações (figuras e tabelas) quando necessário. Deve-se comparar com informações da literatura sobre o tema ressaltando-se aspectos novos e/ou fundamentais, as limitações do estudo e a indicação de novas pesquisas.
- **Conclusões:** apresentar considerações significativas fundamentadas nos resultados encontrados e vinculadas aos objetivos do estudo.
- **Agradecimentos:** opcional e deverá aparecer antes das referências.
- **Referências:**

As citações bibliográficas deverão ser adotadas de acordo com as exigências da RBF. Citação no texto, usar o sobrenome e ano: Lopes (2005) ou (Lopes, 2005); para dois autores (Souza & Scapim, 2005); três ou mais autores, utilizar o primeiro autor seguido por *et al.* (Wayner *et al.*, 2007), porém na lista de referências deverão aparecer ordenadas alfabeticamente pelo **sobrenome do primeiro**

autor. A veracidade das referências é de responsabilidade dos autores. Os exemplos de referências citados abaixo foram adaptados, em sua maioria, do documento original da ABNT (NBR 6023, agosto de 2002).

a) Artigos de periódicos:

A abreviatura do periódico deverá ser utilizada, em itálico, definida no Chemical Abstracts Service Source Index (<http://www.cas.org/sent.html>) ou na Base de dados PubMed, da US National Library of Medicine (<http://www.pubmed.gov>), selecionando Journals Database. Caso a abreviatura autorizada de um determinado periódico não puder ser localizada, deve-se citar o título completo.

Autor (es)*. *Título do periódico em itálico*, volume (a indicação do fascículo é entre parênteses): páginas inicial - final do artigo, ano de publicação.

Galato D & Angeloni L. A farmácia como estabelecimento de saúde sob o ponto de vista do usuário de medicamentos. *Rev. Bras. Farm.* 90(1): 14 – 18, 2009.

Fonseca VM, Longobuco P, Guimarães EF, Moreira DL, Kaplan MAC. Um teste do formato de nome. *Rev. Bras. Farm.* 90(1): 14 – 18, 2009.

b) Livros:

• **Com 1 autor**

Autor. Título. Edição (a partir da 2^a). Cidade: Editora, ano de publicação. Número total de páginas.

Casciato DA. Manual de oncologia clínica. São Paulo: Tecmed, 2008. 1136 p.

• **Com 2 autores**

Lakatos EM & Marconi MA. Metodologia científica. 2. ed. São Paulo: Atlas, 1991. 231 p.

- **Com autoria corporativa**

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. I Fórum Nacional de Educação Farmacêutica: O farmacêutico de que o Brasil necessita (Relatório Final). Brasília, DF, 2008. 68p.

- **Capítulos de livros (o autor do capítulo citado é também autor da obra):**

Autor (es) da obra. Título do capítulo. *In:* _____. Título da obra. Cidade: Editora, Ano de publicação. Capítulo. Paginação da parte referenciada.

Rang HP, Dale MM & RITTER JM. *In:* Quimioterapia do câncer. Farmacologia. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. cap. 50, p. 789-809.

- **Capítulos de livros (o autor do capítulo citado não é o autor da obra):**

Autor (es) do capítulo. Título da parte referenciada. *In:* Autor (es) da obra (ou editor) Título da obra. Cidade: Editora, Ano de publicação. Capítulo. Paginação da parte referenciada.

Schenkel EP, Gosmann G & Petrovick PR. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. *In:* Simões CMO. (Org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2003. cap. 15, p. 371-400.

- **Citação indireta**

Utiliza-se *apud* (citado por) nas citações que foram transcritas de uma obra de um determinado autor, mas que na verdade pertence a outro autor.

Helper CD & Strant LM. Opportunities and responsibilities in pharmaceutical care. *Am. J. Hosp. Pharm.* 47: 533-543, 1990. *Apud* Bisson MP. Farmácia Clínica & Atenção Farmacêutica. 2. ed. Barueri: Manole, 2007. p. 3-9.

c) Teses, Dissertações e demais trabalhos acadêmicos:

Autor. *Título* (inclui subtítulo se houver). Ano. Cidade. Total de páginas. Tipo (Grau), Instituição (Faculdade e Universidade) onde foi defendida.

Sampaio IR. *Etnofarmacologia e toxicologia de espécies das famílias Araceae e Euphorbiaceae*. 2008. Rio de Janeiro. 45 p. Monografia (Especialização em Farmacologia), Associação Brasileira de Farmacêuticos. Rio de Janeiro.

d) Eventos científicos (Congressos, Seminários, Simpósios e outros):

Autor (es). Título do trabalho. *Nome do evento*, nº do evento. Página. Cidade. País. Ano.

Marchioretto CT, Junqueira MER & Almeida ACP. Eficácia anestésica da neocaína (cloridrato de bupivacaína associada a epinefrina) na duração e intensidade da anestesia local em dorso de cobaio. *Reunião anual da SBPC*, 54, Goiânia, Brasil, 2002.

e) Patentes: Devem ser identificadas conforme modelo abaixo e na medida do possível o número do Chemical Abstracts deve ser informado.

Ichikawa M, Ogura M & Lijima T. 1986. Antiallergic flavone glycoside from *Kalanchoepinnatum*. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 61,118,396,apud* Chemical Abstracts 105: 178423q.

f) Leis, Resoluções e demais documentos

Conforme o modelo:

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 44, de 17 de agosto de 2009.

g) Banco/Base de Dados

Conforme o modelo

BIREME. Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde. Lilacs - Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde. Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&base=LILACS&lang=p>>. Acesso em: 27 ago. 2009.

h) Homepage/Website

Conforme o modelo:

WHO *Guidelines for Pharmacological Management of Pandemic (H1N1) 2009 Influenza and other Influenza Viruses*. 91 p. Disponível em: <http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1_guidelines_pharmaceutical_mngt.pdf>. Acesso em agosto de 2009.

TABELAS E FIGURAS

Tabelas devem apresentar um título breve e serem numeradas consecutivamente com Algarismos Arábicos, conforme a ordem em que forem citadas no manuscrito. As Tabelas devem apresentar dados numéricos como informação central, e não utilizar traços internos horizontais ou verticais. As notas explicativas devem ser colocadas no rodapé da tabela, com os seus respectivos símbolos. No manuscrito devem ser digitadas como Tabela 1 (Times New Roman, tamanho 12, espaçamento duplo, justificado). Se houver ilustração extraída de outra fonte, publicada ou não, a fonte original deve ser mencionada abaixo da tabela. Figuras devem apresentar um título breve e serem numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, conforme a ordem em que forem citadas no manuscrito. As Figuras deverão ser digitadas como Figura 1, conter legenda em Times New Roman, tamanho 12, justificado e com largura máxima de 8,25 cm. Não colocar, no manuscrito,

Figura publicada em outro periódico sem antes pedir autorização prévia dos autores e/ou da revista. Figuras com baixa resolução devem ser evitadas. **Manuscritos com Figuras com resolução ruim não serão aceitos para revisão.** As fotos deverão evitar a identificação de pessoas. Caso os autores queiram apresentar fotos com identificação pessoal, deverão apresentar permissão específica e escrita para a publicação das mesmas.

ANEXO - LEI Nº 9.610, DE 19 DE FEVEREIRO DE 1998
BRASIL. Lei 9.610, de 19 de fevereiro de 1998. Altera, atualiza e consolida a legislação sobre direitos autorais e dá outras providências. Disponível em <http://www.planalto.gov.br/ccivil/leis/19610.htm>