

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

BIOPROSPECÇÃO DE *Byrsonima garcibarrigae* CUATREC.
(MALPIGHIACEAE) COM FOCO NA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Voluntária: Tallita Marques Machado

MANAUS

2014

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

RELATÓRIO FINAL

PIB – S/0139/2013

BIOPROSPECÇÃO DE *Byrsonima garcibarrigae* CUATREC.
(MALPIGHIACEAE) COM FOCO NA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Voluntária: Tallita Marques Machado

Orientador: Prof^a MSc Fernanda Guilhon Simplicio

MANAUS

2014

RESUMO

Byrsonima garcibarrigae Cuatrec. é uma espécie arbórea amazônica com potencial farmacológico e constituição química ainda muito pouco conhecidos. Nessa direção, este estudo propôs avaliar o potencial anti-inflamatório de extratos, frações e/ou substâncias obtidas da casca do caule da *Byrsonima garcibarrigae*. Os extratos obtidos por maceração auxiliada por ultrassom com os solventes hexano, acetato de etila e metanol, sequencialmente, foram avaliados quanto a inibição da lipoxigenase em microplaca de 96 poços em sistema contendo 100 µg/mL dos extratos, o ácido linoleico a 20 µM e a enzima foram incubados a temperatura ambiente em pH 8,0 por 3 minutos. A viabilidade celular em macrófagos foi realizada pelo método do Alamar Blue, onde as células foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos e frações por 24 horas, sendo utilizado como controle positivo a doxorrubicina. A ativação dos macrófagos foi realizada via estímulos de LPS, sendo os macrófagos tratados com diferentes concentrações dos extratos e fases, realizando-se a quantificação de nitrito para determinação indireta da inibição da ativação das células. Nessa análise, o controle positivo foi a indometacina. Os resultados foram analisados por ANOVA. A partir dos resultados obtidos, observou-se que todos os extratos apresentaram uma baixa inibição da lipoxigenase, sendo o metanólico o mais ativo, com percentual de inibição de $25,6 \pm 17,56$ %. Todos os extratos apresentaram baixa citotoxicidade e inibiram a ativação dos macrófagos, com consequente diminuição da produção de óxido nítrico, um importante mediador inflamatório, sendo que dentre os extratos analisados, o extrato hexânico apresentou maior inibição, $47,06 \pm 2,64$ %, na contração de 50 µg/mL. A mistura de terpenos α e β -amirina, isolada do extrato hexânico, demonstrou ser uma das responsáveis por sua atividade anti-inflamatória, apresentando a produção de nitrito de $36,70 \pm 5,76$ %. A partir dos resultados obtidos, pode-se observar que *Byrsonima garcibarrigae* possui potencial anti-inflamatório, devido a redução da ativação de macrófagos, com consequente redução da produção de óxido nítrico, e ao comparar sua atividade anti-inflamatória com a antidiabética, observada no projeto anterior, verifica-se que esta espécie pode ser indicada como promissora fonte de substâncias biologicamente ativas, que possam atuar no tratamento do Diabetes Mellitus via inibição de enzimas como a α -glucosidase e lipase pancreática, e via anti-inflamatória, auxiliando na redução da resistência a insulina no diabetes tipo 2 devido processos inflamatórios, onde ocorre a ativação de macrófagos, e na inibição da ativação dos macrófagos, que geram respostas inflamatórias e auxiliam na insulite, no diabetes tipo 1. Logo, novos ensaios são necessários a fim de avaliar se as respostas encontradas *in vitro* são compatíveis *in vivo*, e quais as substâncias são responsáveis por esta atividade.

Palavras-chaves: *Byrsonima garcibarrigae*, lipoxigenase, inibição da ativação de macrófagos, inflamação, diabetes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 – <i>Byrsonima garcibarrigae</i> Cuatrec.....	08
Figura 02 – Esquema da cromatografia de camada delgada preparativa de extratos e fases de <i>Byrsonima garcibarrigae</i> Cuatrec.....	13
Figura 03 – - Percentual de inibição da lipoxigenase <i>in vitro</i> pelos extratos de <i>Byrsonima garcibarrigae</i> Cuatrec.....	16
Figura 04 - Viabilidade de macrófagos frente aos extratos de <i>Byrsonima garcibarrigae</i> Cuatrec. (B, C e D) e de doxorubicina (controle positivo) (A).....	17
Figura 05 - Efeito de extratos da casaca do caule de <i>Byrsonima garcibarrigae</i> sobre a produção de nitrito por macrófagos murinos J774 estimulados com lipopolissacarídeo (LPS 1 µg/mL) por 24 horas.....	18
Figura 06 – Viabilidade de macrófagos frente a mistura de α e β -amirina.....	20
Figura 07 - Análise cromatográfica da fração clorofórmica do extrato metanólico das cascas do caule de <i>Byrsonima garcibarrigae</i>	21
Figura 08 - Análise cromatográfica de camada delgada da fase acetato de etila do extrato metanólico das cascas do caule de <i>Byrsonima garcibarrigae</i> Cuatrec revelada com solução de anisaldeído sob aquecimento.....	22
Figura 09 - Espectrograma de RMN de ^1H e pressat da amostra A1.....	22
Figura 10 - Espectrograma de RMN de ^1H e pressat da amostra A2.....	23
Figura 11 - Espectrograma de RMN de ^1H e pressat da amostra A3.....	23

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
2. OBJETIVOS.....	8
2.1. Objetivo Geral.....	7
2.2. Objetivos Específicos	7
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	9
3.1 Bysonima garcibarrigae Cuatrec.	8
3.2. Inflamação e o Diabetes Mellitus.....	9
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
4.1. Coleta da matéria-prima vegetal e obtenção do extrato	12
4.2. Partição do extrato metanólico.....	12
4.3. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	12
4.4. Cromatografia em camada delgada Preparativa (CCDP).....	13
4.5. Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	14
4.6. Inibição da lipoxigenase in vitro.....	14
4.7. Cultivo e manutenção da cultura de células de macrófagos	14
4.8. Ensaio de viabilidade celular em macrófagos	14
4.9. Inibição da ativação de macrófagos por lipopolissacarídeo.....	15
4.10. Quantificação de nitrito	15
4.11. Análise estatística.....	15
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
6. CONCLUSÃO.....	25
7. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES.....	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia, como resultado da diminuição da secreção de insulina, a sua ação, ou ambos. A hiperglicemia crônica do diabetes está associada com disfunção e falência de vários órgãos, como os olhos, rins, coração e vasos sanguíneos. O diabetes mellitus é dividido em duas categorias: diabetes tipo 1 e diabetes tipo 2, sendo que, pelo menos, 90% de todos os casos pertencem ao último (GUARIGUATA et al., 2011).

Estudos recentes já caracterizam o diabetes como uma doença inflamatória. No diabetes tipo 2, observou-se a invasão de macrófagos no tecido pancreático durante o início do diabetes, sendo estes os responsáveis pela produção de fatores pró-inflamatórios (CUCAK, GRUNNET e ROSENDAHL, 2014). E no diabetes tipo 1, observou-se um aumento da presença de monócitos, bem como níveis elevados de interleucina-1 β , interleucina-6 e TNF- α no pâncreas de pacientes (ESPINOZA-JIMÉNEZ, PÉON e TERRAZAS, 2012). A ativação crônica destes mediadores pró-inflamatórios podem levar à resistência à insulina (OLEFSKY e GLASS, 2010).

Dentre do gênero *Byrsonima*, um dos maiores da família Malpighiaceae, com cerca de 150 membros, 50% dos quais possuem ocorrência no Brasil (CARDOSO, 2006). *Byrsonima japurensis*, *Byrsonima crassifolia* e *Byrsonima intermedia* foram as espécies que tiveram atividade anti-inflamatória comprovada (GUILHON-SIMPLICIO et al., 2012; MUNIZ, FLORES e PEREZ, 2013; ORLANDI et al., 2011), sendo que as sementes e frutos de *Byrsonima crassifolia*, foi comprovado a atividade antidiabética (PEREZ-GUTIERREZ e MOTA-FLORES, 2014).

Byrsonima garcibarrigae Cuatrec, é uma espécie arbórea encontrada no Norte do Brasil, uma das milhares de espécies da região Amazônica com potencial farmacológico pouco investigado. Em um estudo anterior, foi comprovado que as cascas do caule possuem potencial antidiabético, pela grande capacidade de inibição das enzimas α -glucosidase e lipase pancreática (MACHADO, 2013), porém sua atividade anti-inflamatória ainda não foi investigada.

Tendo em vista a comprovada relação entre diabetes e inflamação, este estudo investigou o efeito dos extratos obtidos das cascas do caule de *Byrsonima garcibarrigae* sobre a ativação de macrófagos, e assim observar seu potencial anti-inflamatório e avaliar uma possível aplicação como objetivo de estudos voltados ao desenvolvimento de fármacos ou medicamentos antidiabéticos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial anti-inflamatório de extratos, fases e/ou substâncias obtidos da casca do caule da *Byrsonima garcibarrigae* Cuatrec..

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial inibitório de diferentes extratos de *Byrsonima garcibarrigae* Cuatrec. sobre a enzima lipooxigenase;
- Avaliar a capacidade de inibição da ativação de macrófagos por diferentes extratos e frações da casca de *Byrsonima garcibarrigae* Cuatrec.
- Obter substâncias ou frações com ação anti-inflamatória.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *Byrsonima garcibarrigae* Cuatrec.

Byrsonima garcibarrigae Cuatrec., é uma espécie arbórea já encontrada em matas de Terra Firme do Estado do Amazonas (Brasil), e alguma cidades de Colômbia, Equador e Peru (MOBOT, 2014), cerca de 5 metros de altura com casca marrom-avermelhado (MACHADO, 2013). Apresenta folhas estreitamente elípticas com longos pecíolos com 2 cm de comprimento e com flores brancas ou róseas com pelos puberulentos com 5 a 6 mm de comprimento (LEWIS, 1973). Não há registros de uso popular medicinal dessa espécie, embora várias espécies do mesmo gênero o sejam, extensivamente.

Em um estudo recente com extratos e frações da casca do caule de um espécime da cidade de Manaus, foi constatada expressiva atividade inibitória sobre as enzimas alfa-glucosidase e lipase com percentual de inibição e baixa concentração inibitória média (CI₅₀). Nesse mesmo estudo, foram isolados e identificados os triterpenos α -amirina e β -amirina, que possui uma ampla gama de atividades descritas na literatura (MACHADO, 2013).



Figura 1 - *Byrsonima garcibarrigae* Cuatrec. (A) Espécime no local de coleta; (B) Detalhes das flores; (C) Detalhe do caule (ARQUIVO PESSOAL).

3.2. Inflamação e o Diabetes Mellitus

A inflamação é uma resposta não específica da microcirculação a lesão dos tecidos provocada por estímulos químicos, físicos ou biológicos, ou alguma combinação destes. No entanto, quando há uma perda de controle homeostático desse processo de defesa, a inflamação desempenha um papel prejudicial que contribui para o aparecimento e agravamento de diversas doenças (NATHAN, 2002).

A extensão dos eventos inflamatórios observados está diretamente relacionada à intensidade do estímulo inicial e aos mecanismos imunológicos que são ativados (MCINTYRE et al., 1997). Vários aspectos do processo inflamatório são regulados por mediadores produzidos por células do sistema imune e células endoteliais. Estes mediadores em questão podem ser definidos como moléculas solúveis e difusíveis, e são representados por produtos da degranulação de mastócitos (histamina e serotonina), componentes do sistema complemento, citocinas, leucotrienos, prostaglandinas e outros mediadores lipídicos (PUTTINI, 2006).

Os macrófagos são importantes células moduladoras do processo inflamatório e desempenham papel crucial no desenvolvimento da inflamação e cronificação do processo patológico (PAULINO, 2005). Os macrófagos atuam ativamente como células apresentadoras de antígenos durante um processo inflamatório. Também potencializam as repostas de células T e B via expressão de moléculas co-estimulatórias e liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL -1, IL-6, IL-12 e TNF- α , e quando sofrem ativação, passam a expressar a enzima sintetase do óxido nítrico indutível, responsável pela produção de óxido nítrico que ocorre em processos inflamatórios, sendo tal substância um importante mediador de vários eventos relacionados à intensificação da resposta inflamatória (PADRÃO, 2009).

O diabetes, que é uma desordem metabólica de cunho inflamatório, apresenta-se em dois tipos: o tipo 1 (DM1) e o tipo 2 (DM2). O DM1 é geralmente diagnosticado na infância ou na adolescência, e sua principal característica é a necessidade diária de suplementação de insulina. Na maioria das vezes, ocorre por conta da destruição de aproximadamente 85% das células β -pancreáticas (MION JUNIOR e NOBRE, 1999). Já o DM2 normalmente progride de um estado de pré-diabetes para um estado evidente de diabetes que é causado por falha das células β -pancreáticas e deficiência da secreção de insulina, também pode estar associada a dessensibilização dos receptores de insulina, assim, incorrendo na hiperglicemia de jejum, podendo ser agravados pela obesidade,

levando a um estado de resistência à insulina no tecido adiposo, fígado e muscular (OLEFSKY e GLASS, 2010). Nesse caso, a inflamação do tecido adiposo contribui para a resistência à insulina através de citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6) (JOURDAN et al., 2013).

A hiperglicemia e, conseqüentemente, o aumento da glicose intracelular induzem a ativação da via dos polióis, a formação de produtos finais de glicação avançada (AGE), o estresse oxidativo, as anormalidades lipídicas, além da ativação da proteína quinase C (GOMES, SILVA e SPINETI, 2013). Desenvolve-se estado inflamatório persistente com a ativação dos polimorfonucleares, o que induz a ativação espontânea de cadeia oxidativa e liberação de mieloperoxidase, elastase e outros componentes dos neutrófilos, causando danos em duas vias. Eles podem tornar os polimorfonucleares “tolerantes”, isto é, com resposta menos efetiva quando estimulados por patógenos (BANDEIRA et al., 2003; CASTILHO e RESENDE, 1999), dano osmótico, alteração da função de proteínas e fatores de transcrição, além de dano ao DNA celular, que associado ao acometimento na micro e na macrovasculatura representa a base da patogênese das complicações diabéticas (GOMES, SILVA e SPINETI, 2013).

No processo inflamatório que ocorre no diabetes, duas populações de macrófagos foram definidas: os macrófagos ativados classicamente que respondem a patógenos intracelulares através da secreção de citocinas pró-inflamatórias e de espécies reativas de oxigênio e, alternativamente, macrófagos ativados que são induzidos durante respostas Th2 exibindo atividades anti-inflamatórias. Ambas as populações de macrófagos são protagonistas centrais na diabetes, a primeira provoca respostas inflamatórias, que inicia a insulite e a morte de células no pâncreas durante diabetes do tipo 1, enquanto que a segunda população diminui a hiperglicemia, a insulite e a inflamação no pâncreas, assim, regulam negativamente a diabetes do tipo 1. No diabetes do tipo 2, a inflamação é um componente de resistência à insulina associada à obesidade, os macrófagos classicamente ativados são uma população de células dominante envolvidos na criação do perfil inflamatório, resistência à insulina, e ativação de sinais inflamatórios no desenvolvimento e na progressão da doença. Em contraste, os macrófagos ativados alternativamente regulam a liberação de citocinas pró-inflamatórias, atenuando a inflamação do tecido adiposo (ESPINOZA-JIMÉNEZ, PÉON e TERRAZAS, 2012).

Assim, a procura de substâncias com ação anti-inflamatória e inibidoras de enzimas envolvidas no tratamento da diabetes, com a enzima α -glucosidase, apresenta

benefícios terapêuticos aos pacientes. Como a maioria das opções terapêuticas anti-inflamatórias possuem atividades bastante amplas, exercendo propriedades gerais para inibir funções imunes inatas, uma abordagem mais específica para inibir apenas os componentes inflamatórios que possuam ligação direta com a resistência à insulina ou direcionados ao eixo de inflamação/resistência a insulina, preservando outras funções do sistema imune inato, poderia ser uma alternativa viável no tratamento do diabetes (OLEFSKY e GLASS, 2010).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta da matéria-prima vegetal e obtenção do extrato

Para a realização das análises, foi utilizado os extratos hexano, acetato de etila e metanol, obtidos das cascas do caule de *Byrsonima garcibarrigae* Cuatrec, com os rendimentos estabelecidos na Tabela 1, obtidos do projeto PIB-S 002/2012 do qual este estudo é uma continuação.

Solvente	Massa do pó das cascas de <i>Byrsonima garcibarrigae</i> (g)	Massa do extrato seco (g)	Rendimento (%)
Hexano	822,7440	2,8768	0,35
Acetato de etila	822,7440	5,6620	0,70
Metanol	822,7440	111,4556	13,5

Tabela 1– Rendimento dos extratos obtidos da casca do caule de *Byrsonima garcibarrigae* (MACHADO, 2013).

4.2. Partição do extrato metanólico

O extrato metanólico foi fracionado por partição líquido-líquido com solventes em polaridade crescente (hexano e clorofórmio), onde 100,3261 g de extrato seco foi solubilizado em 1 litro de uma mistura de metanol e água destilada na proporção 1:1, sendo em seguida realizada a partição. A fase residual foi denominada hidrometanólica, a qual foi seca via *spray dryer*. Os solventes hexano e clorofórmio foram eliminados em evaporação rotativa na temperatura de 45° C, pressão de 500 mmHg e na rotação de 180 rpm.

4.3. Cromatografia em camada delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada em cromatoplasas de sílica gel 60 CCM ALUGRAM®Xtra SIL G/UV₂₅₄ com marcador de fluorescência UV₂₅₄. Os extratos e fases foram solubilizados em solventes conforme afinidade, e foram adicionados em cromatoplasas com o auxílio de capilares, sendo em seguida eluídas em

cubas saturadas contendo a fase móvel, contendo misturas de solventes em proporções variadas. As placas foram reveladas utilizando os seguintes agentes reveladores: anisaldeído (solução de ácido acético: ácido sulfúrico: anisaldeído 50:1:0,5) solução de difenilboriloxietilamina 1% em metanol seguida de solução de polietilenoglicol 4000 5% em etanol, e lâmpadas UV 254 nm e UV 360 nm.

4.4. Cromatografia em camada delgada Preparativa (CCDP)

A análise de CCDP foi realizada para isolar substâncias presentes nas fases do extrato metanólico. Utilizou-se as cromatoplasacas de sílica gel 60 20x20 cm, onde as amostras foram concentradas e aplicadas em faixas de 1 cm. As cromatoplasacas foram eluídas em cubas cromatográficas, conforme o método da CCD, em seguida foi realizado a visualização das manchas com auxílio de lâmpadas UV 360 nm (figura 2), e a partir dos fatores de retenção das manchas, retirou-se a sílica das cromatoplasacas correspondentes a posição das manchas (raspagem). A extração das substâncias da sílica foi feita com metanol em ultrassom por 5 minutos (Ultrasonic Cleaner Unique[®]), seguido de filtração em seringa com filtro millipore PTFE 0.45 μm e armazenadas em recipientes, pesados e identificados, sob refrigeração ($\pm 8\text{ }^{\circ}\text{C}$).



Figura 2 – Esquema da cromatografia de camada delgada preparativa de extratos e fases de *Byrsonima garcibarrigae* Cuatrec. (ARQUIVO PESSOAL).

4.5. Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Para a análise de RMN H^1 e presat, as amostras de foram dissolvidas em metanol deterado e seus espectros de RMN foram registrados em espectrômetro de RMN de 11,7 T, utilizando os parâmetros de aquisição: pulso: 45° C, tempo relaxação: 1,000 segundos; tempo de aquisição: 2,049 segundos, largura de varredura: 7997.6 Hz, largura de linha 0,2 Hz. Foram acumuladas quatro repetições para cada decaimento induzido livre.

4.6. Inibição da lipoxigenase *in vitro*

No teste de inibição da lipoxigenase, o sistema contendo os extratos na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, o ácido linoleico a 20 μM e a enzima lipoxigenase (100.000 U/mL) foram incubados a temperatura ambiente em pH 8,0. Após 3 minutos, fez-se a leitura da absorbância a 234 nm. O percentual de inibição da lipoxigenase *in vitro* foi calculado a partir da fórmula: inibição (%) = [(Absorbância do controle – Absorbância da amostra) / Absorbância do controle] x 100.

4.7. Cultivo e manutenção da cultura de células de macrófagos

Na análise, utilizou-se macrófagos murinos da linhagem J774, que foram cultivadas em meio RPMI-1640 contendo 10% de soro fetal bovino (FBS), 50 U/mL de penicilina e 50 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina (Invitrogen) a 37°C em estufa a 5% de CO_2 . O LPS foi preparado como uma solução-estoque de 1 mg/mL em água esterilizada e armazenado a -20°C.

4.8. Ensaio de viabilidade celular em macrófagos

Os macrófagos foram cultivados na concentração de 5×10^3 células/poço em placas de 96 poços. Após 24 horas de incubação e aderência das células, as mesmas foram tratadas com os extratos e fases em diferentes concentrações, obtidas por meio de diluição seriada. As células foram tratadas em triplicata durante 24 horas. Como controle positivo, utilizou-se a Doxorubicina (5 $\mu\text{g/mL}$) e controle negativo o meio de cultura. Após o período de 24 horas, adicionou-se 10 μL de azul de tripano 0,4%. Após o tempo de 2

horas, realizou-se a leitura da fluorescência (NAKAYAMA et al., 1997). A viabilidade foi calculada conforme a fórmula: % viabilidade = $(F_t \times 100) / F_b$, onde F_t = (fluorescência da célula + meio + substância + resazurina) e F_b = (fluorescência da célula + meio + resazurina).

4.9. Inibição da ativação de macrófagos por lipopolissacarídeo

Os macrófagos foram plaqueados na densidade 1×10^6 células/mL em placas de 96 poços seguindo-se adesão por 24 horas a 37°C, em 5% de CO₂. Após aderência, o meio foi retirado e adicionado meio de cultivo RPMI com 1% de SFB com volume de 100 µL/poço. As células foram estimuladas pela adição de lipopolissacarídeo e tratadas juntamente com os extratos e fases nas concentrações de 50, 25, 12,5 e 6,25 µg/mL, em quadruplicata. Como controle negativo utilizou-se somente o meio de cultura. Em seguida, as células foram incubadas por 24 horas a 37°C, 5% de CO₂, e o sobrenadante celular foi coletado para a análise de nitrito. Utilizou-se como padrão a indometacina.

4.10. Quantificação de nitrito

Para a determinação da produção de NO•, 100 µL do sobrenadante celular foi submetido a reação com igual volume do reagente de Griess, que foi preparado utilizando soluções estoques de cloreto de naftiletilediamina (0,1%) dissolvido em H₃PO₄ (5%) e de sulfanilamida a 1% dissolvida em H₃PO₄ (5%), que foram adicionadas na proporção 1:1. Após o período de incubação de 10 minutos, fez a leitura da absorbância a 560 nm. O cálculo das concentrações de nitrito foi realizado com base em curvas padrões utilizando diferentes concentrações de NaNO₃ (15 µM até 1000 µM).

4.11. Análise estatística

Os resultados de viabilidade celular e inibição da produção de nitrito por macrófagos foi avaliada por análise de one way ANOVA seguido de múltiplas comparações no *software* GraphPad Prism 6®, considerando o nível de significância de $p < 0.05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos extratos brutos secos, fez o teste qualitativo de inibição *in vitro* da lipoxigenase, a fim de se observar se os extratos poderiam atuar inibindo a via da lipoxigenase, visto que as lipoxigenases são as enzimas responsáveis pela produção de hidroxiácidos e leucotrienos a partir do ácido araquidônico (FERNANDES, 2012). A inibição foi avaliada usando uma lipoxigenase purificada que converte o ácido araquidônico em hidroperóxidos, os quais são detectados através da adição de um cromógeno (REGO, 2012).

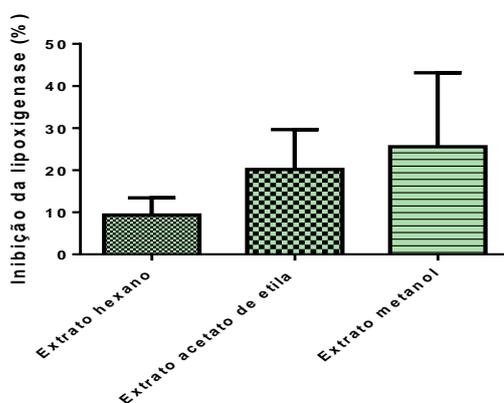


Figura 3 - Percentual de inibição da lipoxigenase *in vitro* pelos extratos de *Byrsonima garcibarrigae* Cuatrec.

O extrato metanólico foi o que apresentou maior percentual de inibição entre os extratos analisados, $25,6 \pm 17,56\%$, o que pode ser devido a presença de compostos fenólicos e a expressiva atividade antioxidante, já comprovadas em trabalho anterior (MACHADO, 2013). Os compostos fenólicos são antioxidantes primários que agem como sequestradores de radicais livres e bloqueadores de reações em cadeia, e estes compostos, principalmente os glicosídeos de fenólicos, podem inibir, tanto a cicloxigenase como a lipoxigenase (MOREIRA e MANCINI-FILHO, 2004). Em especial, os flavonoides apresentam a propriedade de inibir tanto a via da cicloxigenase quanto da 5-lipoxigenase no metabolismo do araquidonato, impedindo a produção dos eicosanoides, que atuam na fase imunológica da inflamação (SILVA, et al., 2002).

Porém, a presença de compostos fenólicos não é um fator primordial para que ocorra a inibição. Considerando que os compostos fenólicos da *Byrsonima garcibarrigae* são, majoritariamente, taninos e flavonoides, conforme indicado por testes preliminares,

sugere-se que estes compostos podem possuir estruturas grandes que não permitam que haja uma complementariedade entre os compostos e o receptor da enzima, caracterizando assim um baixo percentual inibitório (VERLI e BARREIRO, 2005). Além disso, pode-se observar que a baixa inibição possa estar relacionada com a interação dos compostos presentes nos extratos, visto que não foi analisado substâncias purificadas e sim um conjunto complexo de substâncias.

A viabilidade de macrófagos frente aos extratos de *Byrsonima garcibarrigae* foi analisada pelo método do Alamar Blue, que é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox, onde sua redução reflete a proliferação celular (MOUSINHO, 2010). Os extrato acetato de etila e metanólico apresentaram citotoxicidade dose-dependente estatisticamente significativa quando comparadas ao controle positivo, a doxorrubicina, que é uma substância com grande capacidade citotóxica (ROCHA, 2010), nas concentrações de 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL e 12,5 µg/mL.

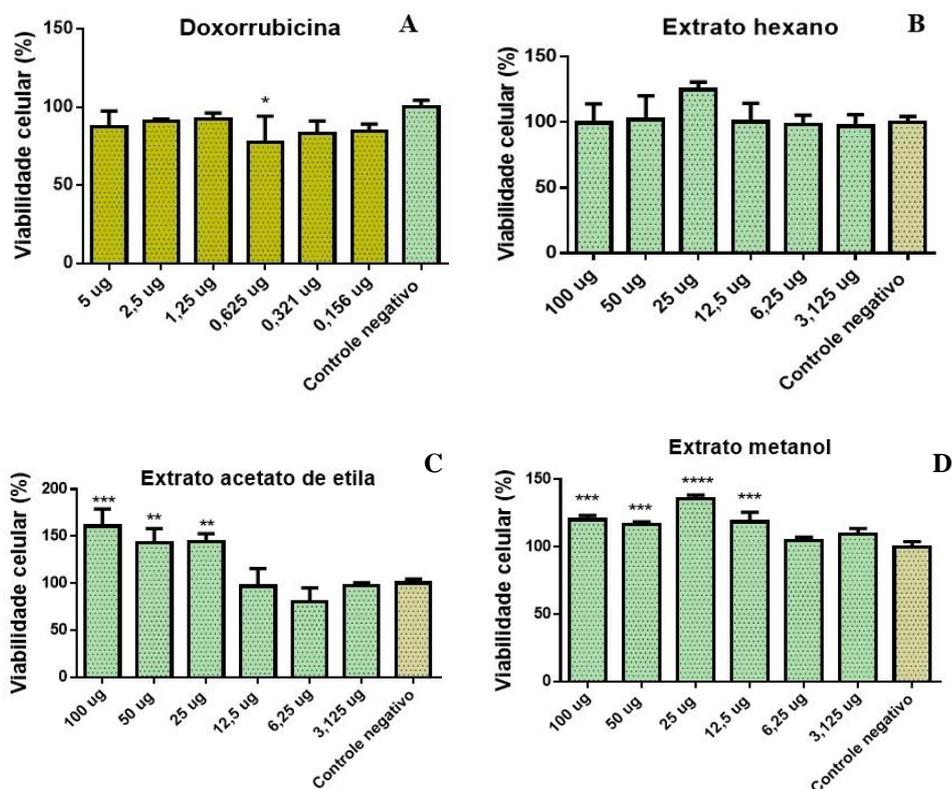


Figura 04 – Viabilidade de macrófagos frente aos extratos de *Byrsonima garcibarrigae* Cuatrec. (B, C e D) e de doxorrubicina (controle positivo) (A). Valor de *p* versus controle positivo: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0005$ e **** $p < 0,0001$.

Contudo, a citotoxicidade foi considerada baixa, permitindo a avaliação da influência desses extratos sobre a ativação de macrófagos. A partir da análise de viabilidade celular, pode-se determinar as concentrações dos extratos que seriam utilizadas durante a análise de inibição da ativação de macrófagos por lipopolissacarídeo, que foram as concentrações de 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL e 6,25 µg/mL. A avaliação da atividade inibitória da ativação dos macrófagos foi realizada por meio da dosagem de nitrito, que é um método de dosagem indireta do óxido nítrico (NO), que é um mediador químico da inflamação produzido por quase todas as células de mamíferos e que possui um amplo espectro de atividades sinalizadoras nos processos fisiológicos e fisiopatológicos (BOGDAN, 2001). No presente estudo, fez-se a ativação dos macrófagos por sua exposição a lipopolissacarídeos (LPS).

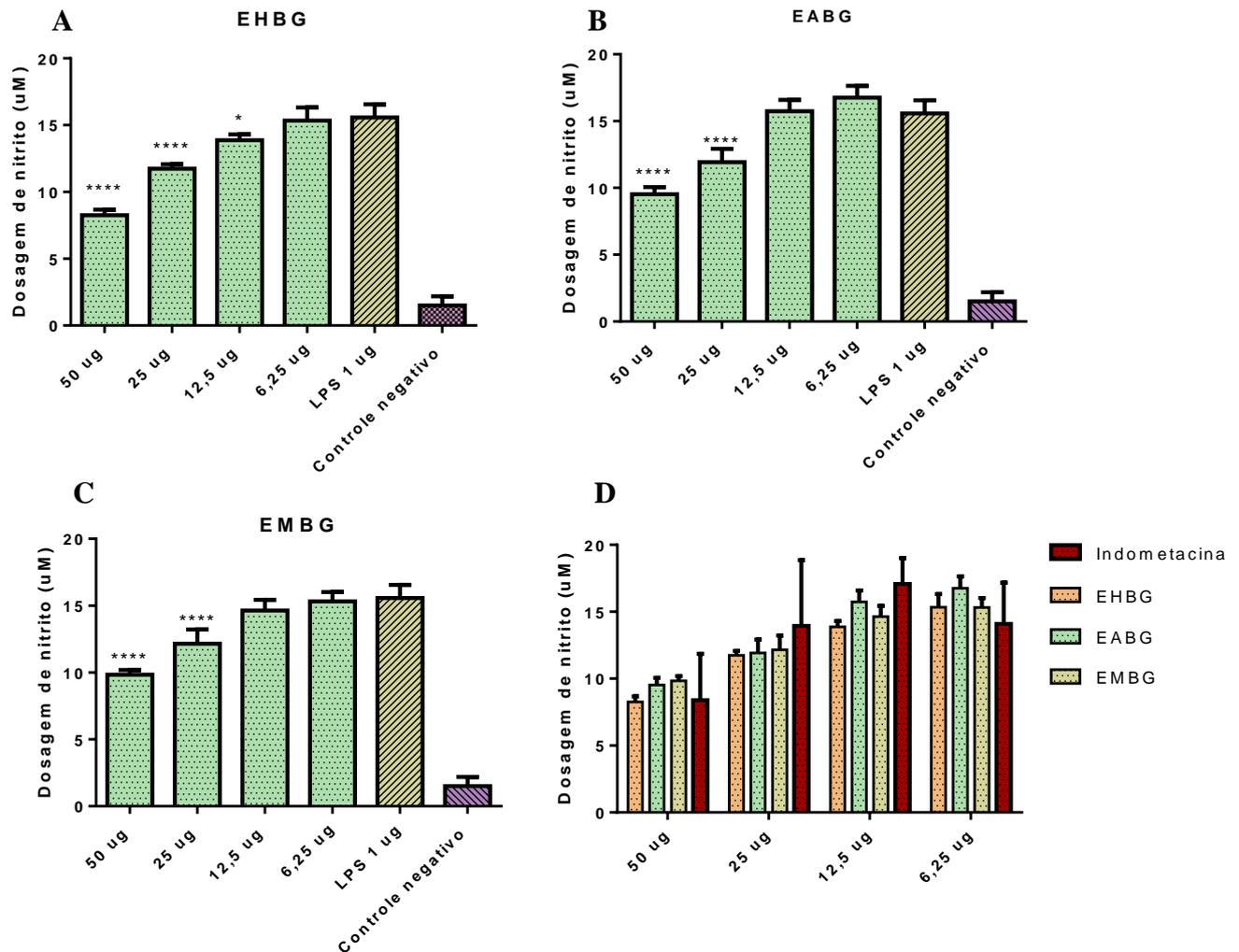


Figura 05 – Efeito de extratos da casaca do caule de *Byrsonima garcibarrigae* sobre a produção de nitrito por macrófagos murinos J774 estimulados com

lipopolissacarídeo (LPS 1 µg/mL) por 24 horas. (A) Efeito de diferentes concentrações do extrato hexânico. (B) Efeito de diferentes concentrações do extrato acetato de etila. (C) Efeito de diferentes concentrações do extrato metanólico. (D) Comparação entre todos os extratos analisados e o controle positivo, a indometacina. Valor de *p* versus controle positivo: * *p* < 0,05, ** *p* < 0,01, *** *p* < 0,0005 e **** *p* < 0,0001.

Todos os extratos inibiram a produção de NO em células de macrófagos murinos J774 de modo significativo nas concentrações de 50 µg/mL e 25 µg/mL, apresentando um percentual inibitório de $36,9 \pm 2,2\%$ e $22,1 \pm 6,9\%$, respectivamente para o extrato metanólico, $38,90 \pm 3,38\%$ e $23,57 \pm 6,46\%$, respectivamente para o extrato acetato de etila e de $47,06 \pm 2,64\%$ e $24,73 \pm 2,16\%$ para o extrato hexânico, sendo que este último foi o que apresentou melhor perfil inibitório entre os extratos analisados, tendo também apresentado uma inibição significativa na concentração de 12,5 µg/mL, de $11,04 \pm 2,78\%$. Logo, pode-se observar que os extratos são capazes de reduzir a ativação dos macrófagos por estímulos inflamatórios, como o LPS, reduzindo assim a sua capacidade de resposta celular e produção de óxido nítrico. Em relação ao controle positivo, a indometacina, todas as concentrações utilizadas dos extratos não apresentaram diferença significativo, demonstrando que as mesmas, atuam inibindo de forma semelhante a indometacina, que é um anti-inflamatório não esteroideal.

Observando que o extrato hexânico apresentou um melhor perfil inibitório da produção de NO, e que durante o seu processo de extração, houve a precipitação com posterior separação e identificação de uma mistura triterpenos pentacíclicos de α e β -amirina (MACHADO, 2013). Esta mistura, também foi analisada quanto a viabilidade celular e a inibição da produção de NO, a fim de se observa se estes triterpernos seriam os responsáveis por esta atividade.

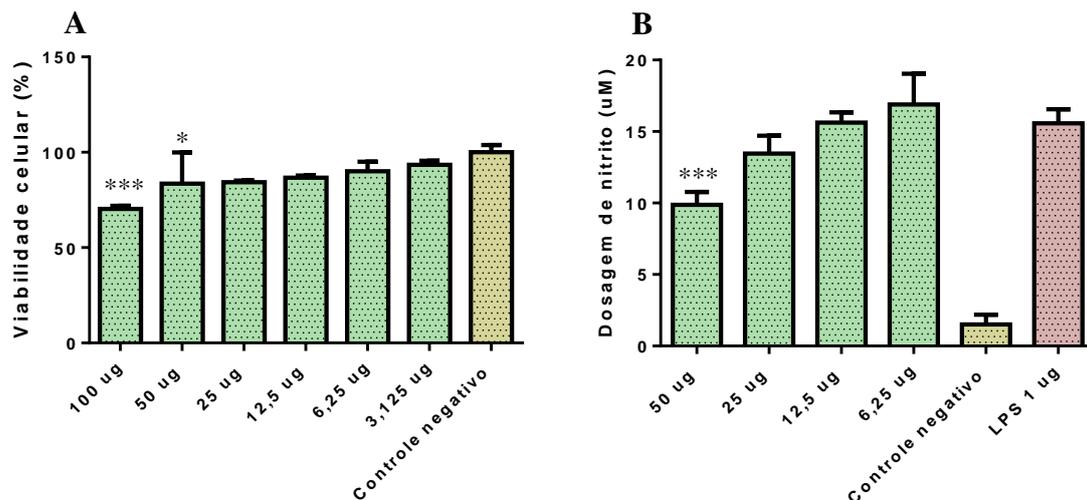


Figura 06 – Viabilidade de macrófagos frente a mistura de α e β -amirina (A) e efeito de diferentes concentrações da mistura de α e β -amirina e sobre a produção de nitrito por macrófagos murinos J774 estimulados com lipopolissacarídeo (LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 24 horas (B). Valor de *p* versus controle positivo: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0005$ e **** $p < 0,0001$.

O triterpenos α e β -amirina apresentaram uma citotoxicidade maior que o extrato hexânico e inibiram a produção de NO de modo significativo somente na concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, com inibição de $36,70 \pm 5,76$ %. Já é sabido, que essas substâncias possuem efeito anti-inflamatório (VÁZQUEZ, PALAZON e NAVARRO-OCAÑA, 2012), entretanto, os dados obtidos nesse estudo sugerem que elas não são as únicas substâncias ativas presentes no extrato. Com isso, novos estudos fitoquímicos, como fracionamento em coluna e análises de cromatografia gasosa, devem ser realizados a fim de se observar quais as substâncias presentes neste extrato, que juntamente com α e β -amirina, colaboram para sua atividade anti-inflamatória apresentada.

Como o extrato metanólico foi o que apresentou melhor atividade inibitória em relação a enzima α -glucosidase, tendo porcentagem de inibição de $96,77 \pm 0,34\%$ e IC_{50} de $1,09 \pm 0,32$, respectivamente (MACHADO, 2013), apresentou maior percentual de inibição da lipoxigenase e uma significativa inibição da produção de NO, ele foi submetido a partição líquido-líquido originando uma fração hexânica, uma fração clorofórmica e uma fração remanescente, hidrometanólica. Devido a pouca massa obtida das frações hexânica e clorofórmica, estas não foram testadas quanto a inibição da produção

de NO. Contudo, a fase clorofórmica foi analisada por cromatografia de camada delgada preparativa, a fim de se identificar substâncias ali presentes.

A fração clorofórmica apresentou um bom perfil de separação na CCD com a fase móvel clorofórmio:metanol 9:1, com destaque para as manchas com os fatores de retenção de 0,58 e 0,23 em luz UV 365 nm e com os reveladores químicos citados na metodologia, denominadas A1 e A2, respectivamente (Figura 7). Assim, esta fração foi analisada por CCDP, utilizando a mesma fase móvel, em seguida fez-se a raspagem destas substâncias das cromatoplas, que foram extraídas em metanol.

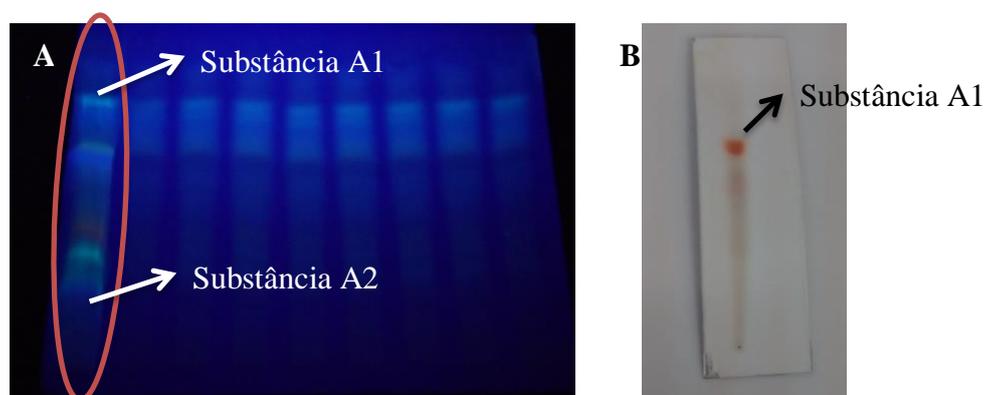


Figura 07 – Análise cromatográfica da fração clorofórmica do extrato metanólico das cascas do caule de *Byrsonima garcibarrigae*. (A) Placa de CCDP revelada em lâmpadas UV 360, tendo a parte destacada, revelada com solução de difenilboriloxietilamina 1%/polietilenoglicol 4000 5%. (B) Placa de CCD revelada com solução de anisaldeído sob aquecimento.

Após a extração, as manchas foram novamente analisadas por CCD, na qual apresentaram, individualmente, uma mancha única. Dessa forma, estas amostras foram enviadas para o Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA) para serem analisados em RMN H^1 e pressat, visando sua identificação.

A fase hidrometanólica, por apresentar um percentual de inibição da alfa-glucosidase de 79,7% (MACHADO, 2013), foi particionada com diclorometano e acetato de etila. A fração acetato de etila também foi analisada por CCD e CCDP, com um bom perfil de separação na fase móvel metanol:clorofórmio 6:4 (Figura 9), que permitiu a separação e obtenção da substância A3, com fator de retenção de 0,88. Essa amostra também foi enviada para o Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA) para ser analisada em RMN H^1 e pressat.

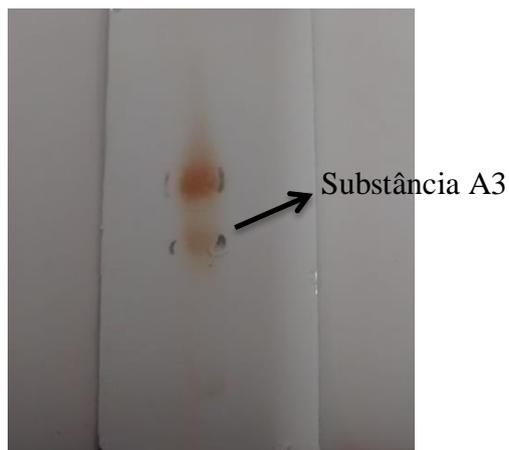


Figura 08 – Análise cromatográfica de camada delgada da fase acetato de etila do extrato metanólico das cascas do caule de *Byrsonima garcibarrigae* Cuatrec revelada com solução de anisaldeído sob aquecimento.

Nos espectrogramas de RMN de H^1 e pressat, a amostra A1 apresentou regiões características de grupamentos alifáticos α -dissubstituídos e alifáticos α -monossubstituídos, com deslocamentos nas regiões 3.647 ppm, 3.642 ppm, 3.350 ppm, 3.316 ppm, 3.303 ppm, 3.313 ppm, 3.310 ppm e 3.307 ppm, e de alifáticos β -dissubstituídos e acíclicos alifáticos.

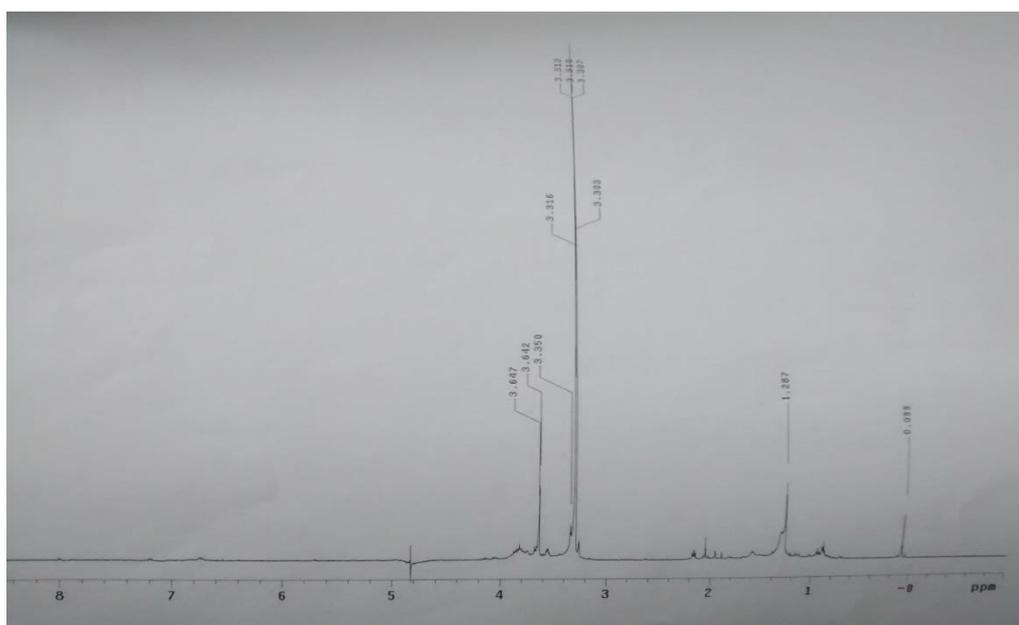


Figura 09 – Espectrograma de RMN de H^1 e pressat da amostra A1.

A amostra A2 apresentou regiões características de grupamentos aromáticos e heteroaromáticos, alquenos, alifáticos α -dissubstituídos e alifáticos α -monossubstituídos, com deslocamentos em 3.872 ppm, 3.791 ppm, 3.753 ppm, 3.650 ppm, 3.645 ppm, 3.313 ppm, 3.3110 ppm, 3.307 ppm, alquinos, alifáticos β -dissubstituídos e acíclicos alifáticos, com deslocamentos em 1.334 ppm, 1.304 ppm, 1.284 ppm, 1.263 ppm, 0.896 ppm e 0.881 ppm.

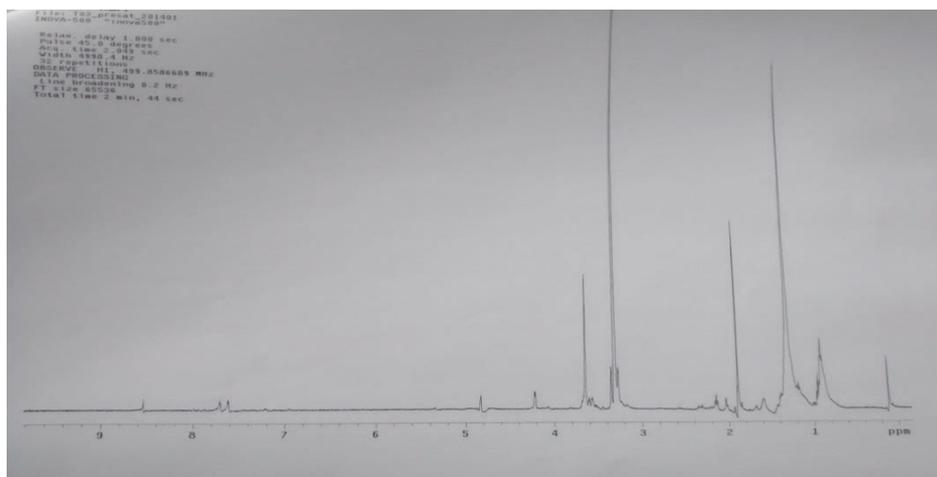


Figura 10 - Espectrograma de RMN de H^1 e pressat da amostra A2.

A amostra A3 apresentou regiões características de grupamentos aromáticos e heteroaromáticos, alquenos, alifáticos α -dissubstituídos, alifáticos α -monossubstituídos, alifáticos β -dissubstituídos e acíclicos alifáticos.

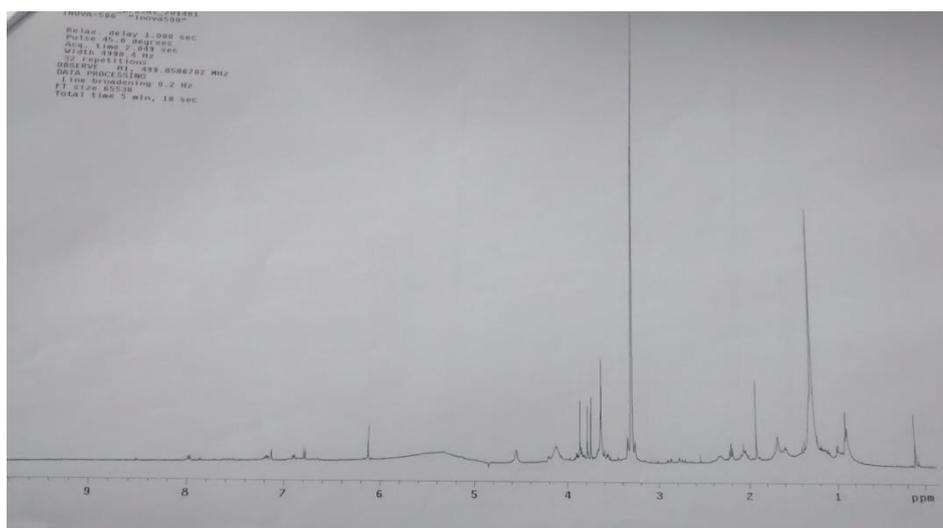


Figura 11 - Espectrograma de RMN de H^1 e pressat da amostra A3.

Embora a análise de RMN H^1 e pressat tenha sido inconclusiva para a elucidação estrutural das substâncias analisadas, pode-se verificar que todos os grupamentos observados podem estar em diferentes metabólitos secundários, como os flavonoides e triterpenos, que são metabólitos produzidos pelas cascas de *Byrsonima garcibarrigae*, como verificado previamente.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que a espécie *Byrsonima garcibarrigae* Cuatrec pode ser considerada como uma fonte de substâncias bioativas. Diferentes extratos e frações testados apresentaram efeitos anti-inflamatórios associados a diminuição da produção de óxido nítrico por macrófagos. Por outro lado, observou-se que sua ação anti-inflamatória tem menor relação com inibição da lipooxigenase, uma enzima chave da resposta inflamatória, devido ao baixo percentual inibitório apresentado.

Como observado, extratos e frações de baixa e média polaridade são os mais ativos na inibição da produção de óxido nítrico, contudo, o fracionamento das amostras pareceu diminuir a atividade. Por outro lado, os extratos mais polares foram os mais ativos contra a lipooxigenase. Esses resultados, agregados a alta capacidade de inibição de enzimas α -glucosidase e lipase pancreática, observada em trabalho anterior, podem a espécie como promissora em estudos voltados ao desenvolvimento de novos fármacos ou medicamentos contra o Diabetes Mellitus, por atuar em duas vias importantes para o controle da doença.

Assim, novos estudos devem ser realizados, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, a fim de observar se o potencial anti-inflamatório desta espécie também está relacionado a inibição de outros mediadores ou vias da inflamação. Outros estudos fitoquímicos devem ser realizados a fim de se obter a identificação e o isolamento das substâncias responsáveis também podem ser feitos. De toda forma, esse estudo demonstrou o grande potencial biológico desta espécie amazônica, pouco explorado até então.

7. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Nº	Descrição	Ago 2013	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2014	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
1	Levantamento Bibliográfico	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
2	Coleta, Identificação e preparação do material botânico			R									
4	Obtenção dos extratos orgânicos brutos			R	R	R							
5	Teste de inibição da lipoxigenase						R						
6	Realização de testes de atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i> para direcionamento do estudo fitoquímico										R	R	
7	Partição do extrato metanólico									R	R	R	
8	Análise dos extratos e fases por CCD						R	R	R	R	R	R	
9	Análise por CCDP										R	R	
10	Análise por RMN de H^1 e pressat												R
11	Análise dos Resultados											R	R
12	Elaboração do Relatório Parcial						R						
13	Elaboração do Resumo e Relatório final											R	R
14	Preparação da Apresentação Final para o Congresso de Iniciação Científica												R

R – Atividades realizadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANDEIRA, F. et al. **Endocrinologia e diabetes**. Rio de Janeiro: Medsi, 2003.
- BOGDAN, C.. Nitric oxide and the immune response. **Nature immunology**, n. 2, p. 907-916, 2001.
- CARDOSO, C. R. P.. **Atividade mutagênica e ativadora da resposta imune celular induzidas por *Byrsonima crassa* Niedenzu e *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae)**. 2006. 99f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
- CASTILHO, L. S.; RESENDE, V. L. S. Profilaxia antibiótica: quem necessita?. **Revista do Conselho Regional de Odontologia de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v. 5, n. 3, p. 146-150, set./dez. 1999.
- CUCAK, H.; GRUNNET, L. G.; ROSENDAHL, A.. Accumulation of M1-like macrophages in type 2 diabetic islets is followed by a systemic shift in macrophage polarization. **Journal of leukocyte biology**, v. 95, janeiro, p. 149-160, 2014.
- ESPINOZA-JIMÉNEZ, A.; PÉON, A. N.; TERRAZAS, L. I.. Alternatively activated macrophages in types 1 and 2 diabetes. **Mediators of inflammation**, v. 2012, dezembro, 2012.
- FELÍCIO, J. D. et al.. Triterpenos isolados das folhas de três espécies de *Byrsonima*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.62, n. 1,2, p.91-92, 1995.
- FERNANDES, J. C. V.. **Determinação da atividade anti-inflamatória de extratos metanólicos de *Pterospartum tridentatum***. 2012. 54f. Relatório de estágio para obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, Universidade da Beira Interior, Covilhã.

GOMES, M. B.; SILVA, A. T. K.; SPINETI, P. P. M.. Diabetes mellitus e coração: um continuum de risco, quais os alvos contemporâneos de tratamento e como alcançá-los? **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 12, s. 1, agosto, 2013.

GUARIGUATA, L. et al.. The international diabetes federation diabetes atlas methodology for estimating global and national prevalence of diabetes in adults. **Diabetes research and clinical practice**, v. 94, p. 322-332, 2011.

GUILHON-SIMPLICIO, F.. Anti-inflammatory, anti-hyperalgesic, antiplatelet and antiulcer activities of *Byrsonima japurensis* A. Juss. (Malpighiaceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 140, p. 282-286, 2012.

JOURDAN, T. et al.. Activation of the Nlrp3 inflammasome in infiltrating macrophages by endocannabinoids mediates beta cell loss in type 2 diabetes. **Nature medicine**, v. 19, n. 9, setembro, p.1132-1140, 2013.

LEWIS, W. H. A new species of *Byrsonima* (Malpighiaceae) from Panama. **Brittonia**, v. 25 p. 304-306, 1973.

MACHADO, T. M.. **Avaliação do potencial antidiabético da casca do caule de *Byrsonima garcibarrigae* Cuatrec. (Malpighiaceae)**. 2013. 34f. Relatório final do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

MCINTYRE, T. M. et al. Molecular mechanisms of early inflammation. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 78, p. 302-305, 1997.

MION JÚNIOR, D.; NOBRE, F. **Risco Cardiovascular Global**. São Paulo: Lemos Editorial, 1999.

MOBOT. *Byrsonima garcibarrigae* Cuatrec.. Missouri Botanical Garden. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/19501675?tab=specimens>> Acesso em: 28 de julho de 2014.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI-FILHO, J.. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de nutrição**, v. 4, n. 17, outubro/dezembro, 2004.

MOUSINHO, K. C.. **Estudo do potencial anticâncer de um derivado de chalcona, 1-(4-nitrofenil)-3-fenilprop-2-em-1-ona, in vitro e in vivo**. 2010. 170f. Tese (Doutor em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

MUNIZ, A. R.; FLORES, L. B. C.; PEREZ, R. M. G.. Anti-inflammatory activity of the hexane extract of *Byrsonima crassifolia* seeds in experimental animal models. **Alternative therapies in health and medicine**, v. 1, janeiro/fevereiro, p. 26-36, 2013.

NAKAYAMA, G. R. et al.. Assessment of the Alamar blue assay for cellular growth and viability *in vitro*. **Journal of immunological methods**, v. 2, n. 204, p. 205-208, 1997.

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

OLEFSKY, J. M.; GLASS, C. K.. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. **The annual review of physiology**, v. 72, p. 219-246, 2010.

ORLANDI, L. et al.. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of the stem bark of *Byrsonima inintermedia* A. Juss.. **Journal of ethnopharmacology**, v. 137, p. 1469-1476, 2011.

PAULINO, N.. **Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato padronizado de própolis e de seu principal constituinte ativo, artepillin C®**. 2005. 137f. Tese (Doutor em Farmacologia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

PADRÃO, J. C.. **Identificação da via de degradação da óxido nítrico sintase induzida em macrófagos ativados e infectados pelo *Toxoplasma gondii***. 2009. 51f. Dissertação (Mestre em Biociências e Biotecnologia) – Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro.

PEREZ-GUTIERREZ, R. M.; MOTA-FLORES, J. M... Effect of chronic administration of hexane extract of *Byrsonima crassifolia* seed on B-cell and pancreatic oxidative parameters in streptozotocin-induced diabetic rat. **African journal of traditional, complementary and alternative medicines**, v. 11, n. 2, p. 231, 2014.

PUTTINI, S. M. B. **Avaliação da resposta inflamatória desencadeada pelas telas de polipropileno e politetrafluoretileno expandido implantadas no espaço intraperitoneal – Estudo experimental em camundongos**. 2006. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília.

REGO, E. A.. **Avaliação da atividade anti-inflamatória de plantas dos Açores**. 2012. 119f. Dissertação (Mestre em Ciências Biomédicas), Universidade dos Açores, Ponta Delgada.

ROCHA, V. C. J.. **Estratégia para reduzir a cardiotoxicidade da doxorubicina (DOX) sem afetar sua atividade antineoplásica**. 2010 74f. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador.

SILVA, R. R. et al.. Efeito de flavonoides no metabolismo do ácido araquidônico. **Medicina Ribeirão Preto**, v. 35, p. 127-133, abril/junho, 2002.

SOUZA, P. M.. **Atividade de inibição enzimática por espécies vegetais do bioma cerrado**. 2011. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília.

VÁZQUEZ, L. H.; PALAZON, J.; NAVARRO-OCAÑA, A.. The pentacyclic triterpenes α , β -amyrins: a review of sources and biological activities. **Phytochemicals**, março, 2012.

VERLI, H.; BARREIRO, E. J., Um paradigma da química medicinal: a flexibilidade dos ligantes e receptores. **Química nova**, v. 28, n. 1, p. 95-102, 2005.