

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO AMAZONAS
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

EFEITOS DO TRATAMENTO COM EXTRATOS VEGETAIS ORIUNDOS DA
VEGETAÇÃO AMAZÔNICA: AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO
COMPOSTO $\alpha\beta$ -AMIRONA EM MODELOS DE INFLAMAÇÃO TÓPICA

Bolsista: Natália Santos Ferreira, FAPEAM

MANAUS

2014

EFEITOS DO TRATAMENTO COM EXTRATOS VEGETAIS ORIUNDOS DA
VEGETAÇÃO AMAZÔNICA: AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO
COMPOSTO $\alpha\beta$ -AMIRONA EM MODELOS DE INFLAMAÇÃO TÓPICA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB-B/0077/2013

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO COMPOSTO $\alpha\beta$ -AMIRONA
EM MODELO DE INFLAMAÇÃO TÓPICA

Bolsista: Natália Santos Ferreira

Orientadora: Prof^a Dr^a Geane Antiques Lourenço

MANAUS

2014

Todos os direitos desse relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Departamento de Ciências Fisiológicas/Farmacologia e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa no Amazonas - FAPEAM, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi desenvolvida pelo Departamento de Ciências Fisiológicas/Farmacologia e se caracteriza como sub projeto do projeto de pesquisa Etnofarmacologia do Amazonas.

RESUMO

Introdução: Modelos in vivo de inflamação são definitivamente as melhores ferramentas para o estudo de seu papel biológico, porque nenhuma outra abordagem permitirá a investigação simultânea de células e mediadores que interajam durante o processo inflamatório. Diversos relatos na literatura demonstraram a eficácia de $\alpha\beta$ -amirina, o componente principal da resina vegetal do gênero *Protium* em estudos com modelos in vitro de inflamação. Outro componente desta resina com atividade anti-inflamatória é o $\alpha\beta$ -amirona, sendo este menos estudado.

Objetivo: Avaliar a atividade anti-inflamatória tópica do composto isolado $\alpha\beta$ -amirona e do fitoterápico *Passiflora nítida* em modelos de inflamação da pele em camundongos.

Métodos: Foram utilizados camundongos machos da linhagem Balb-c pesando 30 - 35 g divididos em 8 grupos (controle de fenol, tratados com o extrato nas concentrações de 0,6; 0,3; e 0,1 mg / orelha, tratados com *passiflora nítida* nas concentrações de 0,6; 0,3; e 0,1 mg / orelha e controle tratado com dexametasona). O edema foi induzido pela aplicação tópica de 10% de fenol em acetona (20 ml / orelha) sobre a orelha direita de todos os grupos. A dexametasona (0,1 mg / orelha) foi utilizado como controle positivo, o extrato e o fitoterápico foram aplicadas imediatamente após o fenol. A orelha esquerda de cada animal foi usada como um controle para a avaliação do edema. Uma hora após o tratamento, os animais foram anestesiados com 80mg/kg de tiopental e sacrificados por injeção intracardíaca de cloreto de potássio 3M, círculos de 5 milímetros foram extraídos das suas orelhas com o auxílio de um punsh e pesadas numa balança analítica. A avaliação do edema foi feita como a diferença de peso das amostras de tecido.

Resultados: Os grupos de animais que receberam tratamento com solução tópica de $\alpha\beta$ -amirona ou *Passiflora nítida*, em todas as doses, exibiram uma diminuição no edema induzido por fenol quando comparado com o grupo controle. A diminuição do edema ocorreu de forma semelhante aos dados do controle positivo dexametasona.

Conclusões: Os compostos $\alpha\beta$ -amirona e *Passiflora nítida*, apresentaram ação anti-inflamatória tópica no modelo de edema de orelha induzido por fenol em camundongos, com potência semelhante a dexametasona.

ABSTRACT

Introduction: *in vivo* models of inflammation are definitely the best tools to study the biological role, because no other approach will allow the simultaneous investigation of cells and mediators that interact during the inflammatory process. Several reports in the literature have shown the efficacy of α , β -amyrin, the main component of the resin plant of the genus *Protium* in studies with *in vitro* models of inflammation. Another component of this resin with anti-inflammatory activity is the $\alpha\beta$ -amirone, but this is still less studied.

Objective: To assess the topical anti-inflammatory activity of the isolated compound $\alpha\beta$ -amirone and herbal *Passiflora nitida* model of skin inflammation in mice.

Methods: Male mice of strain BALB-c were used weighing 30 - 35 g divided into 8 groups (control phenol, treated with the concentrations of 0.6, 0.3, and 0.1 mg / ear, treated with *passiflora nitida* in concentrations of 0.6, 0.3, and 0.1 mg / ear and control treated with dexamethasone). Edema was induced by topical application of 10% phenol in acetone (20 μ l / ear) on the right ear of all groups. Dexamethasone (0.1 mg / ear) was used as positive control, and the herbal extract were applied immediately after the phenol. The left ear of each animal was used as a control for assessment of edema. One hour after treatment, animals were anesthetized with 80mg/kg of pentobarbital and sacrificed by intracardiac injection of 3M potassium chloride 5 mm circles were taken from their ears with the aid of a biopsy punch and weighed on an analytical balance. Evaluation of edema was taken as the difference in weight of the tissue samples.

Results: The groups of animals that were treated with topical solution $\alpha\beta$ -amirone or *Passiflora nitida*, at all doses, showed a decrease in phenol induced edema compared with control group. The fall of edema was similar to the data of the positive control dexamethasone.

Conclusions: The $\alpha\beta$ -amirone and *Passiflora nitida*, compounds showed topical anti-inflammatory ear edema model induced by phenol in mice, with similar dexamethasone power action.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Adaptado de Freinkeil e Woodley, 2001----- 10
- Figura 2** – Resultado da reversão do edema tópico induzido por fenol após adm de dexametasona ou $\alpha\beta$ -amirona em diferentes doses----- 17
- Figura 3** - Resultado da reversão do edema tópico induzido por fenol após adm de dexametasona ou *Passiflora nítida* em diferentes doses----- 18

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1- A Pele e o Processo Inflamatório	10
1.2- Uso de Plantas Medicinais	12
1.3- $\alpha\beta$ -amirona	13
1.4- <i>Passiflora nítida Kunth</i>	13
1.5- Modelos para Estudo do Processo Inflamatório	14
2. DESENVOLVIMENTO	14
2.1- Fundamentação teórica	14
2.2- Descrição Metodológica	15
2.2.1- Sujeitos Experimentais	15
2.2.2. Avaliação do Edema	15
2.2.3 Avaliação do Edema de Orelha Induzido pela Aplicação Tópica de Fenol	16
2.2.4 Avaliação do Edema de orelha após o tratamento com <i>Passiflora nítida Kunth</i>	16
2.2.5 Análise estatística	16
2.3 Resultados e Discussões	17
3. CONCLUSÕES	19
4. REFERÊNCIAS	20
5. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	23

Introdução

1.1- A Pele e o Processo Inflamatório

A pele é o maior órgão do corpo humano e é responsável por quatro funções principais: a homeostasia endógena, quando, por exemplo, regula a temperatura corporal, o metabolismo, ao produzir algumas vitaminas importantes como a vitamina B, a sensação do tato, e ainda pela proteção contra ameaças externas e perda de água. Por estar em contato direto com o meio ambiente, a principal função da pele é proteger o organismo de possíveis agressões formando, portanto uma barreira entre os órgãos internos e o meio externo. A pele é ainda o componente periférico do sistema imune, sendo capaz de iniciar uma resposta imune primária frente a um patógeno. É na verdade um órgão complexo que envolve diversos tipos celulares e estruturas (figura 1), estando esses divididos em três camadas principais: epiderme, derme e hipoderme que é a camada de tecido adiposo (DEBENEDICTIS et al., 2001; MAKRANTONAKI e ZOUBOULIS, 2007; SPELLBERG, 2000).

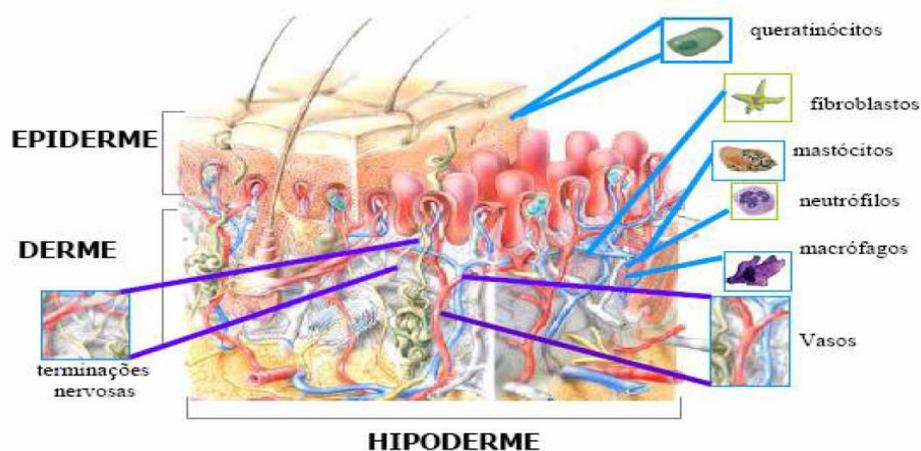


Figura 1- Adaptado de Freinkeil e Woodley, 2001

Uma pele saudável é capaz de se renovar normalmente como todos os outros órgãos do organismo, e ainda tem uma grande capacidade de autorregeneração quando sofre lesões. Como a manutenção de sua integridade é indispensável para o desempenho de suas funções em condições ótimas, ela própria possui um mecanismo que em condições normais e através da renovação constante de células das camadas mais profundas, assegura a manutenção de sua estrutura normal (ROCHE, 2005). O sistema imune de uma pele normal age constantemente de maneira a protegê-la de infecções e de possíveis descontroles nos processos fisiológicos normais, além de, remover células danificadas e fazer a prevenção de reações autoimunes (BENNETT et al., 2008). Para tanto, as células teciduais residentes são especializadas em produzir substâncias que irão desencadear uma resposta inflamatória, caso seja necessário, no intuito de restabelecer a fisiologia normal da pele (DEBENEDICTIS et al., 2001). Após uma lesão tecidual é iniciada uma cascata de eventos que irão mediar a reparação tecidual e o reestabelecimento da função protetora da pele. A resposta inflamatória é um processo no qual o corpo utiliza o sistema imune para agir contra possíveis patógenos e pode ser definida como uma sequência de eventos que ocorrem em resposta a um estímulo nocivo, um trauma ou

infecção. Esses eventos são dirigidos pela interação entre células e mediadores inflamatórios (CALIXTO et al., 2004; FREINKEL e WOODLEY, 2001). Entretanto, essa resposta é muito mais complexa e sofisticada do que se imaginou a princípio e é caracterizada pela ativação coordenada de várias vias de sinalização que regulam a expressão tanto de mediadores pró quanto anti-inflamatórios, ambos apresentando importantes funções na mediação desse processo (LAWRENCE e GILROY, 2007). A mobilização dessas vias gera fenômenos que refletem no surgimento dos sinais cardinais da inflamação, que são dor, eritema, aumento da temperatura local e edema, como uma resposta aguda ao processo inflamatório estabelecido (SMITH et al., 1998)

A inflamação aguda é caracterizada pelo recrutamento de diversos componentes do sangue que deixam o espaço intravascular de forma a ocupar o interstício onde vão desempenhar suas principais funções nas sucessivas fases da resposta inflamatória. Assim cabe ao endotélio vascular mediar, de forma bidirecional, a interação entre o fluxo sanguíneo e o interstício que é o local onde ocorre o processo inflamatório propriamente dito. Classicamente, essa interação é definida pela passagem inicial de granulócitos polimorfonucleares (PMN) atraídos por mediadores inflamatórios liberados no local da lesão (ALLER et al., 2006; LAWRENCE e GILROY, 2007). Mediadores derivados de macrófagos como, fator de necrose tumoral (TNF) e quimiocinas, irão atrair mais neutrófilos para o local, assim como ativá-los. Esses mediadores, especialmente TNF- α e Interleucina (IL)-1 β combinam-se ainda com outros como, prostaglandina E2 (PGE2) derivada de mastócitos e defensinas derivadas dos neutrófilos para recrutar linfócitos enquanto que os leucotrienos atraem células dendríticas apresentadoras de antígeno. Os linfócitos por sua vez irão promover a ativação de macrófagos, levando-os a secretar proteases, eicosanóides, citocinas, NO e espécies reativas de oxigênio, os quais irão ativar outras células formando assim um ciclo de recrutamento e ativação celular (NATHAN, 2002). As cininas também são importantes mediadores os quais promovem a liberação de citocinas como interleucina (IL)-1 e TNF, e a geração de mediadores como PG e LT, auxiliando no início e na manutenção da reação inflamatória (COUTANT e RYDER, 1996; CALIXTO et al., 2000; BHOOLA et al., 1992).

Quando os processos de fagocitose, recirculação e apoptose ocorrem de maneira correta e coordenada, a inflamação se resolve e a reparação tecidual é alcançada com sucesso. Entretanto, é necessária a perfeita interação entre a ação dos mediadores pró e anti-inflamatórios, caso contrário, podem surgir doenças inflamatórias, e na pele este processo não é diferente (Pietrovski et al., 2008). As doenças de pele podem ser desencadeadas tanto por estímulos endógenos como mutações gênicas, quanto por estímulos exógenos como a exposição a agentes irritantes. São diversos os tipos de doenças cutâneas as quais são geralmente marcadas por características como interrupção da barreira e conseqüente perda da função de proteção, inflamação, sensibilização e alterações no padrão de proliferação e diferenciação de queratinócitos (PROKSCH et al., 2008).

A maior parte das doenças inflamatórias cutâneas ainda não possui sua etiologia e fisiopatologia bem definidos. Essa falta de informação prejudica principalmente o tratamento dessas doenças. Atualmente os tratamentos terapêuticos disponíveis não são totalmente eficazes, sendo que aqueles que promovem melhoras no quadro do paciente promovem também uma gama de efeitos indesejáveis. Assim, a busca por novas estratégias que se mostrem seguras e eficazes em prevenir a formação de edema, o extravasamento plasmático e o recrutamento de mediadores inflamatórios é um caminho promissor para se encontrar terapias adequadas no combate de reações inflamatórias excessivas (SEELIGER et al., 2003; MAN et al.,

2008). Uma alternativa interessante nessa busca por novas terapias seria a utilização de plantas medicinais.

1.2. Uso de Plantas Medicinais

A bioprospecção dos recursos naturais disponíveis em nosso país guarda um manancial extraordinário de compostos capazes de alterar o curso da história médica mundial, através da conversão das práticas populares do uso destes recursos terapêuticos, em ciência para geração de novos medicamentos. O uso de plantas no tratamento e na cura de patologias é mais antigo que a espécie humana, pois muitos animais já utilizavam instintivamente esse recurso antes do homem surgir sobre a Terra. Mesmo hoje em dia o conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades. No Brasil, desde as regiões mais pobres do país até os grandes centros, podemos encontrar plantas medicinais sendo cultivadas nas residências, comercializadas em feiras livres, mercados populares e em bancas montadas nas calçadas dos centros urbanos.

As plantas constituem-se num enorme laboratório de síntese orgânica, fruto de milhões de anos de evolução e adaptação sobre a Terra. Nas últimas décadas esse manancial de moléculas distintas e complexas começou a se desvendar, devido à evolução dos métodos de análise e separação destes compostos. Historicamente, o desenvolvimento da química orgânica ocorreu paralelamente ao estudo de plantas, principalmente a partir do século XIX, quando foram registrados os primeiros estudos sobre plantas com bases científicas (Montanari e Bolzani, 2001).

Entre os diversos exemplos de substâncias oriundas de plantas e atualmente importantes para terapêutica podemos mencionar a atropina, os digitálicos, a morfina, a codeína, a escopolamina, a reserpina, dentre outros; mais recentemente ainda temos a “forscolina” obtida de *Corleus barbatus*, que apresenta promissores efeitos contra hipertensão, glaucoma, asma e certos tumores (Valdés, et. al., 1987), a “artemisinina”, presente em *Artemisia annua*, que exerce potente atividade antimalárica (Salcedo, et. al., 1997), e o anticancerígeno “taxol”, isolado de plantas do gênero *Taxus*, que já se encontra disponível no mercado farmacêutico (Kingston, 1991).

Muitos são os exemplos de princípios ativos de plantas com ações nos mais diversos sistemas biológicos, porém a disponibilidade desses extratos em formulações comerciais ainda é um desafio e ser conquistado. O mercado farmacêutico mundial movimentou em 2008 mais de US\$ 700 bilhões e estima-se que até 2014 esse valor atinja US\$ 1,1 trilhão, sendo a maior parte do crescimento na demanda proveniente de países em desenvolvimento (Sccaro-Junior, 2011). Apesar desse grande incentivo monetário falta fomento em pesquisa básica para que os resultados, hora gerados de forma discreta nos centros de pesquisa, saiam das Universidades e se tornem produtos finais com uso comercial. O avanço tecnológico e científico no estudo de plantas medicinais se faz evidente pela crescente descoberta de novos compostos com propriedades terapêuticas e pelo aumento de trabalhos publicados nesta área, tanto em congressos como em periódicos nacionais e internacionais, além do surgimento de novos periódicos específicos sobre produtos naturais ativos, como *Phytomedicine*, *Phytochemical Analysis*, *Natural Product Letter*, entre outros (Cechinel-Filho e Yunes, 1998). Outro indicativo do poder contido na biodiversidade das florestas tropicais é o crescente interesse de outros países em pesquisar estes recursos. No período de 1986 a 2006 os centros de pesquisa e

pesquisadores dos Estados Unidos publicaram 4.852 trabalhos sobre bioprospecção, sendo que no mesmo período o Brasil publicou apenas 353 artigos (De Lima, et al., 2006). Esse fato deixa claro que apesar de possuímos 10% da biodiversidade descrita e catalogada em âmbito mundial (Rezende e Ribeiro, 2005), ainda não atentamos para essa riqueza contida em nosso “quintal”. A grande contradição, desta busca por substâncias bioativas nos recursos naturais, é que os países desenvolvidos detêm a tecnologia, mas são os países em desenvolvimento que possuem a biodiversidade necessária para efetivar esses estudos.

1.3- $\alpha\beta$ -amirina

O processo inflamatório pode ser melhorado e até mesmo impedido pelo uso de fitoterápicos. A origem das propriedades anti-inflamatórias pode ser explicada pela presença de substâncias inibidoras de alvos moleculares e de mediadores pró-inflamatórios. Exemplos são os fitoestrogênios, flavonoides, fitoesterol, tocoferol, entre outros. (IWALEWA *et al.*, 2007).

Diversos relatos da literatura têm mostrado a eficácia da $\alpha\beta$ -amirina, principal componente da resina de plantas do gênero *Protium* em estudos com modelos de inflamação. (MEDEIROS *et al.*, 2007). Outro componente é a $\alpha\beta$ -amirina, ainda pouco estudada.

O gênero *Protium* pertence à subfamília *Protieae*, da família *Burseraceae* (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Ele possui aproximadamente 135 espécies, amplamente distribuídas na América do Sul (SIANI *et al.*, 1999; SIANI *et al.*, 2004; KHALAD, 1893). Todas as espécies de *Protium* exsudam por incisão do tronco um óleo-resina branco esverdeado, que endurece em contato com o ar, denominado almecega, breu-branco e breu burceráceas. É um tipo de incenso e suas propriedades são similares aos seus análogos obtidos de árvores da mesma família da Índia e da África. (PARNET, 1972).

Quimicamente, a resina é formada por uma mistura de 30% de protamirina, 25% de protelemica e 37,5% de proteleresina (SCHULTES; RAFFAUF, 1990), constituídas de triterpenos, principalmente das séries oleano, ursano e eufano, com óleo essencial rico em compostos mono e sesquiterpênicos (CRAVEURI *et al.*, 1981). Essa resina é um agente curativo eficaz, dotado de propriedades analgésicas e anti-inflamatórias (SIANI *et al.*, 1999). Os componentes desta resina são misturas isoméricas de triterpenos pentacíclicos, denominados α -amirina, β -amirina, α -amirina, β -amirina, breína e maniladiol (VIEIRA *et al.*, 2005).

São extensos os trabalhos com $\alpha\beta$ -amirina. Porém os outros compostos presentes na resina ainda permanecem pouco estudados, como a $\alpha\beta$ -amirina.

1.4- *Passiflora nítida* Kunth

Várias espécies do gênero *Passiflora*, denominadas popularmente como maracujá, são empregadas extensivamente na medicina popular em muitos países, sob diversas formas farmacêuticas. A *Passiflora nítida* cresce espontaneamente em vegetação secundária, beira de rios e estradas e seus frutos são consumidos in natura pela população local da Região Amazônica (Hopkins e Souza, 1999). Não existem estudos sobre a ação dessa espécie vegetal sobre o sistema nervoso central, porém outras espécies do mesmo gênero são amplamente utilizadas com comprovado efeito ansiolítico, sedativo, anti-inflamatório, antinociceptivo, antihipertensivo (Di Strasi, et. al., 2002; Dhawan e Sharma, 2002, 2003). Como exemplo

podemos citar a *Passiflora incarnata*, que atua ao nível da medula espinhal, provavelmente por interação com receptores das endorfinas naturais, diminuindo os estímulos externos que chegam ao SNC. É utilizada eficazmente em crise de ansiedade, insônia e hiperexcitabilidade nervosa induzindo a um sono próximo do fisiológico, sem causar a depressão psíquica e a lentidão dos reflexos, comuns aos hipnóticos e tranquilizantes (Dhawam, et. al., 2004).

1.5- Modelos para Estudo do Processo Inflamatório

Os modelos *in vitro* de inflamação geralmente são células isoladas estimuladas com agentes patogênicos. Na prática os macrófagos são as células mais estudadas nesse tipo de modelo experimental. Considerando a grande heterogeneidade entre diferentes populações de macrófagos, é essencial investigar macrófagos específicos de acordo com o sítio de inflamação. O isolamento de macrófagos peritoneais em animais de laboratório é um procedimento relativamente simples, sendo conhecido como cultura primária. Sua principal desvantagem é o baixo rendimento, que requer um grande número de animais para se obter o número de células adequado. Uma alternativa para esse procedimento são as linhagens celulares disponíveis comercialmente, cujas as características se assemelham as encontradas nas células de cultura primária (Knapp, 2009).

Em resposta à ativação por mediadores inflamatórios, os macrófagos aumentam o seu conteúdo enzimático e a secreção de produtos biologicamente ativos no meio extracelular. Entre os numerosos produtos secretados estão as espécies reativas de oxigênio (ROS) (ex. peróxido de hidrogênio), e espécies reativas de nitrogênio (RNS) (ex. óxido nítrico) (Friedl et al, 2004). Desta forma extratos ou compostos isolados de plantas podem ser testados quanto a sua capacidade em inibir a ativação de macrófagos e conseqüentemente inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias.

Modelos *in vivo* de inflamação são definitivamente as melhores ferramentas para estudar o papel biológico, porque nenhuma outra abordagem permitirá a investigação simultânea de células e mediadores que interagem durante o processo inflamatório. O modelo de edema de orelha é bastante útil na avaliação da atividade anti-inflamatória tópica de compostos, uma vez que é uma metodologia bastante simples e que permite verificar a atividade de compostos no edema induzido por diferentes agentes irritantes, e ainda identificar compostos que tenham a capacidade de penetrar na pele (GARBOR, 2000).

Desenvolvimento

2.1 Fundamentação teórica

As plantas foram por muito tempo, e continuam sendo até os dias atuais, a base de muitos sistemas medicinais tradicionais no mundo todo, como homeopatia, fitoterapia e outros sistemas de medicina alternativa. Além disso, as plantas medicinais são uma das melhores e mais efetivas fontes de compostos candidatos a novas classes de medicamentos, já que representam fontes riquíssimas de diversidade natural ao considerarmos a amplitude dos compostos que sintetizam, muitos dos quais têm se mostrado útil na terapêutica para tratar uma variedade de doenças e males humanos. O conhecimento medicinal tradicional, junto a técnicas

modernas têm acelerado o processo de descoberta de drogas derivadas de plantas. Todas as espécies de *Protium* exsudam por incisão do tronco um óleo-resina branco esverdeado, que endurece em contato com o ar, denominado almecega, breu-branco e breu burceráceas. Quimicamente, a resina é formada por uma mistura de 30% de protamirina, 25% de protelemica e 37,5% de proteleresina (SCHULTES; RAFFAUF, 1990), constituídas de triterpenos, principalmente das séries oleano, ursano e eufano, com óleo essencial rico em compostos mono e sesquiterpênicos (CRAVEIRO *et al.*, 1981). Essa resina é um agente curativo eficaz, dotado de propriedades analgésicas e anti-inflamatórias (SIANI *et al.*, 1999). Os componentes desta resina são misturas isoméricas de triterpenos pantacíclicos, denominados α -amirina, β -amirina, α -amirona, β -amirona. Breína e maniladiol (VIEIRA *et al.*, 2005). Vários relatos da literatura têm mostrado a eficácia da $\alpha\beta$ -amirina em estudos com modelos de inflamação, porém a literatura com $\alpha\beta$ -amirona é escassa. Esse composto, $\alpha\beta$ -amirona, foi fornecido pelo Dr Emerson Silva Lima (Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UFAM), que já realizou estudos com este tendo extensa competência na área de fitoterápicos, e participará como colaborador e consultor desse projeto.

Com base nessa pequena revisão de literatura, decidimos avaliar os efeitos farmacológicos da $\alpha\beta$ -amirona sobre a inflamação tópica. O modelo de inflamação que iremos utilizar é o de edema de orelha induzido por agentes flogísticos, que é bastante útil na avaliação da atividade anti-inflamatória tópica de compostos, uma vez que é uma metodologia bastante simples e que permite verificar a atividade de compostos no edema induzido por diferentes agentes irritantes, e ainda identificar compostos que tenham a capacidade de penetrar na pele (GARBOR, 2000). Modelos *in vivo* de inflamação são definitivamente as melhores ferramentas para estudar o papel biológico, porque nenhuma outra abordagem permitirá a investigação simultânea de células e mediadores que interagem durante o processo inflamatório. De uma forma geral os testes *in vivo* ou *in vitro* estão presentes em todas as etapas do desenvolvimento de novos fármacos. Porém, a indústria farmacêutica brasileira precisa ser viabilizada através de grandes investimentos em pesquisa básica e desenvolvimento. Na situação atual, cerca de 85% das indústrias transnacionais sediadas no Brasil praticam toda a pesquisa de descoberta e desenvolvimento em seus países de origem (Montanari e Bolzani, 2001). As Universidades Brasileiras tem competência instalada na área de produtos naturais, síntese química e química medicinal (biologia molecular, bioquímica, farmacologia, toxicologia e medicina), o que falta são investimentos e profissionais qualificados localizados nas regiões detentoras da matéria prima para produção destes novos fármacos.

2.2 Descrição Metodológica

2.2.1- Sujeitos Experimentais

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas, da linhagem Balb-c pesando entre 30-35g. Todos os animais experimentais foram mantidos em condições padronizadas no Biotério Central - UFAM. O trabalho foi realizado observando-se os Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA (1991). Informo ainda que esse projeto foi submetido à avaliação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amazonas (CEUA/UFAM) antes de seu início.

2.2.2. Avaliação do Edema

O composto, drogas padrão e agentes flogísticos foram dissolvidos em acetona. Os mesmos foram sempre administrados topicamente em um volume de 20 µL na orelha direita de camundongos, sendo que os compostos em testes foram administrados logo em seguida da administração de fenol e na mesma orelha. Uma hora após os tratamentos, os animais foram anestesiados com solução de uretana 1mg/kg, e a eutanásia ocorreu com injeção intracardíaca de cloreto de potássio 3M. Em seguida, foram coletados fragmentos circulares de ambas as orelhas, com auxílio de um punch de biópsia dermatológica de 5 mm de diâmetro, e pesados. A diferença de peso entre os fragmentos das orelhas direita e esquerda representou o edema. A atividade antiinflamatória da droga de referência foi expressa como percentual de inibição do edema, calculado em relação aos controles positivos (Luo et al., 2008). Para minimizar variações referentes à técnica, os experimentos foram realizados sempre pelo mesmo experimentador.

2.2.3 Avaliação da Reversão do Edema de Orelha Induzido pela Aplicação Tópica de Fenol e Tratado com $\alpha\beta$ -amirona

A dermatite induzida por fenol é um dos modelos animais de dermatite de contato utilizado para produzir irritação imediata. É um modelo de inflamação cutânea que mimetiza a dermatite de contato que ocorre em humanos (LIM et al., 2004). Para verificar a atividade do extrato nesse modelo o edema é induzido pela aplicação tópica de fenol 10% em acetona (20 µL/orelha) na orelha direita de camundongos. O extrato (0,6 mg/orelha), (0,3 mg/orelha) e (0,1 mg/orelha) assim como a dexametasona (0,1 mg/orelha), usada como controle positivo, foram aplicados imediatamente após o fenol nos grupos experimentais.

2.2.4 Avaliação da Reversão do Edema de Orelha Induzido pela Aplicação Tópica de Fenol e Tratado com *Passiflora nítida Kunth*

Em virtude dos ótimos resultados obtidos em outros testes com a *Passiflora nítida* onde se obteve uma indicação de efeito anti-inflamatório *in vitro* (Carvalho, 2008), decidimos utilizá-la para o teste de inflação tópica utilizando o modelo de edema de orelha já padronizado por nós.

Após a indução do processo inflamatório feito através da aplicação tópica de solução de fenol, o extrato hidroetanólico de *Passiflora nítida* foi dissolvido em acetona e aplicado, de acordo com o grupo e em concentrações diferentes (0,6mg/orelha), (0,3mg/orelha) e (0,1mg/orelha) em volume de 20µl.

2.2.5 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando-se primeiramente o teste de Bartlett para determinação da distribuição paramétrica ou não paramétrica. Por esta análise os dados considerados com distribuição paramétrica foram analisados utilizando o teste ANOVA seguido do teste de Tukey Kramer. O intervalo de confiança aceitável foi de 5% ($p < 0,05$).

2.3 Resultados e Discussões

A $\alpha\beta$ -amirona é um dos compostos presente na resina de árvores do gênero *Protium*, resina esta com conhecidos efeitos antiinflamatórios. Vários triptenos semelhantes já foram isolados e testados, porém o composto denominado $\alpha\beta$ -amirona carecia de estudos, e por este motivo tornou-se o alvo deste projeto. Observando-se a **figura 2**, podemos notar a potência do composto como antiinflamatório, pois, independente da dose, este possui reversão do edema tópico de forma semelhante à Dexametasona. Apesar de uma tendência do composto em ser mais potente nas doses maiores (0,3 e 0,6mg), a análise estatística dos dados não aponta diferença entre a ação antiinflamatória da dexametasona e da $\alpha\beta$ -amirona. Resaltamos que os dados da orelha esquerda representam o tecido sem tratamento, e nos dá a média do peso do seguimento de orelha de camundongos; já o grupo fenol representa a média do peso máximo do seguimento de orelha com edema. Esse resultado corrobora com a literatura que atribui a compostos oriundos da resina de vegetais do gênero *Protium* pronunciado efeito antiinflamatório (Calixto JB, et. al, 2004; Siani AC, et. al., 1999 e 2004; Oliveira FA, et. al., 2005; Iwalewa EO, et. al.,2007; Medeiros R, et. al.,2007).

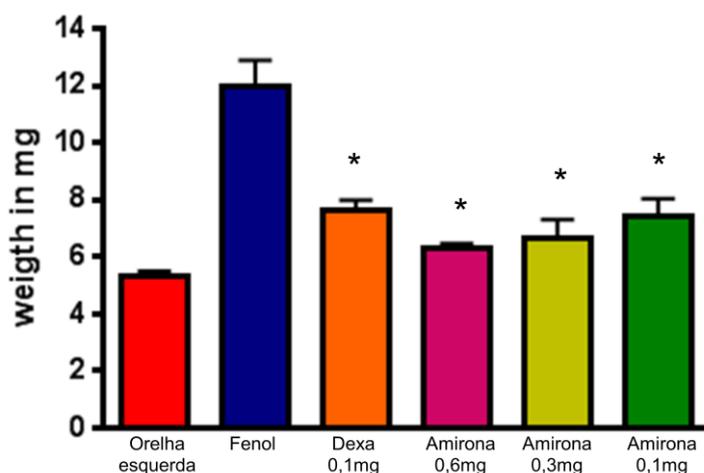


Figura 2 – Avaliação do efeito antiinflamatório do composto $\alpha\beta$ -amirona em modelo de inflamação tópica por aplicação de fenol. Os valores representam a média \pm o desvio padrão, do peso em mg dos seguimentos da orelha esquerda (controle sem tratamento), ou da orelha direita de camundongos submetidos aos diferentes tratamentos. N=06 para todos os grupos.

* $p < 0,001$. ANOVA seguida de teste de Tukey Kramer. Indica diferença entre os tratamentos e o grupo que só recebeu fenol.

Depois de termos padronizado o modelo, e pelo fato de termos tempo sobrando para o término do PIBIC, decidimos testar outros compostos usando os mesmos padrões já determinados. O extrato hidroetanólico da *Passiflora nitida Kunth* já estava sendo testado no Laboratório de Farmacologia da UFAM, e em estudos anteriores mostrou ser um modulador da reatividade vascular e ter potencial antiinflamatório (dados não publicados). Passamos então a

utilizar esse extrato no mesmo modelo de inflamação tópica, utilizando as mesmas doses e a dexametasona como controle. Na figura 3 podemos visualizar o resultado da aplicação tópica do extrato de *Passiflora* revertendo o edema induzido por fenol. Nota-se que a potencia do extrato se iguala a dexametasona, comprovando o efeito antiinflamatório deste extrato. Outras espécies deste gênero, conhecidos popularmente como maracujá, já foram estudados quanto a ação antiinflamatória. O extrato aquoso da *Passiflora edulis*, inibiu os níveis de leucócitos induzidos por diferentes agentes flogísticos em modelo de inflamação aguda (Benincá JP, et. al., 2006); a *Passiflora alata Dryander* apresenta importante efeito antiinflamatório em modelos de inflamação aguda, uma vez que inibiu enzimas que participam desta resposta inflamatória como MPO e ADA, além da PCR, um marcador de resposta inflamatória aguda, em modelo de pleurisia induzida por carragenina (Vargas Júnior, A, 2005). Este gênero vegetal já é utilizado como composto antiinflamatório em formulações homeopáticas e de manipulação com ótimos resultados, porém existe a necessidade de no futuro isolarmos deste extrato a substância responsável por esse efeito.

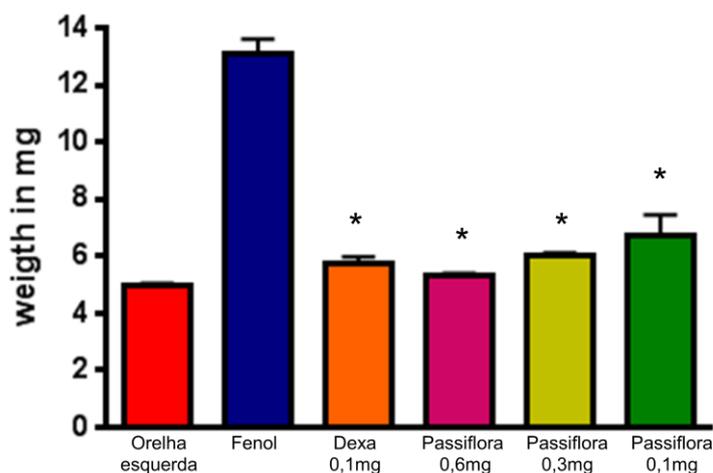


Figura 3 – Avaliação do efeito antiinflamatório do extrato hidroetanólico de *Passiflora nitida Kunth* em modelo de inflamação tópica por aplicação de fenol. Os valores representam a média \pm o desvio padrão, do peso em mg dos seguimentos da orelha esquerda (controle sem tratamento), ou da orelha direita de camundongos submetidos aos diferentes tratamentos. N=06 para todos os grupos.

* $p < 0,001$. ANOVA seguida de teste de Tukey Kramer. Indica diferença entre os tratamentos e o grupo que só recebeu fenol.

Conclusões

O composto $\alpha\beta$ -amirona, assim como os demais triperenos que compõem a resina dos vegetais do gênero *Protium*, possui atividade antiinflamatória tópica, demonstrada em modelo de edema de orelha induzido por fenol em camundongos.

O extrato hidroetanólico de *Passiflora nitida* Kunth possui atividade antiinflamatória tópica, demonstrada em modelo de edema de orelha induzido por fenol em camundongos.

A potencia do efeito antiinflamatório de ambos os compostos testados, é semelhante ao efeito da Dexametasona.

Referências

ALLER, M.A.; ARIAS, J.L.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; ARIAS, J. The inflammatory response: an efficient way of life. *Medical Science Monitor*, v. 12, p. 225-234, 2006.

BENNETT, M.F.; ROBINSON, M.K.; BARON, E.D.; COOPER, K.D. Skin immune systems and inflammation: protector of the skin or promoter of aging? *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, v. 13, p. 15-19, 2008.

BHoola, K.D.; FIGUEROA, C.D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacological Reviews*, v. 44, p. 1-80, 1992.

CALIXTO, J.B.; CABRINI, D.A.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M. Kinins in pain and inflammation. *Pain*, v. 87, p. 1-5, 2000.

CALIXTO, J.B.; CAMPOS, M.M.; OTUKI, M.F.; SANTOS, A.R. Antiinflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of proinflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Medica*, v. 70, p. 93-103, 2004.

CECHINEL-FILHO V., YUNES R.A., Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, 21 (1); 99-105, 1998.

COUTANT, K.D.; RYDER, N.S. Bradykinin upregulates immediate-early gene mRNA in human keratinocytes. *Archives of Dermatological Research*, v. 288, p. 2-6, 1996.

CRAVEIRO, A.A.; FERNANDES, G.F.; ANDRADE, C.H.S. Óleos essenciais de plantas do Nordeste. Fortaleza: Edições UFC, 1981.

DE LIMA, R.A., VELHO, L.M.L.S., FARIA, L.I.L., indicadores bibliométricos de cooperação científica internacional em bioprospecção. *Perspectivas em Ciências da Informação*, 12 (1), 50-64, 2007.

DEBENEDICTIS, C.; JOUBEH, S.; ZHANG, G.; BARRIA, M.; GHOHESTANI, R.F. Immune functions of the skin. *Clinical Dermatology*, v. 19, p. 573-85, 2001.

FREINKEL, R.K.; WOODLEY, D.T. *The Biology of the Skin*. 1 ed. New York: The Parthenon Publishing Group, 2001

FRIEDL, R.; THOMAS, M.; KOPP, B.; GERHARD, P.S. Stimulation of nitric oxide synthesis by the aqueous extract of *Panax ginseng* root in Raw 264.7 cells. *Pharmacology*, v. 34, p. 1663-1670, 2004.

GÀBOR, M. *Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications*. Budapest: Akadémiai Kiadó, 2000.

IWALEWA, E.O.; MCGAW,, L.J.; NAIDOO, V.; ELOFF, J.N. Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. *African Journal of Biotechnology*, v.6, n. 25, p. 2868-2885, 2007.

KHALID, S. A. Chemistry of the Burseraceae. In: WATERMAN, P.G.; GRUNDUM, M.F. *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales*. Academic Press, p. 281-299, 1983.

KINGSTON, D.G.I., The Chemistry of taxol. *Pharmacology & Therapeutics*, 52(1), 1-34, 1991.

KNAPP, S. LPS and bacterial lung inflammation models. *Drug Discovery Today: Disease Models*, vol. 6, n. 4, 2009.

LAWRENCE, T.; GILROY, D.W. Chronic inflammation: a failure of resolution? *International Journal of Experimental Pathology*, v. 88, p. 85-94, 2007.

LIM, H.; PARK, H.; KIM, H.P. Inhibition of contact dermatitis in animal models and suppression of proinflammatory gene expression by topically applied flavonoid, oregonin. *Archives of Pharmacal Research*. v. 27, p. 442-448, 2004.

MAKRANTONAKI, E.; ZOUBOULIS, C.C. The skin as a mirror of the aging process in the human organism - State of the art and results of the aging research in the German National Genome Research Network 2 (NGFN-2). *Experimental Gerontology*, v. 42, p. 879-886, 2007.

MAN, M.Q.; SHI, Y.; MAN, M.; LEE, S.H.; DEMERJIAN, M.; CHANG, S.; FEINGOLD, K.R.; ELIAS, P.M. Chinese herbal medicine (Tuhuai extract) exhibits topical anti-proliferative and anti-inflammatory activity in murine disease models. *Experimental Dermatology*, v. 17, p. 681-687, 2008.

MEDEIROS, R.; OTUKI, M.F.; AVELLAR, M.C.; CALIXTO, J.B. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene alpha-amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *European Journal of Pharmacology*, v. 559, p. 227-235, 2007.

MONTANARI, C.A., BOLZANI V.S., Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova*, 24(1), 105-11, 2001

NATHAN, C. Points of control in inflammation. *Nature*, v. 420, p. 846-852, 2002.

OLIVEIRA, F.A.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.C.; LIMA JR, R.C.P.; SILVA, R.M.; MAIA, J.L.; BRITO, G.A.A.C.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S. Protective effect of α - and β -amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. Trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 98, n.2, p. 103-108, 2005.

PARNET, R. Phytochimie des Burseracées. *Lloydia*, v.35, p. 280-287, 1972.

PIETROVSKI, E.F.; MAGINA, M.D.; GOMIG, F.; PIETROVSKI, C.F.; MICKE, G.A.; BARCELLOS, M.; PIZZOLATTI, M.G.; CABRINI, D.A.; BRIGHENTE, I.M.; OTUKI, M.F. Topical anti-inflammatory activity of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) leaves. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 60, p. 479-487, 2008.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J.M.; JENSEN, J.M. The skin: an indispensable barrier. *Experimental Dermatology*, v. 17, p. 1063-1072, 2008.

REZENDE, E.A., RIBEIRO M.T.F., Conhecimento tradicional, plantas medicinais e propriedade intelectual: biopirataria ou bioprospecção? *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, Botucatu, 7 (3), 37-44, 2005

ROCHE, 2005. A pele. Disponível em: <www.roche.pt/ebooks/files/pdfs/dexpantenol3.pdf>. Acesso em: 20 novembro, 2008.

SALCEDO, J.M.V., CAMARGO, L.M.A., BRAGA, M.F.V., DE MARIA, P.S., MACEDO, V.O., Avaliação da eficácia do artesunato associado à tetraciclina na terapêutica da malária falciparum. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 30 (3), 215-222, 1997.

SCCARO-JUNIOR, N.L., Desafios da bioprospecção no Brasil. Texto para discussão nº 1569, do Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada do Governo Federal, 2011.

SCHULTES, R.E.; RAFFAUF, R.F. The healing forest medical and toxic plants of the northwest amazonia. Portland, OR: Dioscorides Press, 1990.

SEELIGER, S.; DERIAN, C.K.; VERGNOLLE, N.; BUNNETT, N.W.; NAWROTH, R.; SCHMELZ, M.; VON DER WEID, P.Y.; BUDDENKOTTE, J.; SUNDERKÖTTER, C.; METZE, D.; ANDRADE-GORDON, P.; HARMS, E.; VESTWEBER, D.; LUGER, T.A.; STEINHOFF, M. Proinflammatory role of proteinase-activated receptor-2 in humans and mice during cutaneous inflammation in vivo. *The FASEB Journal*, v. 17, p. 1871-1885, 2003.

SIANI, A.C.; GARRIDO, I.S.; MONTEIRO, S.S.; CARVALHO, E.S.; RAMOS, M. F.S. Protium icariba as a source of volatile essences. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 32, n.5, p. 477-489, 2004.

SIANI, A.C.; RAMOS, M.F.S.; MENEZES-DE-LIMA JR, O.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; FERNANDEZ-FERREIRA, E.; SOARES, R.O.A.; ROSAS, E. C.; SUSUNAGA, G. S.; GUIMARÃES, A. C.; ZOGHBI, M.G.B.; HENRIQUES, M.G.M.O.; Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of Protium. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 66, n. 1, p. 57-69, 1999.

SMITH, C.J.; ZHANG, Y.; KOBOLDT, C.M.; MUHAMMAD, J.; ZWEIFEL, B.S.; SHAFFER, A.; TALLEY, J.J.; MASFERRER, J.L.; SEIBERT, K.; ISAKSON, P.C. Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proceedings of the National Academy Sciences U S A*, v. 95, p. 13313-13318, 1998.

SPELLBERG, B. The cutaneous citadel: a holistic view of skin and immunity. *Life Sciences*, v. 67, p. 477-502, 2000.

VALDÉS, L.J., MISLANKAR, S.G., PAUL, A.G., *Coleus barbatus* (C. forskohlii) (Lamiaceae) and the potencial new drug forskolin (coleonol). *Economic Botany*, 41 (4), 474-483, 1987.

VIEIRA-JUNIOR, G.M.; SOUZA, C.M.L.; CHAVES, M.H. Resina de Protium heptaphyllum: isolamento, caracterização estrutural e avaliação das propriedades térmicas. *Química Nova*, v. 28, n. 2, p. 183-187, 2005.

Parecer do comitê de ética



Poder Executivo
Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Comitê de Ética em Experimentação Animal – CEEA



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Protocolo nº 021/2013-CEEA/UFAM, intitulado como "AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO COMPOSTO AB-AMIRONA EM MODELO DE INFLAMAÇÃO TÓPICA". Sob responsabilidade e orientação **Profa. Dra. Geane Antiques Lourenço**, está de acordo com a Legislação Federal pertinente ao uso científico de animais e foi **APROVADO** pelo COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA-UFAM) em Reunião ocorrida em 03/07/2013.

Manaus, 15 de julho de 2013.

Profa. Dra. Cintya Jamille Fritsch Brandão de Oliveira
Diretora em exercício do Biotério Central da UFAM
Portaria 1561/2013- Gabinete da Reitoria, de 30 de abril de 2013